

## 다양한 농도의 테트라사이클린로 처리된 치근면이 치주인대세포의 증식과 전개에 미치는 영향

경북대학교 치과대학 치주과학교실

정오철 · 서조영

### I. 서 론

이상적인 치주치료의 목적은 조직에 확산된 염증 및 치주낭의 제거와 치주질환에 의해 소실된 치주조직을 재생시켜 신생결합조직에 의한 신부착을 얻도록 하는 것이다<sup>37)</sup>. 치주질환으로 인해 파괴된 조직을 회복하기 위한 치료법에는 치주질환의 주 원인 요소인 치태 및 치석을 제거하는 치석제거술과 내독소 및 괴사된 백악질을 제거하고 평활한 치근면을 만드는 치근활택술 뿐만 아니라 치주판막술, 골이식술 등의 외과적 처치가 시행되고 있다. 그러나, 이런 통상적인 치주치료만으로는 내독소에 의한 치근면 오염을 완전히 제거하지 못하고<sup>5)</sup> 주로 치은상피의 근단측 이동으로 인한 긴 접합상피에 의해 치유되므로<sup>37)</sup> 결합조직에 의한 부착이 방해되어 완전한 조직의 재생을 얻기 힘들었다.

치주수술후 치주조직 치유에 관여하는 세포로는 치은상피세포, 치은결체조직세포, 치조골세포, 치주인대세포 등이 있으며 각 세포마다 서로 다른 치유양상을 보인다. 치은상피세포에 의한 치유는 긴 접합상피로 일어나고<sup>26)</sup>, 치은결체조직과 치조골세포에 의한 치유에서는 신부착은 관찰할 수 없고 노출된 치근면에서 치근흡수 또는 골유착을 보인다<sup>21, 28)</sup> 반면 치주인대세포에 의한 치유에서는 신생백악질에 결합조직이 매입된 신부착을 보였다<sup>27)</sup>. 그러므로 치주인대세포에서 유래된 세포만이 치주조직재생에 직접적으로 관여한다고 할 수 있다.

치주조직의 재생을 위해서는 이화된 치근면에서 치태, 치석 그리고 내독소 등을 철저히 제거하여야만 하고<sup>44)</sup>, 상아세관 및 교원섬유를 노출시켜야 하며<sup>24, 43)</sup> 치주인대세포가 상피세포보다 먼저 이화된 치근면에 이주하여 부착하여야 한다<sup>7, 20, 29)</sup>. 이를 목적으로 사용되는 치주처리방법 중의 하나로 화학물질을 이용한 치근면 탈회법이 있으며, 치근면 탈회제중 구연산과 테트라사이클린이 주로 이용되고 있다.

항생물질인 테트라사이클린을 치근면에 국소적으로 처치시 나타나는 효과로 치근면상의 내독소등이 제거되고 약제차체의 산도에 의한 탈회로 도말층이 제거되며 교원질이 노출되어 노출된 교원질에 의해 섬유아세포의 이주 및 부착과 성장이 촉진되고 상피세포의 근단방향으로의 이동이 차단되며<sup>8, 24, 38, 39, 43)</sup>, 결합조직에 의한 부착소견을 보인다고 보고되고 있다<sup>6)</sup>. 테트라사이클린의 항균작용에 대한 보고로, Walker등<sup>42)</sup>은 테트라사이클린 4-8 $\mu$ g/ml가 치은연하세균의 억제농도가 되며, 이 농도는 테트라사이클린을 하루에 1g 복용한 양과 같게 된다고 했으며 테트라사이클린 복용으로 치은연하세균에 대한 억제농도를 얻을 수 있다고 제안했다. 그리고 Baker등<sup>8)</sup>과 Wikesjö등<sup>43)</sup>은 테트라사이클린이 상아질면에 강하게 흡착되었다가 생물학적 활성농도를 유지하면서 48시간 동안 유리되어 치은연하세균에 대한 최소억제농도를 유지하므로 치근면이 테트라사이클린을 천천히 유리시키는 저장소로서 작용한다고 보

고하였다. 한편 테트라사이클린의 전신적 투여효과에 대한 보고로는 치은열구액내의 테트라사이클린 농도가 혈중 농도보다 2~10배 정도 높게 나타나며<sup>16)</sup> 테트라사이클린이 치은열구액내에서 교원질분해효소 활성도를 억제하여 결과적으로 교원질파괴를 감소시키고<sup>15, 16)</sup> 골흡수도 억제하므로 조직파괴를 감소시킬 수 있다고 보고되고 있다<sup>17)</sup>. 그리고 테트라사이클린을 50 주 정도 장기간 복용시에는 운동성 세균은 거의 제거되고 치은염, 치주낭 깊이, 임상적 부착 상실의 현저한 감소를 보인다고 보고되고 있다<sup>25)</sup>.

테트라사이클린의 세포독성효과로, Somerman 등<sup>36)</sup>은 세포배양시 배양액내에 미노사이클린을 직접 포함시킨 실험에서 50 $\mu$ g/ml 이상의 농도에서 세포부착을 직접적으로 증진시키나, 100 $\mu$ g/ml 이상에서는 세포의 전개를 억제하고 결과적으로 결합조직에 의한 부착을 방해할 수 있다고 보고하였으며, Tsukuda와 Gabler<sup>41)</sup>는 독시사이클린이 치주인대세포에 세포독성이 있을 수 있고 기질에서의 부착과 전개를 억제시킬 수 있다고 제안하였다.

