Chlorhexidine과 Listerine이 인체 치은 섬유모세포의 활성에 미치는 영향

원광대학교 치과대학 치주과학교실

강정구 · 유형근 · 신형식

Ⅰ. 서 론

치태는 치주질환의 발병과 진행에 깊은 관계를 가지며, 치주질환의 예방과 치유에 있어 치태의 제거 혹은 감소가 필수적이다[1,2]. 이러한 치태의 축적을 억제하기 위해서는 철저한 치태조절이 요구되며 기계적 치태조절이 어려운 환자에 대한 구강세정제를 이용한 화학적 치태조절이 유용한 수단이다. 화학적 치태조절법에는 구강함수법이나 치주낭내의 직접 세척법 등이 있는데, chlorhexidine과 Listerine이 최근 가장 많이 이용되고 있다.

Chlorhexidine은 광범위 항미생물 작용을 갖는 항균제로[3,4], 수술 부위의 감염 예방, 화상의 치료 그리고 구강에서는 치은염과 치태 방지를 위해 임상적으로 널리 이용되고 있다[5,6]. 앞선 많은 연구에서 chlorhexidine 구강 양치는 치태형성의 억제와 다발성 우식의 치료에 효과적이라는 보고가 있었다[7,8].

Chlorhexidine은 cationic molecule이며 polybiguanide group에 속한다. 이 약제의 살균 효과는 cationic molecule이 세균의 삼투 평형(osmotic equibilium)을 변화시켜 발휘된다[9]. 치태조절에 있어 chlorhexidine세척의 효과는 이것의 substantivity에 크게 의존하는데, 이는 구강 조직에 흡수되어 활성 형태로 서서히 방출된다[10].

Chlorhexidine의 임상 효과 및 부작용에 대한 연구에서 식수를 통한 저 용량의 chlorhexidine을 장기간 백서에 투여한 결과 부작용이 나타나지 않았고[11], 인체 연구에서 chlorhexidine으로 2년간 매일 구강 양치를 시행한 환자에서 대조군의 환자에 비해 유의한 전신적 효과 및 부작용이 나타나지 않았다[12]. Chlorhexidine의 사용에 따라 나타나는 부작용으로는 쓴맛, 구강 점막의 착색 그리고 장기간 사용시 창상 치유의 장애 등이 보고되었다[13-16].

Listerine은 멘톨, 치몰, 유칼립톨과 살리실산 메칠등으로 구성된 구강 세정제로서 세균의 세포막을 손상시키고 단백질을 변성시키는 작용을 한다. 이는 생체와 실험실에서 여러 치주병원성 세균을 억제하는 것으로 보고되었다[17]. Forneil등과 Siegrist등[18,19]은 실험적으로 유발된 치은염에 대한 연구를 통해 그리고, Lamster등[20]과 Gordon등[21]은 기계적인 방법에 보조적으로 Listerine 구강 양치를 이용한 연구에서 치태와 치은염에 대한 억제 효과를 보고하였다. Listerine의 장기간의 사용에 대한 연구에서, Ross등[22]은 6개월 혹은 9개월간 사용시 연조직이나 치아에 부작용이 나타나지 않은 것으로 보고하였다.

이러한 구강 세정제의 이용에 있어 인체 세포와 육아 조직에 대한 chlorhexidine의 독성을 보고하는 많은 보고가 있었다. Paunio등[23]과 Bassetti와 Tallenberger등[24]은 chlorhexidine이 육아 조직의 형성을 지연시킨다고 보고하였고, Gabler등[25]과 Watts등[26]은 중성구에 대한 세포 독성을 보고하였다. 이들 연구에서는 chlorhe-

xidine의 처치후 중성구 화학주성과 세포 용해의 억제가 나타났다. Helgeland등[27]은 배양된 인체 상피세포에 대한 독성과 적혈구의 용혈 작용을 보고하였다. 구강 세정에 사용되는 농도에서 chlorhexidine은 인체 섬유모세포의 배양과 HELA cell의 배양에서 세포 손상, 세포 독성 그리고 단백합성의 억제를 보인다. 이와 같이 치은 섬유모세포에 대한 chlorhexidine의 작용에 관한 연구가 많이 시행된 반면, Listerine의 배양 세포에 대한 세포 활성의 연구는 아직 부족한 실정이다.

