

치은 섬유아세포에 대한 치주포대 추출물의 세포독성에 관한 연구

경희대학교 치과대학 치주과학교실

양승한 · 이만섭 · 박준봉

1. 서 론

치주질환의 치료중 외과적 시술후 사용되는 치주포대는 수술부위의 보호, 치아의 고정, 치아의 과민성 예방, 환자의 불편감 해소 및 근단면 위판막의 고정, 치은이식편의 고정 등의 목적으로 사용되어 왔다¹⁾.

치주포대는 유지놀의 함유여부에 따라 유지놀계와 비유지놀계로 구분되며 유지놀포대는 zinc oxide, eugenol 및 rosin 등이 주성분으로 zinc oxide와 eugenol이 zinc eugenolate를 만들면서 경화된다²⁾. 이들 성분중 지혈작용을 위해 사용된 탄닌산은 간에, 석면은 폐에 손상을 줄 수 있다는 보고가 있어¹⁾ 성분에서 제외되고 있으며 rosin 및 유지놀에 대한 과민반응이 보고되면서 주의를 요하고 있다^{3,4)}. 또한 유리되어 나온 유지놀은 염증반응을 일으키며 조직괴사와 치유를 지연시킬 수 있다는 점 때문에 유지놀성분이 함유되지 않은 비유지놀포대가 개발소개되었다⁵⁾.

일반적으로 치주포대의 구비조건으로 첫째 세균으로부터의 자극을 방지하기 위해 적절한 유지력과 접착력이 있어야 하며, 둘째 생체에 대한 부작용이나 조직에 대한 독성이 없어야 하며 치주포대의 역할에 부응할 물성을 갖추어야 한다. 즉 경화후 자체결합력으로 고유형태를 유지할 수 있어야 하고 약간의 치아 동요를 감소시킬수 있어야 한다. 또한 최근 치주포대의 효과를 증강시키기 위해 치주포대내에 항생제나 클로르헥시딘 등을 함유시키거나 치주포대의 부착직전 연

조직 상부에 미리 도포하여 사용함으로써 효과적인 세균증식억제를 얻었다는 보고들도 있다^{6, 8)}.

치과에서 사용되는 각종재료와 약제들은 임상에 이용되기까지 시험관적 검사에서부터 생체 실험에 이르기 까지 다단계의 생물학적 평가를 시행한 후 임상에 사용되어야 한다. 따라서 치주포대 역시 단위세포를 이용하여 인체적합성을 검사하는것이 중요하다. 이러한 인체적합성을 판정하는데는 실험실상에서 단위세포에 대한 세포독성검사를 하는 것이 보다 중요하다.

치주포대가 단위세포에 미치는 영향에 대한 실험으로는 1966년 Kreth등⁹⁾이 최초로 Hela cell을 이용한 이후에 백서의 섬유아세포¹⁰⁾, 상피종양세포¹⁾, 상피세포¹¹⁾, 다형핵 백혈구¹²⁾, 토끼의 적혈구¹³⁾, 사람의 섬유아세포^{5,14)}등을 이용하여 세포독성을 측정한 바 있다. 일반적인 세포독성 측정방법으로는 약제의 작용후 생활 세포수를 산정하는 방법, 세포분해후 단백질 측정법, 세포증식시에 방사성 동위원소를 이용하는 방법 등이 있었으나 정확도나 실험과정 중에 복잡성 등의 문제점이 발견되었다. 최근에는 이를 개선한 색의 차이를 이용하여 세포의 수나 활성도를 알 수 있는 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (이하 MTT로 표기)가 많이 이용되고 있다^{15, 16)}.

일정한 용매에 유리된 유지놀계와 비유지놀계의 치주포대 추출물이 단위세포에 미치는 독성에 대해서 지금까지 서로 상반된 결과가 보고되

어 치주포대의 임상적용에 명확한 기준선이 발견되지 않았다. 이에 본인은 치주포대와 직접 접촉하는 치은조직의 주요구성세포인 치은 섬유아세포를 배양하여 유지놀 및 비유지놀계 치주포대로부터의 추출물을 감작하여 이에 의한 세포독성을 MTT법과 ELISA reader 을 이용하여 관찰한 결과 다소의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

1) 치은 섬유아세포

제 3대구치를 예방 목적으로 발치하려고 내원한 환자로부터 건강한 치은조직을 채취하여 200unit/ml penicillin (Gibco, U.S.A.), 200 μ g/ml streptomycin (Gibco, U.S.A.)과 1 μ g/ml amphotericin-B (Gibco, U.S.A.)가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, U.S.A.)으로 5회 세척후 배양접시에 넣고 1 \times 1 \times 1mm의 크기로 세절하였다.

세절된 조각편 10-15개를 35mm 크기의 세포 배양용 접시에 넣은 다음, 10% Fetal bovine serum (FBS, Gibco, U.S.A.)과 100unit/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 0.5 μ g/ml amphotericin-B가 포함된 DMEM을 넣고, 37 $^{\circ}$ C, 100% 습도, 5% CO₂ 공기혼합 배양기(Vision Scientific Co., Korea)에서 배양하였다. 섬유아세포(Human Gingival Fibroblast, 이하 HGF로 표기)가 조직절편으로부터 증식되어 완전히 배양접시를 덮는 단층이 형성된 후에는 100mm세포 배양용 접시를 이용하여 7 - 10일 간격으로

1:3 계대배양을 하였다. 본 실험에서는 확실히 5세대를 사용하였다.