이상의 연구를 살펴본 결과, 테트라사이클린에 대한 전신적 투여효과와 항균작용, 약제 자체 산도에 의한 탈회로 섬유아세포의 부착과 성장을 증진시키는 효과 및 세포독성에 대한 연구가 주로 보고되었으나, 테트라사이클린의 농도별 세포증식과 전개에 대한 비교연구는 미미하여 본 실험에서 치주질환에 이환된 치근면에 테트라사이클린을 다양한 농도로 적용시켜 신부착에 필수적인 치주인대세포의 증식을 측정, 비교하여 치주인대세포의 전개양상을 주사전자현미경으로 관찰해 보므로써 임상적용시 테트라사이클린의 적절한 농도를 얻고자 본 실험을 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 치주인대세포의 배양

치주인대세포의 초기배양은 서등<sup>2)</sup>의 방법을 이용하였는데 그 방법에 대해 살펴보면 다음과

같다. 교정치료를 목적으로 발거한 제1소구치의 치경부 1/3 부위를 소파한 후 초기배양과정에서 야기될 수 있는 세균감염을 방지하기 위하여 200U/ml penicillin(근화제약, 한국)과 200 $\mu$ g/ml streptomycin(동아제약, 한국)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle Medium(Gibco사, 미국, 이하 DMEM으로 표기)에 침수시켰다. 발거된 치아를 생검배지로 3회 세척한 후 치근중간 1/3 부위의 치주인대를 큐렛으로 채취하여 35mm 세포배양접시에 고르게 분포시킨 후 10% Fetal Bovine Serum(Gibco사, 미국, 이하 FBS로 표기)에 100U/ml penicillin과 100 $\mu$ g/ml streptomycin이 포함된 DMEM을 넣고 37 $^{\circ}$ C, 100% 습도, 5% CO<sub>2</sub> 공기혼합배양기(Sanyo사, 일본)에서 배양하였다.

치주인대세포가 배양접시를 완전히 피개하는 단층 밀생이 형성되면 0.05% trypsin/0.02% EDTA를 이용하여 세포를 채취한 후 100mm 세포배양접시를 이용하여 계대배양하였으며 본 실험에는 3, 4세대의 치주인대세포를 사용하였다.

### 시편 제작

중증의 치주질환에 이환된 치아를 발거하여 철저한 치근활택술을 시행한 후 각 치아를 carborundum disk를 이용하여 치주염에 이환되었던 부분만을 절단하여 절편으로 사용하였고 실험전에 121 $^{\circ}$ C, 15psi에서 15분간 고압멸균하였다.

### 증식세포수 측정

치근절편에 치근활택술만 시행한 균을 대조군으로 하고 치근활택술 시행후 테트라사이클린(Sigma사, 미국)을 25mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml, 100mg/ml, 150mg/ml 농도별로 5분간 처리한 균을 실험군으로 하여, 각 군마다 3개씩 즉, 총 54개의 절편을 준비한 후 치근활택술 균은 인산완충생리식염수에 5분간 침수시키고, 테트라사이클린 처리군들의 경우는 테트라사이클린 수용액에 5분간 침수시킨 후 인산완충생리식염수로 3회 세척하고 24 well 조직배양기에 옮긴 다음, 각 시편에 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 개의 치주인대세

포를 가지는 10% FBS가 함유된 배양액 DMEM 1ml씩을 넣은 후 배양하였다. 세포부착이 배양 5분 후부터 시작되어 6시간까지 계속되며 그 후에는 세포분열이 시작된다는 Klebe<sup>23)</sup>의 주장을 근거로 하여 6시간 배양 후 치주인대세포가 부착된 각 치근절편을 새로운 24 well 조직 배양기로 이동하고 세포가 포함되지 않은 배양액 1ml씩을 넣고 24, 48, 72시간 동안 배양하였다. 각 시간대별로 배양액을 완전히 제거하고 인산완충생리식염수로 세척후 0.05% trypsin/0.02% EDTA로 처리하여 세포를 분리시키고 광학위상차현미경하에서 hemocytometer를 이용하여 분리된 세포수를 측정하였다. 각 치근절편의 면적을 계산하여 단위면적당 증식된 세포수를 계산하였고, 각 군간의 유의성을 검증하기 위해 one way ANOVA 분석을 시행하였다.

#### 세포부착 후 주사전자현미경 관찰

치근면에 대한 치주인대세포의 부착 및 전개양상을 관찰해 보기 위한 실험에서는 치근 활택술군을 대조군으로 하고, 가장 많은 증식 세포수를 보인 테트라사이클린 농도군(테트라사이클린 100mg/ml)과 테트라사이클린 처리군 중 중간정도의 세포증식률을 보인 농도군(테

트라사이클린 50mg/ml)을 실험군으로 하였다. 24 well 조직배양기에 각 군의 시편을 넣고 각 시편당  $1 \times 10^4$ 개의 치주인대세포를 가진 배양액 1ml씩을 넣어 동일한 조건하에서 배양하였다. 세포배양 개시 후 30분, 6시간, 24시간에 배양액을 제거하고 2.5% glutaraldehyde(0.1M 인산완충액, pH 7.4)에서 고정하고난 후 고정액을 제거하고 0.1M 인산완충생리식염수로 5번 세척하였으며 1% osmium tetroxide(0.1 M 인산완충액, pH 7.4)로 처리한 다음 순차적으로 에틸알콜로 탈수하고 임계점 건조기를 이용하여 임계점 온도로 건조시키고 금으로 증착시킨 후 주사전자현미경(Model S - 2300, Hitachi사, 일본)을 이용하여 각 군별로 시간에 따른 치주인대세포의 부착 양상을 형태학적으로 관찰하여 비교하였다.