이러한 섬유모세포에 대한 구강세정제의 부작용은 치태조절에 있어 유용할지라도 치주재생에 있어서는 유해한 작용을 나타내게 된다. 즉, 이들 구강세정제가 창상부위에 적용시 세포독성 작용을 발휘한다면 창상 치유의 지연 및 방해가 발생될 것이다. 그러므로 chlorhexidine과 Listerine이 치은 섬유모세포의 활성에 어떠한 영향을 미치는가를 연구하는 것은 치주병소의 치료후 이들 구강세정제의 사용에 있어 중요한 평가대상이 된다.

본 연구의 목적은 대부분의 구강내 세균의 살균 및 통상의 함수시간인 30초와 구강내 잔류시간인 1시간으로 분류하여 각 농도별로 chlorhexidine과 Listerine을 치은 섬유모세포에 가한 후 3일간 배양한 후 치은 섬유모세포의 활성도를 MTT법으로 조사하여 치주창상의 치유에 있어 chlorhexidine과 Listerine이 치은 섬유모세포의 활성도에 미치는 영향을 평가하기 위함이다.

II. 재료 및 방법

1. 연구재료

1) chlorhexidine digluconate와 Listerine의 준비

chlorhexidine digluconata는 0.12% chlorhexidine 용액을 사용하여 0.06, 0.012, 0.006 그리고 0.0012%의 농도로 희석하여 사용하였다. Listerine은 시판중인 Listerine(Wanner-Lambert Co.)을 100% 원액을 50, 10, 5 및 1%로 희석하여 실험에 이용하였다.

2) 치은섬유모세포의 배양

임상 및 방사선 사진 상으로 치은 염증 및 치주염의 소견이 없는 건강한 치아를 발치한 후 치은을 절제하였다. 절제한 치은은 40% 우태아혈청(Fetal bovine serum, Gibco Co., USA)과 20% 항생제(penicillin G, streptomycin, amphotericin B포함, Gibco Co., USA)를 가한 α-MEM(Minimal Essential Medium, Gibco Co., USA)로 3회 세척하였다. 치은 조직을 세척한 후 60mm 세포 배양용 배양접시(Nunc Co., USA)로 옮겨 약 1mm²로 세절하였다. 세절한 치은 조직은 조직의 가장자리가 배양접시에 잘 부착되도록 주의하면서 잘 펴놓은 후 20분간 37℃ 5%CO^2, 습도 100% 배양기(Bantex 1820IR, SHEL-LAB, USA)에서 배양 접시에 고르게 부착이 되도록 배양시킨 후, 각 배양접시당 2ml의 10% 우태아혈청과 1% 항생제를 첨가한 α-MEM을 가하고 단일 세포층이 형성될 때까지 3일간격으로 배양액을 교환하였다.

3일간 배양 후 배양접시내의 배양액을 제거하고 Hank's Balanced Salt Solution(HBSS, GIBCO Co. USA)으로 2회 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 부착된 세포의 분리를 위해 HBSS를 제거한 후 0.25% trypsin-EDTA (10x, Gibco Co., USA)를 배양접시당 2ml씩 넣고, 3분간 bench상에 방치한 후 피펫을 이용하여 배양 접시에 부착된 부착 세포를 분리시키고 5ml 원심분리용 시험관으로 옮겨서 1,200rpm으로 10분간 원침하였다. 원침후 상청액을 제거하고 HBSS를 가하여 세척한 후 Vortex mixer로 혼합하고 세포 부유액을 만들어 60mm 배양접시에 분주하였다. 분주 비율은 1:3 내지 1:4로 하고 5회 계대배양하여 본 실험에 이용하였다.