2) 치주포대의 추출물의 준비

대조군으로는 배양액을 이용하였고 실험군으로는 치주임상에서 널리 사용되는 4종의 치주포대를 이용하였고 Table 1과 같이 분류하였다.

이들 중 K. H. pack과 Wondrpak이 유지놀포대이고 Coe-pak과 Periocare는 비유지놀포대였다. 치주포대는 각 제작회사의 지시대로 혼합한 후 직경 15mm, 높이 7mm의 원통형 모양으로 만들어 용기에 넣은 다음, 10% FBS가 포함된 DMEM 25ml를 넣고 37 $^{\circ}$ C의 항온조에서 24시간 방치한 다음 소독을 위하여 원액을 0.22 μ m 크기의 소공여과막 (Nalge Co., U.S.A.)에 통과시킨 후 2배, 5배, 10배 희석하여 50%, 20%, 10% 농도로 만든 후 냉장실에 보관하였다.

2. 연구방법

1) 세포수 산정

24 well 배양접시에 3 \times 10⁴개의 HGF를 가진 배양액 0.5ml를 넣은 후 배양기에서 배양하였다. 배양 24시간후 세포가 배양접시 바닥에 완전히 부착된 상태를 확인한 후 상층액을 제거하고 실험군에서는 각 군에서의 시간과 농도에 따른 조건당 2 well의 배양접시에 준비된 추출액의 원액, 2배, 5배 및 10배 희석된 배양액을 각각 0.5ml씩 재주입하였으며, 대조군에서는 각 군의 시간당 2 well의 배양접시에 0.5 ml의 순수배양액만 재주입하여 동일조건하에서 배양하였다.

배양 24, 48, 72시간 후 배양접시에 상층액을 제거한 다음 0.05% trypsin 0.2ml로 세척하고 0.2ml를 재주입후 5분간 방치한 다음 순수배양

Table 1. Experimental material

K group	K.H. pack
W group	Wondrpak (Regular type, Westward Dental Product Co., U.S.A.)
C group	Coe-pak (Regular type, Coe Lab. Inc., U.S.A.)
P group	Periocare (Pulpdent Co., U.S.A.)

액 0.8ml를 재주입하여 hemocytometer에 1적 흡수시켜 현미경하에서 세포수를 측정하였다. 각 치주포대간의 시간과 농도에 따른 세포수의 차이를 대조군과 서로 비교시 다음과 같은 상대성장률을 이용하였다.

$$\text{상대성장률} = \frac{\text{각 실험군의 시간과 농도에 따른 세포수}}{\text{각 대조군의 시간에 따른 세포수}} \times 100 (\%)$$

(Relative Growth Rate)

2) MTT

96 well 배양접시에 2×10^4 개의 HGF를 가진 배양액 0.2ml를 넣은후 24시간 배양하고 세포가 배양접시 바닥에 완전히 부착된 상태를 확인 후 다음 상층액을 제거하고 well당 실험용 용액을 각 농도당 0.2ml를 3개씩 첨가후 배양기에서 48시간을 배양하고 생리식염수에 용해된 MTT 용액 (Sigma Co., U.S.A.) 50 μ l를 넣었다. 다시 4 시간동안 배양한 후 상층액 모두를 제거하고 formazan결정을 용해시키기 위하여 DMSO (Dimethyl sulfoxide, Sigma Co., U.S.A)를 50 μ l씩 첨가하였다. plate를 잘 흔든 후 ELISA reader (Bio-tek Instruments, Inc., Model EL312e)로 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 위의 실험을 3회 반복실행하여 평균치를 구하여 다음과 같이 생존율을 계산하였다.

$$\text{생존율} = \frac{\text{실험군의 흡광도} - \text{negative 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도} - \text{negative 흡광도}} \times 100 (\%)$$

* negative 흡광도 : K.H. pack 원액을 사용한 경우의 흡광도

III. 연구성적

1. 세포수 산정에 의한 세포독성 비교

24시간 배양후 원액을 비교해 보면 K군이 $0.50 \pm 0.73 (\times 10^4 \text{ cells/ml} : \text{이하생략})$, W군이 1.13 ± 0.81 , C군이 1.38 ± 0.89 , P군이 3.13 ± 1.26 으로써 대조군의 3.94 ± 1.48 과 Kawahara의 세포독성지수(Table 2)¹⁹⁾로 비교하면 P군을 제외한 모든 치주포대에서 강한 독성을 보였다. 2

배 희석한 경우에는 K군이 1.25 ± 1.24 , W군이 2.63 ± 1.15 , C군이 3.13 ± 1.09 , P군이 3.50 ± 1.15 로써 대조군에 비해 원액보다 독성이 다소 감소되었다. 5배 희석한 경우에는 K군이 1.38 ± 0.89 로 강한 독성을 나타낸 반면, W군이 2.88 ± 1.09 로 중등도의 독성을, C군이 3.63 ± 1.20 , P군이 3.56 ± 1.09 로 약한 독성을 나타내었다. 10배 희석한 경우에는 K군이 3.50 ± 1.63 , W군이 3.38 ± 2.19 , C군이 3.69 ± 1.54 , P군이 3.75 ± 1.13 으로 전반적으로 약한 독성을 보였다.(Table 3, Fig. 1).