### III. 성 적

#### 증식세포수 측정

세포증식률의 실험에서는 24, 48, 72시간 모두에서 치근활택술군, 테트라사이클린 25 mg/ml, 150mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml, 100 mg/ml 처리군 순으로 세포수가 증가함을 보였으며, 각 군 모두에서 시간경과에 따라 부착

Table 1. Periodontal ligament cell proliferation experiment on root surface which were treated with various concentrations of Tetracycline - HCl(mean  $\pm$  S. E. :  $X^4$  cells/cm<sup>2</sup>).

|          | 24 Hours        | 48 Hours        | 72 Hours        |
|----------|-----------------|-----------------|-----------------|
| RP - 0   | 1.09 $\pm$ 0.09 | 1.16 $\pm$ 0.17 | 1.36 $\pm$ 0.30 |
| RP - 25  | 1.57 $\pm$ 0.53 | 1.59 $\pm$ 0.30 | 1.88 $\pm$ 0.11 |
| RP - 50  | 2.03 $\pm$ 0.08 | 2.35 $\pm$ 0.21 | 3.20 $\pm$ 0.40 |
| RP - 75  | 2.15 $\pm$ 0.20 | 2.41 $\pm$ 0.55 | 3.24 $\pm$ 0.05 |
| RP - 100 | 2.25 $\pm$ 0.37 | 2.94 $\pm$ 0.45 | 3.97 $\pm$ 0.81 |
| RP - 150 | 1.68 $\pm$ 0.20 | 1.90 $\pm$ 0.53 | 2.57 $\pm$ 0.46 |

RP - 0 Root planing only  
 RP - 25 Root planing + Tetracycline 25mg/ml  
 RP - 50 Root planing + Tetracycline 50mg/ml  
 RP - 75 Root planing + Tetracycline 75mg/ml  
 RP - 100 Root planing + Tetracycline 100mg/ml  
 RP - 150 Root planing + Tetracycline 150mg/ml



조).

세포배양 24시간 후의 치주인대세포는 치근 활택술군에서 세포의 변연일부가 함몰되고 신장되어 뚜렷한 극성을 보였으며 양쪽 끝 모두 말단부가 넓게 퍼진 양상을 보였다. 테트라사이클린 50mg/ml 처리군과 테트라사이클린 100 mg/ml 처리군에서는 치근활택술군 보다 세포가 더욱 신장되어 방추형에 가까운 세포 양상을 보였으며 인접세포와 연결되어 있었고 핵은 거의 인지할 수 없을 정도로 편평화되어 있었다 (Fig. 8, 9, 10 참조).

#### IV. 고 찰

치주질환은 염증, 치주낭 형성, 치조골의 파괴 및 섬유성 부착의 소실이 특징인 질환으로 치주치료의 목적은 치주질환의 원인을 제거하고 진행을 중지시키며 소실된 치주조직을 재생시켜 신생결합조직에 의한 신부착을 얻고 나아가서는 치주질환의 재발을 막고자 하는데 있다. 이러한 섬유성 부착을 재생하기 위해서는 치주인대에서 유래하는 섬유아세포가 치근면에 긴밀하게 부착되어야 하고 정상적인 치주인대를 구성할 교원질과 다른 결체조직물질을 만들어야 한다<sup>13)</sup>.

치근면으로부터 세포부착을 저해하는 피사된 백악질, 치태, 치석 등을 제거하고 섬유성 재 부착에 의한 조직 재생을 유도하기 위해 치근 활택술을 시행한 후 주사전자현미경으로 관찰한 결과 완전한 백악질의 제거가 불가능함이 보고되었고<sup>14)</sup>, 그람음성균이 특히 증가하는 치주 질환에서 이들 세균이 가지는 염증 유발인자인 내독소에 의한 치근면 오염 또한 완전히 제거하지 못함이 보고되었으며<sup>5)</sup> 섬유아세포의 존재 여부 보다 세균성 치태에 노출된 치근면내로 흡수된 내독소 등이 기계적 제거후에도 잔존하기 때문에 이것이 더 직접적으로 결체조직성 신부착에 영향을 미친다고 보고되고 있다<sup>31)</sup>. 그리고 활택된 치근면에서는 도말층에 의해 섬유성 부착이 저해됨이 보고되고 있다<sup>35)</sup>.

치주조직의 재생을 위해서는 치주인대세포가 치은상피세포보다 먼저 치주질환에 이환된 치

근면에 이주하여 부착과 전개가 일어나야만 한다<sup>7,20,29)</sup>. 그러나 통상적인 치주치료만으로는 긴 접합상피에 의해 치유되므로<sup>37)</sup> 결합조직에 의한 신부착은 방해되어 완전한 조직의 재생은 얻기 힘들게 된다. 치근면의 병적 변화 및 치은상피세포의 빠른 하방성장으로 인해서 결합조직의 부착을 방해할 수 있으므로 완전한 신부착을 위해서는 내독소 제거와 상아세관 및 교원질의 노출 그리고 치주질환 이환부로 치주인대세포가 먼저 이주, 증식할 수 있도록 해야하고 이를 목적으로 사용되는 처치방법 중의 하나로 치근면의 상태를 화학적으로 변화시키는 것이 필요하게 되었다<sup>31)</sup>.

치근면을 화학적으로 처리시 나타나는 효과로 탈회된 치근면에는 비탈회치근면 보다 부착세포수가 증가되는데<sup>9,19)</sup> 이는 탈회로 도말층이 제거되고 상아세관 및 상아질의 Type - I collagen이 노출되고 이 노출된 교원질이 섬유아세포의 화학주성인자로 작용하고<sup>34)</sup>, 노출된 교원질과 fibronectin이 결합하여 fibrin linkage를 형성하게 되는데 이는 결합조직에 의한 결합보다 앞서서 일어나게 된다<sup>32)</sup>. Fibrin linkage는 상피세포의 하방성장을 억제시키며 섬유아세포의 이동은 촉진시킨다고 한다<sup>10,11,34)</sup>. 그러므로 치근면 탈회후 교원질의 노출은 결합조직의 회복과 재생에 필수적인 세포인 치주인대세포의 화학주성, 이동 및 부착을 증가시킬 수 있다고 한다<sup>30,38-40)</sup>.