2. 연구방법

(1) 도립현미경을 이용한 세포형태의 관찰

각 실험에 앞서 24-well plate에 세포수가 well당 6,000개가 되도록 분주하기 위해, trypan-blue로 염색한 후 hematocytometer에 옮겨 도립 현미경 상에서 세포수를 세어서 부착이

되도록 분주하고 1일간 배양을 실시하였다.

0.0012, 0.006, 0.012, 0.06 그리고 0.12% 농도의 chlorhexidine과 1, 5, 10, 50 및 100% 농도의 Listerine을 각 well에 30초와 1시간 동안 가한 후 HBSS로 2회 세척한 후 배양액을 가하여 3일간 배양하였다. 배양후 이를 각 약물의 농도별로 분류한 다음 도립현미경(IMT2-21, Olympus, Japan)을 이용하여 세포의 형태를 관찰하였다.

(2) MTT assay를 이용한 세포활성도의 평가

1) Chlorhexidine이 치은 섬유모세포의 활성에 미치는 영향

실험 전일 분주한 치은 섬유모세포는 0.0012, 0.006, 0.012, 0.06 그리고 0.12% 농도의 chlorhexidine을 30초와 1시간 동안 가한 후 각기 1, 2 그리고 3일간 배양한 후, 세포 활성을 측정하기 위해 생리식염수에 용해한 MTT(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl), -2, 5-diphenyl tetrazolium bromide : No. M2128, Sigma Co., USA) 용액 50μl씩 첨가하여 formazan 결정을 용해시킨 후 세포활성도의 측정을 위해 96-well plate상으로 옮겼다. Plate를 잘 흔든 후 ELISA analyser(Model ETY-96, Toyo instruments Inc., Japan)에 plate를 넣은 다음 630nm를 기준으로 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험은 각 군마다 4배수로 시행하였으며, 매 실험마다 실험 용액이 들어있지 않은 배양액을 대조군으로 하여 모든 실험 결과는 다음과 같이 대조군의 백분율로 산출하였다.

세포 활성도(%)=실험 Well의 흡광도/대조 Well의 흡광도×100

2) Listerine이 치은 섬유모세포의 활성에 미치는 영향

100, 50, 10, 5 및 1% 농도의 Listerine을 미리 분주한 치은 섬유모세포에 가한 다음 상기의 chlorhexidine과 같은 방법으로 세포 활성을 평가하였다.

(3) 통계분석

각 농도와 시간에 따른 대조군에 대한 백분율로 환산된 세포활성의 평균과 표준편차를 구하고 이들의 통계학적 유의성은 일원분산분석법(ANOVA)과 Duncan's multiple range test를 이용하여 통계 분석하였다.

Ⅲ. 연구결과

1. chlorhexidine과 Listerine이 치은섬유모세포의 형태에 미치는 영향

chlorhexidine과 Listerine을 가한 치은 섬유모세포의 형태를 도립 현미경으로 관찰한 결과 1%의 chlorhexidine과 Listerine을 가한군을 제외한 모든 군에서 적용 시간 및 농도에 따라 대조군에 비하여 세포 돌기의 소실 및 둥글어진 세포 형태를 보였다(사진부도 1-8).

2. chlorhexidine이 치은 섬유모세포의 활성에 미치는 영향

0.12, 0.06, 0.012 및 0.006% 농도의 chlorhexidine을 가한 경우 적용 시간에 관계없이 배양 1일째에는 실험용액이 가해지지 않은 대조군에 비해 유의한 수준($p<0.05$)의 세포 활성의 감소를 보였고, 30초간 0.0012% 농도의 chlorhexidine을 가한 경우에는 대조군 수준의 세포활성도를 보였다(Table 1).

배양 3일째에는 1시간 동안 chlorhexidine을 가한 모든 농도에서 배양 1일째 및 대조군과 비교하여 고도의 세포활성의 감소를 보였으며, 30초간 가한 경우는 0.0012% 농도에서 대조군 수준의 높은 세포활성의 회복이 나타났다(Table 2).