48시간 배양후 비교해보면 원액일 경우 K군이 0.13 ± 0.34 , W군이 0.81 ± 0.91 , C군이 $0.75 \pm$

Table 2. Cytotoxic scores based on relative growth rate(RGR).

RGR (%)	Classification
100	None
75 - 99	Weak
50 - 74	Moderate
25 - 49	Marked
1 - 24	Strong
0	Extreme

$$* \text{RGR} = \frac{\text{Mean number of fibroblasts in sample}}{\text{Mean number of fibroblasts in control}} \times 100 (\%)$$

0.86으로 대조군의 5.31 ± 1.25 보다 강한 독성을 보인 반면 P군이 4.50 ± 2.37 로 약한 독성을 나타내었다. 2배 희석액일 경우 K군이 0.38 ± 0.50 으로 강한 독성을 보였고, W군이 4.50 ± 1.37 , C군이 5.13 ± 1.36 , P군이 5.18 ± 1.72 로 약한 독성을 보였다. 5배 희석액일 경우 K군이 0.88 ± 0.62 로 강한 독성을 보인 반면, W군이 5.19 ± 1.38 , C군이 5.25 ± 1.69 , P군이 5.25 ± 1.91 로 약한 독성을 나타내었다. 10배 희석액일 경우 K군이 4.69 ± 1.62 , W군이 5.13 ± 1.40 , C군이 5.25 ± 1.23 , P군이 5.31 ± 1.62 로 약한 독성을 나타내었다(Table 3, Fig. 2).

72시간 배양후에는 원액일 경우 K군에서는 세포가 발견되지 않았고, W군이 0.75 ± 0.68 , C군

Table 3. The mean number and RGR of HGF exposed to certain dilutions of soluble extracts from four periodontal dressings (Mean \pm S.D.(X 10⁴cells/ml))

Group	Concentration(%)	Time			
		Start	24 hours (RGR(%))	48 hours (RGR(%))	72 hours (RGR(%))
Control		3.00	3.94 \pm 1.48	5.31 \pm 1.25	6.93 \pm 1.77
K	100%	3.00	0.50 \pm 0.73(12.7)	0.13 \pm 0.34(2.4)	0.00 \pm 0.00(0.0)
	50%	3.00	1.25 \pm 1.24(31.7)	0.38 \pm 0.50(7.2)	0.13 \pm 0.34(1.9)
	20%	3.00	1.38 \pm 0.89(35.0)	0.88 \pm 0.62(16.6)	0.43 \pm 0.51(6.2)
	10%	3.00	3.50 \pm 1.63(88.9)	4.69 \pm 1.62(88.3)	5.88 \pm 1.54(84.8)
W	100%	3.00	1.13 \pm 0.81(28.7)	0.81 \pm 0.91(15.3)	0.75 \pm 0.68(10.8)
	50%	3.00	2.63 \pm 1.15(66.8)	4.50 \pm 1.37(84.7)	4.63 \pm 1.29(66.8)
	20%	3.00	2.88 \pm 1.09(73.1)	5.19 \pm 1.38(97.7)	6.25 \pm 1.98(90.2)
	10%	3.00	3.38 \pm 2.19(85.8)	5.13 \pm 1.40(96.6)	6.75 \pm 2.05(97.4)
C	100%	3.00	1.38 \pm 0.89(35.0)	0.75 \pm 0.86(14.1)	0.63 \pm 1.02(9.1)
	50%	3.00	3.13 \pm 1.09(79.4)	5.13 \pm 1.36(96.6)	5.88 \pm 2.16(84.8)
	20%	3.00	3.63 \pm 1.20(92.1)	5.25 \pm 1.69(98.9)	6.25 \pm 1.61(90.2)
	10%	3.00	3.69 \pm 1.54(93.7)	5.25 \pm 1.23(98.9)	6.63 \pm 1.15(95.7)
P	100%	3.00	3.13 \pm 1.26(79.4)	4.50 \pm 2.37(84.7)	5.50 \pm 1.71(79.4)
	50%	3.00	3.50 \pm 1.15(88.8)	5.18 \pm 1.72(97.6)	6.38 \pm 1.50(92.1)
	20%	3.00	3.56 \pm 1.09(90.4)	5.25 \pm 1.91(98.8)	6.94 \pm 1.48(100)
	10%	3.00	3.75 \pm 1.13(95.2)	5.31 \pm 1.62(100)	6.88 \pm 1.96(99.3)

K: K.H.pak W: Wondrpak C: Coe-pak P: Periocare

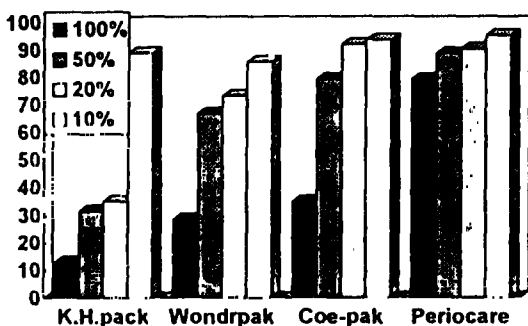


Fig. 1. The RGR of HGF effected by four periodontal dressings after 24 hours of incubation.