Labahn등<sup>23)</sup>이 치근면을 산으로 처리시 적용 방법에 따른 탈회효과에는 별차이가 없음을 보고한 것을 근거로 본 실험에서는 세포증식을 측정과 주사전자현미경 관찰시 치근절편 처리 방법으로 5분간 테트라사이클린 수용액에 침수시켜 사용하였다.

본 실험에서는 치주질환에 이환된 치근면에서 치근활택술만 시행한 군과 치근활택술 후 테트라사이클린을 25mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml, 100mg/ml, 150mg/ml의 농도로 처리한 군간에 치주인대세포의 증식률을 비교한 결과, 24, 48, 72시간 공히 치근활택술군, 테트라사이클린 25mg/ml, 150mg/ml, 50mg/ml, 75 mg/ml, 100mg/ml의 순으로 세포수가 증가함을

보였다. 이는 정과 정<sup>4)</sup>에 의한 테트라사이클린의 농도가 25mg/ml에서는 pH가 2.45를, 100 mg/ml에서는 pH가 1.82를 보였다는 보고를 근거로 해볼 때, 테트라사이클린의 농도 증가에 따라 수용액의 pH가 점점 낮아져 치근면 탈회 효과가 더욱 증가되어 도말층이 제거되고 상아세관 및 교원섬유가 노출되어 치주인대세포의 부착과 증식이 증가하였다고 사료된다.

Terranova등<sup>38)</sup>에서는 테트라사이클린으로 치면탈회후 치주인대세포의 부착과 증식을 더 좋게하고 양성화학주성인자로 작용하는 fibronectin을 처리하여 부착세포수를 측정한 결과 테트라사이클린의 농도가 50mg/ml까지는 부착된 세포수가 크게 증가하였고 테트라사이클린 50~200mg/ml 사이에는 완만하게 증가함을 보였으나, 본 실험에서는 테트라사이클린 100 mg/ml까지는 부착세포수가 증가하나 150mg/ml에서는 25mg/ml 처리군 정도의 부착세포수를 보였다. 그리고 Somerman등<sup>39)</sup>이 미노사이클린을 세포배양시 직접 배양액내에 포함시킨 실험에서는 50 $\mu$ g/ml 이상의 농도에서 세포부착을 직접적으로 증진시키나, 100 $\mu$ g/ml 이상에서는 세포의 부착과 전개를 억제하여 결과적으로 결합조직에 의한 부착을 방해할 수 있다고 보고하였고 Tsukuda와 Gabler<sup>40)</sup>에 의한 보고에서는 독시사이클린 25 $\mu$ g/ml 이상에서 부착세포수가 감소하고 50 $\mu$ g/ml 이상에서는 억제자체의 세포독성이 있을 수 있고 기질에서의 부착과 전개를 억제시킬 수 있다고 제안하였다. 한편 정과 정<sup>4)</sup>에 의하면 테트라사이클린 50mg/ml와 100mg/ml 수용액에 5분간 침수시킨 후 유리되는 테트라사이클린양을 측정한 결과 72시간 동안 총 유리되는 테트라사이클린의 양은 테트라사이클린 50mg/ml 처리군에서는 약 131 $\mu$ g/ml, 테트라사이클린 100 mg/ml 처리군에서는 약 141 $\mu$ g/ml가 유리된다고 보고하였다. 이들 결과와 비교시 본 실험에서는 테트라사이클린 150mg/ml 처리군에서 치근면에 흡착되었다가 유리되는 테트라사이클린양이 테트라사이클린 100mg/ml 처리군보다 조금 더 많을 것으로 추측되고, 이 증가된 테트라사이클린 유리량이 세포의 증식을 억제하

였으리라 생각된다.

Rajaraman등<sup>35)</sup>은 주사전자현미경을 이용한 세포의 부착과 전개에 대한 형태학적 연구에서 세포가 기질에 접촉점을 이루며 부착한 단계, 세사상돌기가 원심성으로 성장하는 단계, 세포질의 막양구조 형성 단계 그리고 세포 중심부의 편평화 단계 등으로 세포의 부착과 전개 과정을 4단계로 구분하였다. Erickson과 Trinkaus<sup>12)</sup>는 많은 주름, 소기포, 미세용모로 덮힌 둥근 구형의 세포가 편평한 상태로 전개시에 이들 돌출부가 사라지면서 세포 가장자리부터 편평화가 일어난다고 하였다. 이등<sup>3)</sup>은 치주인대세포의 부착과 전개의 형태학적 관찰에서 세포부착 직후에는 세포표면에 수많은 소기포와 미세용모가 관찰되었고 시간이 경과함에 따라 방사형으로 확장되고 변연부에서부터 중심부로 점점 소기포와 미세용모가 사라지고 세포질이 편평화됨을 보고하였다.

세포부착후 주사전자현미경 관찰에서는 치근활택술과 세포증식률이 가장 높은 테트라사이클린 100mg/ml 처리군과 테트라사이클린 처리군 중에서 중간 정도의 세포증식률을 보인 테트라사이클린 50mg/ml 처리군을 실험군으로 하여 서로 비교하였다.