각 농도의 chlorhexidine을 가하여 배양 기간에 따른 세포활성도는 0.0012%의 chlorhexidine을 가한 경우를 제외하고는 적용 시간에 관계없이 세포 활성의 감소 경향을 보였다(Figure 1과 2).

3. Listerine이 치은 섬유모세포의 활성에 미치는 영향

100, 50, 10, 5 및 1% 농도의 Listerine을 가한 경우 배양 1일째에는 Listerine의 적용 시간에 관계없이 농도에 따라 세포활성도의 감소경향을 보였고(Table 3), 배양 3일째에는

Table 1. Effects of Chlorhexidine on cell activities of gingival fibroblast at first day (Mean%± S.D.)

Drug / Concentration	Chlorhexidine	
	1 hours	30 second
Control	100.00± 8.91	100.00± 19.98
0.12%	29.72± 1.00*	40.66± 2.95*
0.06%	29.34± 1.04*	70.25± 16.01
0.012%	26.50± 1.20*	64.88± 8.53*
0.006%	31.80± 2.30*	66.49± 10.16*
0.0012%	27.41± 0.22*	85.67± 42.10

* : Significantly different from control($p<0.05$)

Table 2. Effects of Chlorhexidine on cell activities of gingival fibroblast at third day (Mean%± S.D.)

Drug / Concentration	Chlorhexidine	
	1 hours	30 second
Control	100.00± 26.55	100.00± 19.98
0.12%	8.84± 0.36*	8.68± 0.75*
0.06%	8.34± 1.12*	8.28± 0.06*
0.012%	8.67± 0.12*	32.39± 2.86*
0.006%	9.75± 0.61*	59.45± 9.23*
0.0012%	42.26± 11.67*	100.19± 10.30

* : Significantly different from control($p<0.05$)

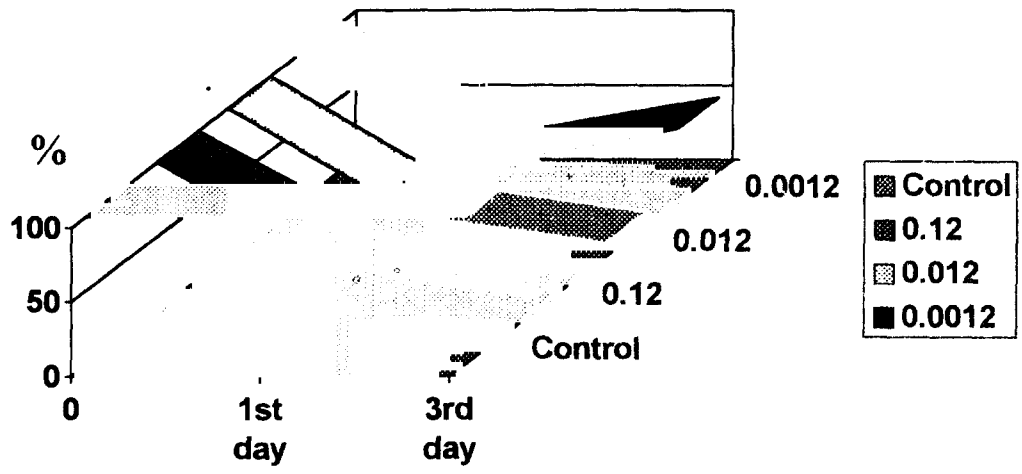


Figure 1. Effects of Chlorhexidine on cell activity of Human gingival Fibroblast(1 hour)