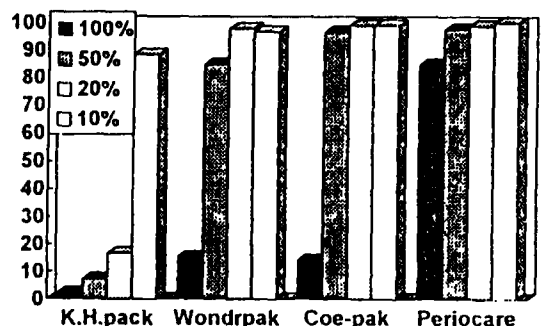


Fig. 2. The RGR of HGF effected by four periodontal dressings after 48 hours of incubation.

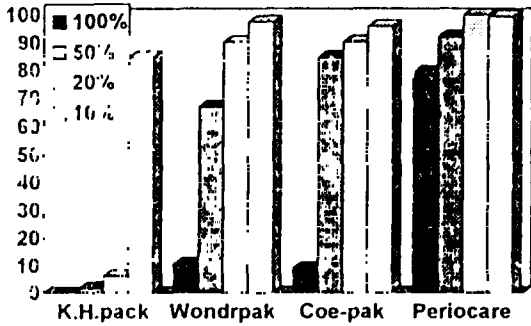


Fig. 3. The RGR of HGF effected by four periodontal dressings after 72 hours of incubation.

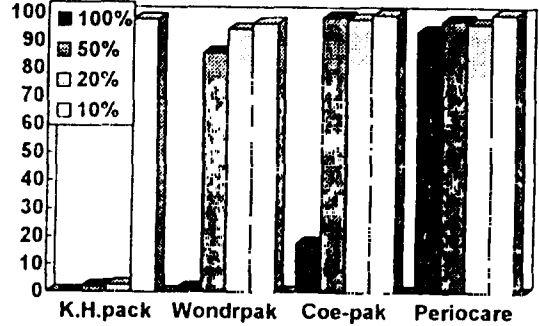


Fig. 4. Survival rate of HGF effected by four periodontal dressings (Colorimetric MTT assay).

Table 4. Cytotoxicity measurement by colorimetric MTT assay

Group	Concentration(%)	Absorbance	Survival rate(%)*
Control		0.484	100.0
K	100%	0.049	0.0
	50%	0.058	2.1
	20%	0.061	2.5
	10%	0.474	97.7
W	100%	0.056	1.6
	50%	0.422	85.8
	20%	0.459	94.3
	10%	0.468	96.3
C	100%	0.126	17.7
	50%	0.478	98.6
	20%	0.474	97.7
	10%	0.481	99.3
P	100%	0.456	93.6
	50%	0.472	97.2
	20%	0.468	96.3
	10%	0.482	99.5

$$* \text{Survival rate (\%)} = \frac{\text{sample absorbance} - \text{negative absorbance}}{\text{control absorbance} - \text{negative absorbance}} \times 100 (\%)$$

negative absorbance : absorbance of 100% K.H.pack

이 0.63 ± 1.02로 강한 독성을, P군이 5.50 ± 1.71로 약한 독성을 나타내었다. 2배 희석액과 5배 희석액일 경우에 각각 K군이 0.13 ± 0.34와

0.43 ± 0.51로 강한 독성을 보였고, W군이 2배 희석액에서 4.63 ± 1.29로 중등도의 독성을 5배 희석액에서 6.25 ± 1.61로 약한 독성을 보였으

며, C군이 5.88 ± 2.16 과 6.25 ± 1.61 , P군이 6.38 ± 1.50 과 6.94 ± 1.48 로 약한 독성을 나타내었다. 10배 희석액일 경우에는 K군이 5.88 ± 1.54 , W군이 6.75 ± 2.05 , C군이 6.63 ± 1.15 , P군이 6.88 ± 1.96 으로 대조군의 6.93 ± 1.77 과 비교시 거의 독성이 없었다(Table 3, Fig. 3).

2. MTT에 의한 세포독성비교

대조군에 대한 흡광도 차이에 따른 생존율을 비교해보면 K군은 원액, 2배, 5배, 10배 희석액에서 각각 0, 2.1, 2.5, 97.7%로 원액, 2배 희석액, 5배 희석액에서 강한 독성을 보였고 W군은 각각 농도에 따라 1.6, 85.8, 94.3, 96.3%로 원액에서만 강한 독성을 보였다. C군인 경우에는 농도에 따라 각각 생존율이 17.7, 98.6, 97.7, 99.3%로 원액에서만 Wondrpak보다 작지만 큰 독성을 나타내었다. P군인 경우 농도에 따라 각각 생존율이 93.6, 97.2, 96.3, 99.5%로 모든 농도에서 거의 독성을 보이지 않았다(Table 4, Fig. 4).