세포배양 30분 후의 주사전자현미경 관찰에서는 치근활택술에서는 세포외형이 전반적으로 구형을 보이고 대부분의 세포표면은 소기포로 덮혀 있었으며 이는 Rajaramane등의 보고에 의하면 세포가 기질에 부착을 시작한 단계에 해당한다. 테트라사이클린 처리군에서는 세포질이 방사형으로 약간 확장되고 중간부는 소기포로 덮히고 둥글게 보였는데 이는 세포질의 막양구조 형성단계라 볼 수 있다. 세포수에 있어서도 치근면을 화학적으로 처리한 후 섬유아세포의 부착에 대한 비교 실험에서 Terranova등<sup>38)</sup>은 세포부착 개시 30분 후에 테트라사이클린 100mg/ml로 처리한 군이 구연산 처리군 보다 3배, 대조군 보다 7배 더많은 부착세포수를 보였다고 보고했으며, 이를 근거로 하여 주사전자현미경으로 관찰한 본 실험에서도 테트라사이클린 처리군이 치근활택술보다 많은 세포수를 보였다고 추측할 수 있다.

세포배양 6시간 후의 주사전자현미경 관찰에서는 치근활택술 군의 경우는 막양구조 형성단계와 유사하고 테트라사이클린 처리군에서는 세포중심부의 편평화 단계와 유사하게 나타났다. 이들 관찰 결과에 의하면 테트라사이클린 처리군이 치근활택술 보다 초기의 세포 부착과 전개 양상이 다소 빠르게 진행됨을 알 수 있었고, 테트라사이클린 50mg/ml와 100 mg/ml 사이에는 거의 유사함을 보였다.

24시간 동안 관찰한 본 실험의 세포 양상은 초기에는 둥근 형태를 보이면서 부착돌기에 의해 치근면에 부착하고, 세포질이 방사형으로 확장되면서 세포의 변연일부가 점점 함몰되고 극성을 띠며 편평화되어 나타났다. 이는 Rajaraman<sup>35)</sup>, Erickson과 Trinkaus<sup>32)</sup>, 이등<sup>3)</sup>이 보고한 세포단계와 유사하게 나타났다.

김과 정<sup>1)</sup>에 의하면 테트라사이클린 50mg/ml 이상의 농도에서 전반적인 교원섬유 노출과 상아세관의 노출이 나타났다고 보고하였다. 본 실험에서도 테트라사이클린 처리군에서는 약제산도에 의해 치근면의 탈회로 인하여 도말층이 제거되고 상아세관의 노출을 관찰할 수 있었으며 테트라사이클린 100mg/ml에서 테트라사이클린 50mg/ml보다 더 많은 상아세관을 관찰할 수 있었다. 테트라사이클린 처리로 상아세관과 교원섬유의 노출, 상아세관의 확장, 내독소 등의 제거에 의해서 치근활택술보다 테트라사이클린 처리군에서 치주인대세포가 더욱 양호한 부착을 보였다고 추정할 수 있다.

이상의 연구 결과, 치주인대세포의 전개는 치근면을 테트라사이클린으로 처리시 테트라사이클린 100mg/ml 처리군이 50mg/ml 처리군 보다 초기에는 약간 더 진전된 양상을 보였으나 시간이 경과함에 따라 거의 유사하게 나타났으며, 치근활택술 보다는 세포의 부착과 전개 과정이 우수하게 진행되었고, 세포증식률에서는 테트라사이클린 100mg/ml 처리군이 가장 많은 세포수를 보였으므로 임상적용시에 테트라사이클린 100mg/ml가 적절할 것으로 사료된다. 그리고 테트라사이클린의 농도가 증가함에 따라 부착세포수도 증가하나 150mg/ml에서 25mg/ml 정도의 세포증식률을 보이면서

감소하는 경향을 보였으므로 테트라사이클린을 치근면에 국소처리시 세포독성을 보일 수 있는 농도를 알아보기 위한 부가적인 연구가 더 필요하다 하겠다.

## V. 요약

치근활택술만 시행한 군과 치근활택술후 테트라사이클린 25, 50, 75, 100, 150mg/ml 농도로 5분간 처리한 군 사이에 치근면에서의 치주인대세포에 대한 증식 및 전개에 미치는 효과를 비교하기 위해 심한 치주질환으로 이환된 치아를 발치하여 철저한 치근활택술을 시행한 후 치주질환에 이환된 치근면만을 이용하여 치근절편을 제작하였다. 5분간 절편을 각 농도별로 침수시킨 후 세포증식률을 알아보기 위해 각 절편을 24 well 조직배양기에 넣고  $1 \times 10^5$ 개의 치주인대세포를 가진 배양액 1ml 씩을 넣어 6시간동안 배양 후, 새로운 배양기에 옮기고 24, 48, 72시간동안 배양하여 0.05% trypsin/0.02% EDTA로 처리하고 세포를 분리하여 광학위상차현미경을 이용하여 세포수를 측정하고 단위치근면적당 세포수를 계산하였다.

세포증식률의 실험에서는 24, 48, 72시간 모두에서 치근활택술군, 테트라사이클린 25, 150, 50, 75, 100mg/ml 처리군 순으로 세포수가 증가함을 보였으며 각 군 모두에서도 시간경과에 따라 부착세포수도 증가하는 경향을 보였다. 24시간에서는 치근활택술군과 테트라사이클린 75mg/ml, 100mg/ml 처리군 사이, 48시간에서는 치근활택술군과 테트라사이클린 100mg/ml 처리군 사이, 72시간에서는 치근활택술군과 테트라사이클린 50, 75, 100mg/ml와 테트라사이클린 25mg/ml와 100mg/ml 사이에 통계학적으로 유의성을 보였다( $p < 0.05$ ).

전반적으로 치근활택술군보다 테트라사이클린으로 처리한 치근면 특히 농도 100mg/ml 처리군에서 좋은 세포증식률을 보였으며 150 mg/ml에서는 100mg/ml 처리군에 비해 세포증식률이 감소하는 경향을 보였다.