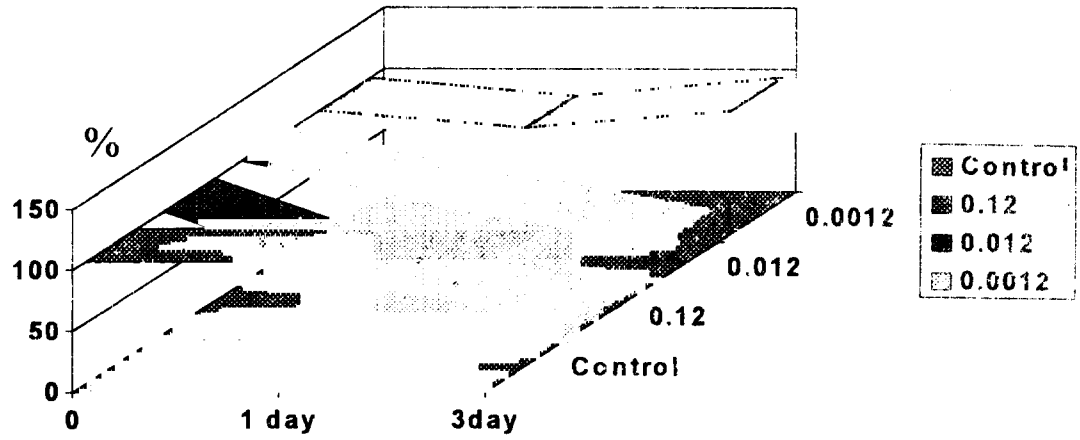


Figure 2. Effects of Chlorhexidine on cell Activity of Human Gingival Fibroblast(30 second)

Table 3. Effects of Listerine on cell activity of Human Gingival Fibroblast at first day (Mean%± S.D.)

Drug / Concentration	Listerine	
	1 hours	30 second
Control	100.00± 17.44	100.00± 8.27
100%	59.27± 3.78*	59.78± 3.58*
50%	60.02± 4.61*	55.33± 6.81*
10%	72.85± 6.35*	71.27± 2.07*
5%	73.85± 10.89*	96.84± 2.15
1%	93.94± 14.26	97.57± 6.17

* : Significantly different from control($p<0.05$)

Table 4. Effects of Listerine on cell activity of Human Gingival Fibroblast at third day (Mean%± S.D.)

Drug / Concentration	Listerine	
	1 hours	30 second
Control	100.00± 26.55	100.00± 8.27
100%	8.67± 0.21*	8.77± 0.06
50%	8.77± 0.49*	8.18± 0.60*
10%	8.00± 0.38*	57.96± 4.32
5%	43.71± 6.30*	63.39± 4.50*
1%	134.10± 12.46	93.59± 4.27

* : Significantly different from control($p<0.05$)

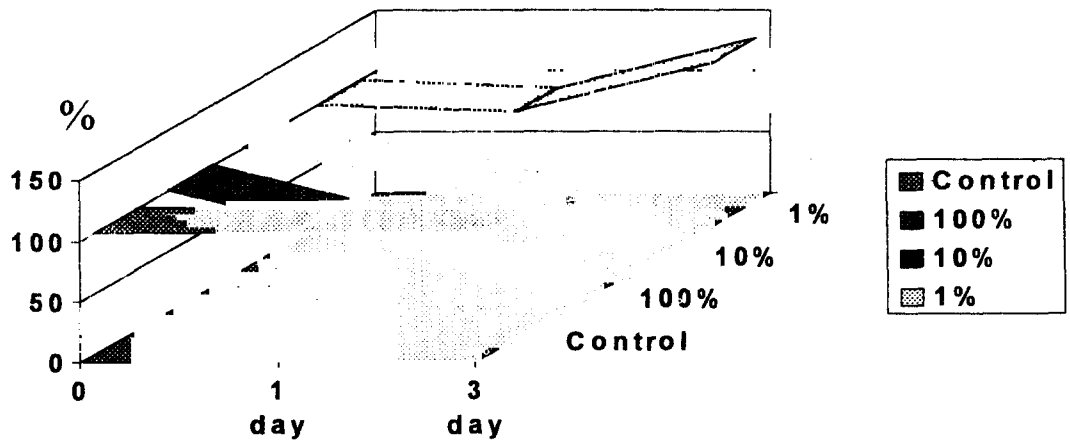


Figure 3. Effects of Listerine on Cell Activity of Human Gingival Fibroblast(1 hour)