위의 두 실험방법에 따른 결과를 비교해보면 비슷하게 나타났으며 K.H.pak, Wondrpak, Coe-pak, Periocare의 순으로 독성이 낮게 나타났고 독성이 강한 경우에는 세포수가 줄어들었고, 독성이 거의 없는 경우에는 대조군과 마찬가지로 세포수가 증가하였다.

IV. 총괄 및 고찰

치주수술 후 창상부위에 치주포대를 부착하는 목적으로는 수술후 출혈방지, 동통의 감소, 불편감 해소, 동요치의 고정, 치주낭 재형성 방지, 노출된 상아질의 과민반응 감소, 이식술인 경우 치은 이식편의 고정 및 치주판막의 고유위치 유지 등이 있으며 이는 궁극적으로 치주포대가 창상을 보호하여 조직치유의 보조역할을 담당하게 된다^{1,20}). 이들 목적을 달성하기 위해서 치주포대는 조직에 대한 위해성이 없어야 하고 충분한 성형성과 적절한 경화속도를 가져야 하며 경화 후 표면이 매끈하고 부드러워 자극이 없고 치태침착을 방지할 수 있도록 충분한 접착성을 가져야 한다^{21,22}).

이렇게 치과에 사용되는 여러가지의 재료들은 생체와 밀접한 관계를 가지므로 생물학적 평가가 이루어져야 한다²³). 그 중에서도 단위세포에 대한 독성측정이 기본이 되며 치주포대는 주로 구성성분의 차이에 따른 유지놀계와 비유지놀계를 비교하는 연구들이 되어 왔다. 본 연구는 임상에서 널리 쓰이는 치주포대를 세포수 산정과 MTT를 이용해서 상호평가를 하여 임상에 도움이 이 되고자 시행되었다.

세포독성 측정방법에 사용된 MTT는 치과영역의 여러재료의 독성을 평가하는데 있어서 최근에 많이 행해지고 있는 것으로^{16, 18}) MTT 용액 속에 있는 tetrazolium ring이 활성화된 미토콘드리아내에 있는 dehydrogenase와 반응하여 비용해성의 짙은 색 MTT formazan을 형성하게 된다. MTT는 이러한 색의 변화정도를 ELISA reader를 이용하여 감지시켜서 흡광도를 측정하여 살아있는 세포의 수나 활성정도를 알 수 있게 해주는 방법으로서, 다른 세포수 산정이나 방사성 동위원소 등을 이용한 것보다 한번에 많은 양을 정확하고 간단하게 측정할 수 있는 방법이다^{16,24}).

Kreth(1966)등⁹)은 치주포대 추출물에서 Hela cell을 배양하여 실험한 결과 유지놀계보다 비유지놀계 치주포대에서 더 세포성장이 억제된다고 하였으며 Hildebrand와 DeRenzis(1974)¹⁰)는 백서의 섬유아세포를 배양해서 치주포대의 독성을 실험한 결과 8시간후에는 Wondrpak이, 24시간 뒤에는 Coe-pak이 최대독성을 나타냈으며, 비유지놀계통인 PPC가 제일 낮은 독성을 보인다고 보고하였다. Rivera-Hidalgo(1979)등¹²)은 다형핵 백혈구의 실험에서 유지놀계보다 비유지놀계가 더 높은 독성을 나타낸다고 하였으며 Haugen과 Hensten-Pettersen(1978, 1979)^{11,13})이상피세포와 적혈구의 용혈현상을 통해 독성을 실험한 결과 비유지놀계 치주포대가 더 높은 독성을 나타낸다고 보고한 반면, Eber (1989)등¹⁴)과 이(1990)등⁵)이 사람의 치은 섬유아세포를 가지고 실험한 결과에서는 비유지놀계보다 유지놀계가 더 높은 독성을 나타낸다는 상반된 결과를 보고하였다. 이는 실험한 세포종류의 차이가 아니라 실험방법이 다르기 때문으로 생각된다.

한편 In vivo 연구에서 Baer와 Wertheimer (1961)²⁵⁾는 백서의 두개골에 치주포대를 매식시 유지놀계가 더 큰 염증반응이 나타낸다고 하였고 Haugen과 Mjor(1979)²⁶⁾는 백서의 괴하로 골을 노출시키고 치주포대를 매식시 골강(bone lacunae)의 수와 크기가 유지놀계에서 더 크다고 하였으며 Haugen과 Mjor(1978)²⁷⁾, Nezwik (1980)²⁸⁾, Wennberg와 Mjor(1983)²⁹⁾의 치주포대 매식실험에서도 마찬가지로 유지놀계가 더 큰 염증반응을 일으킨다고 보고하였다. 이들의 결과로 미루어 보아 In vivo실험의 결과는 주로 유지놀계 치주포대가 더 크게 조직을 자극하는 것으로 사료된다.