주사전자현미경 관찰에서는 세포배양 30분

후에는 치근활택술군에서는 세포외형이 전반적으로 구형을 보이면서 부착된 양상을 보였고 테트라사이클린 처리군에서는 세포질이 방사형으로 약간 확장되고 중간부는 소기포로 덮히고 등글게 보였다. 세포수에 있어서도 테트라사이클린 처리군이 더 많이 부착되어 있는 양상을 나타내었고 상아세관의 노출도 관찰할 수 있었다. 세포배양 6시간이 경과한 후 세포는 치근활택술군에서는 세포질이 방사형으로 확장되어 보이고, 테트라사이클린 처리군에서는 세포의 변연일부가 함몰되어 극성을 나타내기 시작했다. 세포배양 24시간이 경과한 후 치근활택술군에서는 세포가 뚜렷한 극성을 보이고 테트라사이클린 처리군에서는 조금 더 신장된 방추형을 보였다.

이상의 연구 결과, 치주인대세포의 전개는 치근면을 테트라사이클린으로 처리시 테트라사이클린 100mg/ml 처리군이 50mg/ml 처리군보다 초기에는 약간 더 진전된 양상을 보였으나 시간이 경과함에 따라 거의 유사하게 나타났으며, 치근활택술군보다는 우수하게 진행되었고, 세포증식률에서는 테트라사이클린 100mg/ml 처리군이 가장 많은 세포수를 보였으므로 임상적용시에는 테트라사이클린 100mg/ml가 적절할 것으로 사료된다.

### 참고문헌

1. 김기병, 정현주 : Tetracycline - HCl이 치근면에 미치는 효과에 관한 연구, 대한치주과학회지, 18 : 113-119, 1988.
2. 서조영, 최제용, 유현모, 박준봉, 조준승 : 치주인대세포와 치은섬유아세포의 성장에 관한 비교, 대한구강생물학회지, 15 : 14-28, 1991.
3. 이진미, 서조영, 박준봉 : 치주인대세포의 부착과 전개에 관한 형태학적 관찰, 대한치주과학회지, 23 : 97-108, 1993.
4. 정은희, 정현주 : 치근면에 도포한 Tetracycline의 유리양상에 관한 연구, 대한치주과학회지, 19 : 116-124, 1989.
5. Aleo, J. J., De Renzid, F. A., Farber, P. A. and Varboncoeur, A. P. : The presence and biologic activity of cementum - bound endotoxin, J. Periodontol., 45 : 672-675, 1974.
6. Alger, F. A., Solt, C. W., Vuddhakanok, S. and Miles, K. : The histologic evaluation of new attachment in periodontally diseased human roots treated with tetracycline - hydrochloride and fibronectin, J. Periodontol., 61 : 447-455, 1990.
7. Aukhil, I., Simpson, D. M. and Schaberg, T. V. : An experimental study of new attachment procedure in beagle dogs, J. Periodont. Res., 18 : 643-654, 1983.
8. Baker, P. J., Evans, R. T., Coburn, R. A. and Genco, R. J. : Tetracycline and its derivatives strongly bind to and are released from the tooth surface in active form, J. Periodontol., 54 : 580-585, 1983.
9. Boyko, G. A., Brunette, D. M. and Melcher, A. H. : Cell attachment to demineralized root surfaces in vitro, J. Periodont. Res., 15 : 297-303, 1980.
10. Caffesse, R. G., Smith, B. A., Nasjleti, C. E. and Lopatin, D. E. : Cell proliferation after flap surgery, root conditioning and fibronectin application, J. Periodontol., 58 : 661-666, 1987.
11. Caton, J. G., Polson, A. M., Pini Prato, G., Bartolucci, E. G. and Clauser, C. : Healing after application of tissue - adhesive material to denuded and citric acid - treated root surfaces, J. Periodontol., 57 : 385-390, 1986.
12. Erickson, C. A. and Trinkaus, J. P. : Microvilli and blebs as sources of reserve surface membrane during cell spreading, Exp. Cell Res., 99 : 375-384, 1976.
13. Fernyhough, W. and Page, R. C. : Attachment, growth and synthesis by human gingival fibroblasts on demineralized or fibronectin - treated normal and demine-