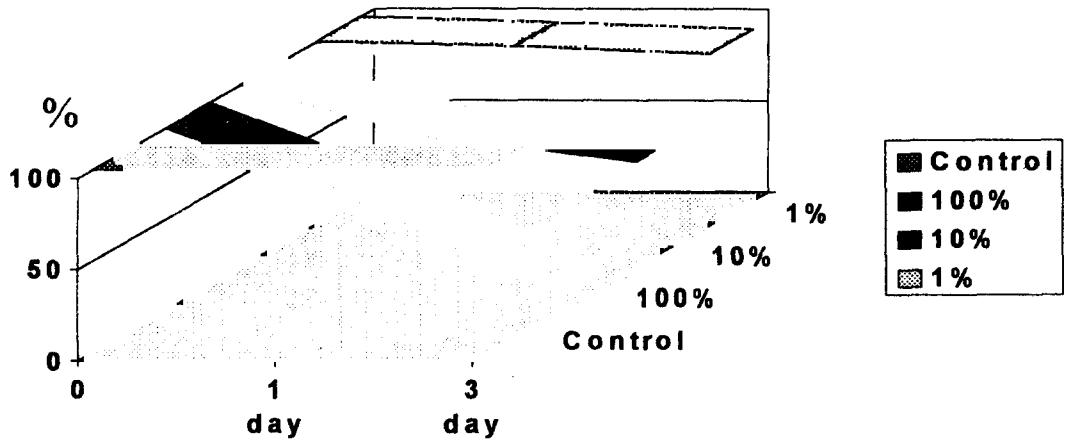


Figure 4. Effects of Listerine on Cell Activity of Human Gingival Fibroblast(30 second)

1시간을 가한 경우 100, 50, 10% 농도에서 대조군의 약 8% 수준의 고도의 세포활성 억제를 보였으며, 30초간 가한 경우는 100과 50%의 농도에서 대조군의 약 8% 수준의 억제를 보였다 (Table 4). 한편 최소의 농도인 1%를 가한 경우는 배양 기간에 관계없이 대조군 수준의 세포활성도를 보였고, 배양 3일째에 0.0012%의 Listerine을 1시간 동안 가한 군에서 대조군 이상의 높은 세포활성도를 보였으나 유의한 수준은 아니었다.

한편, Listerine이 치은 섬유 모세포의 활성에 미치는 영향을 배양 기간에 따라 평가한 결과 chlorhexidine과 마찬가지로 최저 농도인 1% Listerine을 제외하고는 배양 3일까지 세포 활성의 지속적인 감소 경향을 보였다(Fig. 3과 4).

Ⅳ. 총괄 및 고찰

본 연구에서는 chlorhexidine과 Listerine이 치은 섬유모세포의 활성과 형태에 미치는 영향에 관하여 평가하였다. 임상적으로 부작용이 적으면서도 효과적으로 알려진 chlorhexidine과 Listerine은 실험실에서 배양 치은 섬유모세포에 직접 가해질 경우 일반적으로 이용되는 농도에서 고도의 세포 활성의 억제를 보였다. 이들 결과들은 임상에서 이용되는 농도의 chlorhexidine이 섬유모세포에 직접 가해질 경우 단백질과 DNA합성을 억제한 것으로 나타난 앞선 보고와 일치하였다.

본 실험실에서는 chlorhexidine은 5% 이상의 고농도에서는 적용시간에 관계없이 배양 3일후 고도의 세포 활성 억제를 보였다. 그러나, 0.0012%의 chlorhexidine을 가한 경우 3일 경과후 세포활성의 회복 경향이 나타났는데, 30초간 실험 용액을 가한 각군 모두에서 대조군 수준의 세포활성도의 회복을 보였으며, 1시간 동안 실험 용액을 가한 군에서는 0.0012%의 chlorhexidine은 1일군과 비교하여 세포활성도의 약간의 상승을 보였다.