치주포대를 임상적으로 사용한 경우에 대한 연구결과를 살펴보면 Greensmith와 Wade (1974)³⁰⁾는 치주관막수술후 Coe-pak의 사용유무에 따른 치주낭 깊이, 치은지수 등의 임상지수에는 차이가 없었으며 오히려 사용한 경우 더 큰 동통과 부종을 보이고 음식물 섭취에 곤란을 느낀다고 하였으며 Jones과 Cassingham(1979)³¹⁾, Allen과 Caffesse(1983)³²⁾도 치주포대의 사용이 더 환자에게 불편감을 제공하며 이것의 사용보다는 술후에 잘 적합되게 판막을 위치시키는 것이 중요하다고 보고하였다. 또한 Heaney와 Appleton(1976)³³⁾은 치주포대가 치태축적을 용이하게 하여 술후 치유에 방해를 주므로 1주일 이내에 이를 제거해야 한다고 하였다. 반면에 Addy와 Dolby(1976)³⁴⁾는 치은절제술후 치주포대를 사용한 경우 동통이 완화됐다고 보고하면서 클로르헥시딘과 같이 사용하는 것이 더 좋은 결과가 있었다고 했으며, Jorkjend와 Skoglund (1990, 1991)^{34,35)}는 치은절제술후 유지놀이 창상 부위의 동통완화 효과가 있으므로 비유지놀계보다 유지놀계 치주포대의 사용을 권하였고, Checchi와 Trombelli(1993)⁶⁾는 판막수술후 치주포대를 사용하는 것은 임상적 효과보다는 환자의 정신적 안정감을 얻을 수 있기 때문이라고 하였다.

본 실험에서 세포수 산정에 의한 세포독성을 비교해 보면 K.H.pak의 경우 100%, 50%, 20% 농도에서 Wondrpak은 100%농도에서 대조군에 비해 현저한 세포수 감소를 보였고 50%에서 중

등도의 세포감소를 보인 반면, Coe-pak은 100%에서만 세포수 감소를 보였고 Periocare는 모든 농도에서 대조군과 거의 차이를 보이지 않는 것으로 미루어 보아 유지놀계의 치주포대가 비유지놀계보다 세포독성이 더 큰 것을 알 수 있었다.

세포독성을 나타낸 물질은 유지놀포대인 경우는 유지놀이, Coe-pak인 경우에는 lauric acid, fatty acid로 알려져 있고^{11,36)}, Periocare는 알려지지 않았다. K.H.pak과 Wondrpak은 유지놀이 배양초기에 강한 독성을 나타내어 세포수가 급격히 감소된 양상을 보였는데 두 치주포대의 독성이 다른 이유는 유지놀의 함량과 배양액에서의 용해도 차이로 인한 것으로 생각된다. Coe-pak인 경우에는 lauric acid, fatty acid가 유리되어 독성을 미치는 것으로 유추되나 유지놀 보다는 약한 독성을 나타내며 시간이 지남에 따라 세포수를 감소시키는 양상을 보였다.

MTT에 의한 세포독성의 결과도 K.H.pak, Wondrpak, Coe-pak, Periocare순으로 독성이 약하였으며 세포수 산정에 의한 것과 비슷하게 나타났다. 이러한 결과로 미루어 시간이 오래걸리며 과정이 복잡한 세포수 산정에 의한 방법보다는 간단하고 많은 양을 한번에 측정할 수 있는 MTT방법이 효과적이라고 볼 수 있다. 또한 현미경상에서 형태에 의한 세포수 산정보다는 trypan blue같은 약제를 이용하여 살아있는 세포를 확실히 구별하면서 산정하는 것이 좀 더 정확한 결과를 얻을 것으로 생각된다¹¹⁾.

본 실험은 제한된 조건하에서 단위세포를 대상으로 한 실험으로, 실제 구강내와 조건이 많이 다르다. 즉 타액, 혈액, 조직삼출액 등과 혼합되면서 희석되고 숙주내의 면역기능에 의해 평형상태가 유지되므로 위의 실험결과와 동일한 영향을 미친다고 할 수 없으므로 임상적용을 위한 전단계의 과정의 실험이라고 볼 수 있다. 이러한 세포독성의 차이만 가지고 치주포대의 우열을 결정할 수는 없으며 그외에도 물리적 성질, 조작성 등도 함께 고려되어야 할 것이고 치주수술의 종류에 따른 치주포대의 사용이 더 연구되어야 할 뿐만 아니라 앞으로 In vitro실험과 동시에 In vivo실험이 이루어지고 나아가 임상적인 실험을

통해 단순히 수술부위의 보호측면만 아니라 조각이 보다 간편하고 독성이 없으며 치유과정에 도움을 주는 치주포대의 개발이 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