- ralized tooth roots, *J. Periodontol.*, 54 : 133–140, 1983.
14. Garnick, J.J. and Dent, J. : A scanning electron micrographical study of root surfaces and subgingival bacteria after hand and ultrasonic instrumentation, *J. Periodontol.*, 60 : 441–447, 1989.
  15. Golub, L. M., Ciancio, S., Ramamurthy, N. S. and McNamara, T. F. : Low - dose doxycycline therapy : Effect on gingival and crevicular fluid collagenase activity in humans, *J. Periodont. Res.*, 25 : 321–330, 1990.
  16. Golub, L. M., Lee, H. M., Lehrer, G., Nemiroff, A., McNamara, T. F., Kaplan, R. and Ramamurthy, N. S. : Minocycline reduces gingival collagenolytic activity during diabetes, Preliminary observation and a proposed new mechanism of action, *J. Periodont. Res.*, 18 : 516–526, 1983.
  17. Gomes, B. C., Golub, L. M. and Ramamurthy, N. S. : Tetracycline inhibit parathyroid hormone - induced bone resorption in organ culture, *Experientia*, 40 : 1273–1275, 1984.
  18. Gordon, J. M., Walker, C. B., Murphy, J. C., Goodson, J. M. and Socransky, S. S. : Concentration of tetracycline in human gingival fluid after single doses, *J. Clin. Periodontol.*, 8 : 117, 1981.
  19. Hanes, P. J., Polson, A. M. and Frederick, G. T. : Initial wound healing attachments to demineralized dentin, *J. Periodontol.*, 59 : 176–183, 1988.
  20. Isidor, F., Karring, T., Nyman, S. and Lindhe, J. : The significance of coronal growth of periodontal ligament tissue for new attachment formation, *J. Clin. Periodontol.*, 13 : 145–150, 1986.
  21. Karring, T., Nyman, S. and Lindhe, J. : Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue, *J. Clin. Periodontol.*, 7 : 96–105, 1980.
  22. Klebe, R. J. : Isolation of a collagen - dependent cell attachment factor, *Nature*, 250 : 248–251, 1974.
  23. Labahn, R., Fahrenbach, W. H., Clark, S. M., Lie T. and Adams, D. F. : Root dentin morphology after different modes of citric acid and tetracycline hydrochloride conditioning, *J. Periodontol.*, 63 : 303–309, 1992.
  24. Lafferty, T. A., Gher, M. E. and Gray, J. L. : Comparative SEM study on the effect of acid etching with tetracycline HCl or citric acid on instrumented periodontally - involved human root surfaces, *J. Periodontol.*, 64 : 689–693, 1993.
  25. Lindhe, J., Liljenberg, B. and Adielsson, B. : Effect of long - term tetracycline therapy on human periodontal disease, *J. Clin. Periodontol.*, 10 : 590–601, 1983.
  26. Melcher, A. H. : On the repair potential of periodontal tissues, *J. Periodontol.*, 47 : 256–260, 1976.
  27. Nyman, S., Gottlow, J., Karring, T. and Lindhe, J. : The regenerative potential of the periodontal ligament, *J. Clin. Periodontol.*, 9 : 257–265, 1982.
  28. Nyman, S., Karring, T., Lindhe, J. and Planten, S. : Healing following implantation of periodontitis - affected roots into gingival connective tissue, *J. Clin. Periodontol.*, 7 : 394–401, 1980.
  29. Nyman, S., Lindhe, J., Karring, T. and Rylander, H. : New attachment following surgical treatment of human periodontal disease, *J. Clin. Periodontol.*, 9 : 290–296, 1982.
  30. Pitaru, S., Gray, A., Aubin, J. E. and Melcher, A. H. : The influence of the morphological and chemical nature of dental surfaces on the migration, attachment and orientation of human gingival fibroblasts

- in vitro, *J. Periodont. Res.*, 19 : 408–418, 1984.
31. Polson, A. M. and Caton, J. : Factors influencing periodontal repair and regeneration, *J. Periodontol.*, 53 : 617–625, 1982.
  32. Polson, A. M. and Proye, M. P. : Fibrin linkage : A precursor for new attachment, *J. Periodontol.*, 54 : 141–147, 1983.
  33. Polson, A. M., Frederick, G. T., Ladenheim, S. and Hanes, P. J. : The production of a root surface smear layer by instrumentation and its removal by citric acid, *J. Periodontol.*, 55 : 443–446, 1984.
  34. Polson, A. M., Ladenheim, S. and Hanes, P. J. : Cell and fiber attachment to demineralized dentin from periodontitis - affected root surfaces, *J. Periodontol.*, 57 : 235–246, 1986.
  35. Rajaraman, R., Rounds, D. E., Yen, S. P. S. and Rembaum, A. : A scanning electron microscope study of cell adhesion and spreading in vitro, *Exp. Cell Res.*, 88 : 327–339, 1974.
  36. Somerman, M. J., Foster, R. A., Progebin, K. and Wynn, R. L. : Effects of minocycline on fibroblast attachment and spreading, *J. Periodont. Res.*, 23 : 154–159, 1988.
  37. Stahl, S. S. : Repair potential of the soft tissue root interface, *J. Periodontol.*, 48 : 545–552, 1977.
  38. Terranova, V. P., Franzetti, L. C., Hic, S., Diflorio, R. M., Lyall, R. M., Wikesjö, U. M. E., Baker, P. J., Christersson, L. A. and Genco, R. J. : A biochemical approach to periodontal regeneration : tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth. *J. Periodont. Res.*, 21 : 330–337, 1986.
  39. Terranova, V. P., Hic, S., Franzetti, L., Lyall, R. M. and Wikesjö, U. M. E. : A biochemical approach to periodontal regeneration, AFSCM : Assay for specific cell migration, *J. Periodontol.*, 58 : 247–257, 1987.
  40. Terranova, V. P. and Martin, G. R. : Molecular factors determining gingival tissue interaction with tooth structure, *J. Periodont. Res.*, 17 : 530–533, 1982.
  41. Sukuda, N. and Gabler, W. L. : The influence of doxycycline on the attachment of fibroblasts to gelatin - coated surfaces and its cytotoxicity, *J. Periodontol.*, 64 : 1219–1224, 1993.
  42. Walker, C. B., Gordon, J. M., McQuikin, S. J., Niebloom, T. A. and Socransky, S. S. : Tetracycline : Levels achievable in gingival crevice fluid and in vitro effect on subgingival organisms, Part II. Susceptibilities of periodontal bacteria, *J. Periodontol.*, 52 : 613–616, 1981.
  43. Wikesjö, U. M. E., Baker, P. J., Christersson, L. A. Genco, R. J. Lyall, R. M., Hic, S., Diflorio, R. M., and Terranova, V. P. : A biochemical approach to periodontal regeneration : tetracycline treatment conditions dentin surfaces, *J. Periodont. Res.*, 21 : 322–329, 1986.
  44. Wirthlin, M. R. : The current status of new attachment therapy, *J. Periodontol.*, 52 : 529–544, 1981.