한편 Listerine을 가한 군에서는 chlorhexidine과 마찬가지로 10% 이상의 고농도에서는 배양 3일째에 세포 활성이 고도로 저하되었으나, 10% 이하의 저농도에서는 대조군 수준으로 회복 되가는 경향을 보였으며, 전반적으로 chlorhexidine보다 높은 세포 활성을 보였다. 이상의 결과에서 고농도의 chlorhexidine과 Listerine이 직접 가해지는 경우에는 고도의 세포 독성을 보이는 반면 저농도를 가한 경우에서는 세포활성도의 일시적 감소 및 점진적인 회복을 관찰할 수 있었다. 이들 결과들은 Alleyn등[28]의 chlorhexidine을 처치한 치근면에서의 섬유모세포의 부착을 관찰한 경우의 연구와 Pucher등[29]의 배양 치은 섬유모세포를 이용한 chlorhexidine효과를 관찰한 연구에서의 결과와 일치한다. 이는 chlorhexidine과 Listerine의 구강양치후 구강내 잔류시간과 타액내 농도에서도 세포 활성의 억제를 보이는 것을 의미한다. 그런데, 이러한 결과는 치주수술후 chlorhexidine과 Listerine의 세포 독성은 항미생물효과의 장점을 초과하는 문제점을 야기할 수 있으리라 추론할 수 있는데, 선학들의 임상 연구에서는 조직학적 수준에서 그러한 세포독성의 증거는 보이지 않았고 여기에는 여러 국소적 요인이 작용하는 것으로 알려졌다.

Lindhe등[30]에 따르면 상피 장벽(epithelial barrier)이 하방 세포들을 보호하며 Helgeland등은 타액이 아닌 체액이 chlorhexidine의 세포독성 작용으로부터 보호한다고 보고하였으며, Rydbert등은 창상에 있어 조직 손상의 역치가 존재하여 이 역치를 초과하여야만이 회복기전이 손상받을 것이라는 기전을 제시하였다. 이는 chlorhexidine이나 Listerine이 체액이나 상피장벽으로부터 1차적으로 보호된 후 저하된 농도가 세포 독성의 역치를 초과하지 않아서 이들 용액 자체가 세포 독성을 지녀도 창상의 치유가 방해받지 않는 것으로 사료된다. Ramfjord등[31]과 Engler[32]등의 치은절제술후 창상의 여러층에 대한 조직학적 관찰에 따르면 상피세포가 창상을 피개하기 위해 이주하여 형성된 "polyband" layer가 결체조직에 chlorhexidine이 도달하는 것을 보호해줄 것이라는 조직학적 소견이 있었고, 또한 실험실에서는 무균상태이나 생체에서는 chlorhexidine이 세균과 결합하여 숙주세포에의 결합양을 감소시킬 수 있다는 점도 고려할 수 있다. Chlorhexidine과 Listerine의 임상적 연구에서 본 실험에서 나타난 결과로 예측할 수 있는 치은 섬유모세포에 대한 고도의 세포활성도의 억제로 인한 창상 치유의 지연이 나타나지 않은 이유는 위와 같은 국소적 환경 요인에 따른 chlorhexidine과 Listerine의 농도가 저하되어 치은 섬유모세포의 활성이 영구 손상받을 수 있는 역치의 범위를 넘어서지 않고 회복될 수 있기 때문이라 사료된다.

이상과 같은 본 연구의 결과 및 생체에서의 국소적 약물 작용의 억제 요소를 고려해 볼 때 chlorhexidine이나 Listerine의 사용에 있어 적용 방법적 측면에 대한 고려가 필요할 것으로 사료된다. 만일 chlorhexidine이나 Listerine이 창상 치유시 혹은 재생 술식이 시행된 부위에

강한 압력으로 직접 가해질 경우 부착기전이나 초기치유기전에 영향을 미칠 수 있다. 그러므로 창상면에 직접 가해지는 구강 양치제의 사용 방법에 주의를 기울여야 할 것이며 창상의 치유시까지 창상 부위에의 강력한 도포를 피한 사용이 창상 치유에 도움을 줄 것이다.