임상에서 널리 쓰이는 치주포대를 세포수 산정과 MTT를 이용해서 독성을 서로 상호평가를 하여 임상에 도움이 되고자 본 실험을 시행하였다. 24 well 배양접시에 치은조직에서 분리한 섬유아세포를 24시간 동안 배양하고 상층액을 제거한 다음 원액, 2배, 5배, 10배로 희석한 치주포대 추출액을 넣은 후 24, 48, 72시간에 세포수를 산정하였다. 그리고 96 well 배양접시에 동일한 방법으로 48시간 동안 배양후 MTT용액을 넣고 4시간뒤 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정하고 생존율을 구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

유지놀 포대인 K.H.pak은 원액, 50%, 20% 농도에서 대조군에 비해 상당히 낮은 생존율을 보인 반면, Wondrpak은 원액에서는 현저하게, 50% 농도에서는 중등도의 세포감소를 나타내어 K.H.pak이 Wondrpak보다 더 높은 세포독성을 나타내었다. 비유지놀 포대인 Coe-pak은 원액에서만 세포감소 나타내었고 Periocare는 모든 농도에서 거의 독성을 나타내지 않으면서 대조군과 비슷한 세포수를 보임으로써 Coe-pak보다 낮은 독성을 보였다. 전체적으로 보면 유지놀 포대인 K.H.pak과 Wondrpak이 비유지놀 포대인 Coe-pak과 Wondrpak보다 높은 세포독성이 있었다. 따라서 세포독성면에서 본 치주포대의 사용은 비유지놀 포대가 권장될 수 있다고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Sachs, H. A., Checchi, F. L. and Joseph, C. E.: Current status of periodontal dressings. *J. Periodontol.*, 55:689-696, 1984.
2. Watts, T. P. and Combe, E. C.: Periodontal dressing

- materials. *J. Clin. Periodontol.*, 6:3-14, 1979.
3. Barkin, M. E., Boyd, J. P. and Cohen, S.: Acute allergic reaction to eugenol. *Oral Surg.*, 57:441-442, 1984.
4. Lysell, L.: Contact allergy to rosin in a periodontal dressing. *J. Oral Medicine.*, 31:24-25, 1976.
5. 이덕혜, 서조영, 박준봉: 치은 섬유아세포에 미치는 치주포대 추출물의 영향. *경북치대논문집*, 7:9-21, 1990.
6. Checchi, L. and Trombelli, L.: Postoperative pain and discomfort with and without periodontal dressing in conjunction with 0.2% chlorhexidine mouthwash after apically positioned flap procedure. *J. Periodontol.*, 64:1238-1242, 1993.
7. Newman, P. S. and Addy, M.: A comparison of a periodontal dressings and chlorhexidine gluconate mouthwash after the internal bevelled flap procedure. *J. Periodontol.*, 49:576-579, 1978.
8. Addy, M. and Dolby, A. Z.: The use of chlorhexidine mouth wash compared with a periodontal dressing following the gingivectomy procedure. *J. Clin. Periodontol.*, 3:59-62, 1976.
9. Kreth, K. K., Zimmermann, E. R. and Collings, C. K.: Effect of periodontal dressings on tissue culture cells. *J. Periodontol.*, 37:48-53, 1966.
10. Hildebrand, C. N. and DeRenzi, F. A.: Effect of periodontal dressings on fibroblast in vitro. *J. Periodontal Res.*, 9:114-120, 1974.
11. Haugen, E. and Hensten-Pettersen, A.: In vitro cytotoxicity of periodontal dressings. *J. Dent. Res.*, 57:495-499, 1978.
12. Rivera-Hidalgo, F., Wyan, V. J. and Horton, J. E.: Effect of soluble extracts from periodontal dressings on human granulocytic leukocytes in vitro. *J. Periodontol.*, 48:267-272, 1977.
13. Haugen, E. and Hensten-Pettersen, A.: Evaluation of periodontal dressings by hemolysis and oral LD₅₀ tests. *J. Dent. Res.*, 58:1912-1913, 1979.
14. Eber, R. M., Shuler, C. F., Buchanan, W., Beck, F. M. and Horton, J. E.: Effect of periodontal dressings on human gingival fibroblasts in vitro. *J. Periodontol.*, 60:429-434, 1989.
15. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol Method.*, 65:55-63, 1983.