## EXPLANATION OF FIGURES

- Fig. 2. Root planing only group after 30 minutes of incubation.  
The cells are generally round in shape. The surface is mostly covered with blebs. The cells start to attach to the root surface(Bar - : a, 100 $\mu$ m, b. 10 $\mu$ m).
- Fig. 3. 50mg/ml of Tetracycline - HCl treated group after 30 minutes of incubation.  
Attached cells are more numerous than the root planing only group. This shows many exposed orifice of dentinal tubule. Cells show radially spreaded cytoplasm and unspreaded central region of cell is covered with blebs(Bar - : a, 100 $\mu$ m, b. 10 $\mu$ m).
- Fig. 4. 100mg/ml of Tetracycline - HCl treated group after 30 minutes of incubation.  
The cell morphology are similar to 50mg/ml of Tetracycline - HCl treated group. Cytoplasm is more expanded and flattened than 50mg/ml of Tetracycline - HCl treated group(Bar - : a, 100 $\mu$ m, b. 10 $\mu$ m).
- Fig. 5. Root planing only group after 6 hours of incubation.  
Nucleus of the cell is revealed as elongated shape. Cell shows radially spreaded cytoplasm and is attached flattened appearance(Bar - : a, 100 $\mu$ m, b. 10 $\mu$ m).
- Fig. 6. 50mg/ml of Tetracycline - HCl treated group after 6 hours of incubation.  
Cellular margin is concaved and cytoplasm shows elongated appearance with polarity(Bar - : a, 100 $\mu$ m, b. 10 $\mu$ m).
- Fig. 7. 100mg/ml of Tetracycline - HCl treated group after 6 hours of incubation.  
General morphology of the cell is similar to 50mg/ml of Tetracycline - HCl treated group(Bar - : a, 100 $\mu$ m, b. 10 $\mu$ m).
- Fig. 8. Root planing only group after 24 hours of incubation.  
Cellular margin is concaved and cytoplasm shows elongated appearance with remarkably polarity(Bar - : a, 100 $\mu$ m, b. 10 $\mu$ m).
- Fig. 9. 50gm/ml of Tetracycline - HCl treated group after 24 hours of incubation.  
Cells show more elongated and spindle - like appearance(Bar - : a, 100 $\mu$ m, b. 10 $\mu$ m).
- Fig. 10. 100mg/ml of Tetracycline - HCl treated group after 24 hours of incubation.  
General morphology of the cell is similar to 50mg/ml of Tetracycline - HCl treated group(Bar - : a, 100 $\mu$ m, b. 10 $\mu$ m).

## 사진부도 ①

## 사진부도 ②

사진부도 ③

## THE EFFECTS OF VARIOUS TETRACYCLINE HCL CONCENTRATION TREATED ROOT SURFACES ON PROLIFERATION AND SPREADING OF PERIODONTAL LIGAMENT CELLS \*

Oh Chul Jung, Jo Young Sun

*Department of Periodontology, College of Dentistry, Kyungpook National University*

This in vitro study was undertaken to obtain optimal tetracycline concentration that aids proliferation and spreading of human periodontal ligament cells, for clinical application in root surfaces of periodontally diseased teeth. Periodontal ligament cells used in this study were obtained from explants of periodontal ligament of 1st premolar teeth which were extracted for the purpose of orthodontic treatment. The cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 10% FBS at 37°C, 100% humidity, 5% CO<sub>2</sub>—95% air. Cells were used between the third to 4th passage. After root planing of periodontally extracted teeth, the root slabs were cut with carborundum disk.

In the cell proliferation experiment, experimental groups were root planing only group, immersed groups in 25, 50, 75, 100, 150mg/ml aqueous solution of Tetracycline HCl followed by a vigorous rinse in PBS. Human PDL cells at concentration of  $1 \times 10^5$  cells/ml were seeded in each culture well which contained root slabs and incubated for 6 hours. Then, all of the root slabs were moved into new 24 culture well and incubated 24, 48 and 72 hours. The cell counting was done by inverted phase contrast microscope after trypsinization. The following results were obtained.

The cell number was increased in order root planing only group, 25, 150, 50, 75, 100mg/ml of Tetracycline HCl treated group in 24, 48 and 72 hours. The maximal cell number was obtained when the root slabs were immersed in solution with 100mg/ml of Tetracycline HCl. There were statistically significant between the root planing only group and 75, 100 mg/ml of Tetracycline HCl treated group in 24 hours, between the root planing only group and 100mg/ml of Tetracycline HCl treated group in 48 hours, between the root planing only group and 50, 75, 100mg/ml of Tetracycline HCl treated group, between 25 and 100 mg/ml of Tetracycline HCl treated group in 72 hours ( $p < 0.05$ ).

In the cell spreading experiment, after 30 minutes of incubated, in the root planing only group, the cells were generally round in shape. The cell surface was mostly covered with blebs. The cells started to attach to root surface by cytoplasmic extension in 50, 100mg/ml of Tetracycline HCl treated groups, more numerous cells attached to root surface than root planing only group. Many orifices of dentinal tubule were exposed, cells showed radially spreaded cytoplasm and unspreaded central region of the cell was covered with blebs.

After 6 hours of incubation, in the root planing only group, cells showed radially spreaded cytoplasm and were attached flat appearance. In 50, 100mg/ml of Tetracycline HCl treated groups, cellular margin was concaved and cytoplasm showed elongated appearance with polarity. After 24 hours of incubation, in the root planing group, cells showed characteristic polarity. In 50, 100mg/ml of Tetracycline HCl treated groups, cells showed more elongated and spindle - like appearance.

\* A thesis submitted to the Council of the Graduate School of Kyungpook National University in partial fulfilment of the requirement for the degree of Master in Science in Dentistry in December, 1994.