16. 임미경, 김은철, 유수경, 김강주: 레진 배양액의 세포 독성에 관한 연구. 대한치과보존학회지, 18:369-376, 1993.
17. Wataha, J. C., Craig, R. G. and Hanks, C. T.: Precision of and new methods for testing in vitro alloy cytotoxicity. Dent. Mater., 8:65-71, 1992.
18. Kasugai, S., Hasegawa, N. and Ogura, H.: Application of the MTT colorimetric assay to measure cytotoxic effects of phenolic compounds on established rat dental pulp cells. J. Dent. Res., 70:127-130, 1991.
19. Kawahara, H., Shiota, M. and Yamakawa, Y.: Studies on the effect dental materials upon the mesenchymal cells in tissue culture. J. Osaka, Odonto. Society, 18:342-348, 1955.
20. Marvin, P. and Levin, B. S.: Periodontal suture materials and surgical dressings. D.C.N.A., 24:767-781, 1980.
21. 박광범, 박준봉: 온도와 시간이 치주포대의 길이변화에 미치는 영향. 대한치주과학회지, 17:187-215, 1987.
22. Manson, J. D.: Periodontics for the dental practitioner. 2nd ed., London, Henry Kimpton. pp.79-82, 1970.
23. Stanley, H. R.: Toxicity testing of dental materials. CRC press. Inc., Florida, pp.5-12, 1985.
24. Borenfreund, E. Babich, H. and Martin-Alguacil N.: Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. Toxic. in Vitro., 2:1-6, 1988.
25. Baer, P. N. and Wertheimer, F. W.: A histological study of the effects several periodontal dressings on periosteal-covered and denuded bone. J. Dent. Res., 40:858, 1961.
26. Haugen, E. and Mjor, I. A.: Bone tissue reactions to periodontal dressings. J. Periodontal Res., 14:76-85, 1979.
27. Haugen, E. and Mjor, I. A.: Subcutaneous implants for assessment of dental materials with emphasis on periodontal dressings. J. Periodontal Res., 13:262-269, 1978.
28. Nezwek, R. A., Caffesse, R. G., Bergenholtz, A. and Nasjlet, C. E.: Connective tissue response to periodontal dressings. J. Periodontol., 51:521-529, 1980.
29. Wennberg, A. and Mjor, I. A.: Short term implantation studies of periodontal dressings. J. Periodontal Res., 18:306-310, 1983.
30. Greensmith, A. L. and Wade, A. B.: Dressing after reverse bevel flap procedure. J. Clin. Periodontol., 1:97-106, 1974.
31. Jones, T. M. and Cassingham, R. J.: Comparison of healing following periodontal surgery with and without in humans. J. Periodontol., 50:387-393, 1979.
32. Allen, D. R. and Caffesse, R. G.: Comparison of results following modified widman flap surgery with and without surgical dressing. J. Periodontol., 54:470-475, 1983.
33. Heaney, T. G., and Appleton, J.: The effect of periodontal dressings on the healthy periodontium. J. Clin. Periodontol., 3:66-76, 1976.
34. Skoglund, L. A. and Jorkjend, L.: Postoperative pain experience after gingivectomies using different combinations of local anaesthetic agents and periodontal dressings. J. Clin. Periodontol., 18:204-209, 1991.
35. Jorkjend, L. and Skoglund, L. A.: Effect of non-eugenol-and eugenol-containing periodontal dressings on the incidence and severity of pain after periodontal soft tissue surgery. J. Clin. Periodontol., 17:341-344, 1990.
36. Molnar, E. J.: Residual eugenol from zinc oxide-eugenol compounds. J. Dent. Res., 46:645-649, 1967.

CYTOTOXIC EFFECTS OF SOLUBLE EXTRACTS FROM PERIODONTAL DRESSINGS ON HUMAN GINGIVAL FIBROBLASTS

Seung-Han Yang, Man-Sup Lee, Joo-Bong Park

Dept. of Periodontology, College of Dentistry Kyung-Hee University

It is well known that the application of dressings after periodontal surgery have benefits to provide the comforts to patient and to promote the healing process with action of bleeding control and temporary stabilization for the operated mobile teeth. But until recently the relationship between periodontal dressings and cells which are composed of periodontium has not been clear.

The purpose of this study was to evaluate the cytotoxic effect of soluble extracts from the four different kinds of periodontal dressings, two of them were eugenol type (K.H.pak, Wondrpak) and the others were non-eugenol type (Coe-pak, Periocare), on the human gingival fibroblasts in vitro.

Human gingival fibroblasts were primarily cultured from gingiva around third molar during the extraction for preventive purposes. Extracts solution were prepared with culture medium by means of immersing the consistent size of periodontal dressing made from plastic mold.

Cells were inoculated into the 24 well plate with 3×10^4 cells/well of medium at 37 °C, 100% of humidity, 5% of CO₂ incubator for 24 hours. After discard of the supernatant of medium, those cells were cultured with original, 1/2, 1/5, 1/10 diluted soluble extract for 24, 48 and 72 hours, and counted the number of cells using the hemocytometer at each designed time and concentration. Also, the cytotoxic effect of soluble extract was measured by Wataha's MTT assay method¹⁷⁾. In briefly, cells were inoculated and cultured into 96 well culture plate with 2×10^4 cells/well for 24 hours. Soluble extracts were applied to cultured cells and incubated for 48 hours at same condition. 50 μ l of MTT solution and DMSO were added into each well for the detection of absorbance with ELISA reader. The measured data were calculated by value of colorimetric assay for survival rate.

The results were as follows ;

In the case of eugenol type of dressing, original, 1/2 and 1/5 diluted extracts of K.H.pak showed very low survival rate. And original extract of Wondrpak showed strong cytotoxic effect and 1/2 diluted extract showed moderate cytotoxic effect.

In the case of Non-eugenol type of dressings, only original extract of Coe-pak revealed strong cytotoxic effect and Periocare had little cytotoxic effect.

It is concluded that eugenol type of dressings showed more cytotoxic effect than non-eugenol types. This study suggest that use of non-eugenol dressings after periodontal surgery is recommended.