V. 결 론

chlorhexidine과 Listerine이 치은 섬유모세포에 미치는 영향을 평가하기 위해 치은 섬유모세포를 배양후 MTT assay를 이용한 치은 섬유모세포의 활성도 평가 및 도립 현미경을 이용한 세포 형태를 평가하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 본 실험에 이용된 전체 농도에서 chlorhexidine과 Listerine을 가한 경우 치은 섬유모세포의 형태는 둥글어지고 세포 돌기의 소실을 보였다.
2. 치은 섬유모세포에 chlorhexidine을 가한 경우 배양 3일째에는 0.006% 이상의 농도에서 세포 활성의 유의한 억제를 보였고($p < 0.05$), 0.0012% 농도에서는 대조군수준의 세포 활성을 보였다.
3. 치은 섬유모세포에 Listerine을 가한 경우 배양 3일째 적용 시간에 관계없이 세포의 활성을 감소시켰고 1% 농도에서는 배양일에 관계없이 대조군 수준의 세포활성을 보였다.
4. 0.0012%의 chlorhexidine과 1%의 Listerine용액은 이들 용액을 가한 시간에 관계없이 배양 시간이 지날수록 세포활성이 대조군 수준으로 회복되는 경향을 보였다.

이상과 같은 결과를 종합하여 볼 때 현재 구강양치액으로 많이 사용되고 있는 chlorhexidine과 Listerine은 실험실에서 직접 치은 섬유모세포에 가해지는 경우 고도의 세포 독성을 보이나, 양치후 구강내 잔류 농도 및 잔류시간 동안 배양한 경우 세포활성의 회복 경향을 보이는 것으로 나타났다.

참고문헌

1. Löe, H. et al. : Experimental gingivitis in man. J Periodontol 36 : 177－187, 1965.
2. Theilade, E. et al. : Experimental gingivitis in man(II). A longitudinal and bacteriological investigation. J Periodont Res 1 : 1－13, 1966.
3. Budtz - Jargensen E, Löe H. : Chlorhexidine as a denture disinfectant in the treatment of denture stomatitis. Scand J Dent Res 80 : 457－464, 1972.
4. Hugo W, Longworth A. : Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. J Pharmacol 16 : 652－662, 1964.
5. Segreto VA, Collins EE, Beiswanger BB, et al. : A comparison of mouthrinses containing two concentrations of chlorhexidine. J Periodont Res 21(suppl 16) : 23－32, 1986.
6. Grossman E, Reiter G, Sturzenberger OP, et al. : Six - months study of the effects of a chlorhexidine mouthrinse on gingivitis in adults. J Periodont Res 21(suppl 16) : 33－43, 1986.
7. Briner W, Buckner R, Rebitski G, Manhart M, Banting D. : Effect of two years use of 0.12% chlorhexidine on plaque bacteria. J Dent Res 68(spec. Issue) : 1719－1721, 1989.
8. Johansen H, Gjermo P, Eriksen H. : Effect of two years use of chlorhexidine containing dentifrices on plaque, gingivitis and caries. Scan J Dent Res 83 : 288－292, 1975.
9. Greenstein G, Berman C, Jaffin R. : Chlorhexidine, an adjunct to periodontal therapy. J Periodontol 57 : 370, 1986.
10. Lang N, Brec, M. : chlorhexidine digluconate - an agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation. J Periodontol Res 21(suppl.) : 74,

1986.
11. Davies GE, Francis J, Martin AR, Rose F, Swain G. : 1 - 6 - di - chlorophenyl - diguanido - hexane("Hibitane"). Laboratory investigations of a new antibacterial agent of high potency. Brit J Pharmacol 9 : 192−196, 1954.
12. Schiott C. Löe H, Briner W. : Two - year oral use of chlorhexidine in man. J Periodont Res 11 : 158, 1976.
13. Rolla, G., Ellingsen, J. E., Eriksen, H. M., and Nordbo, H. : Dental stain by chlorhexidine, a possible mechanism. J Dent Res 60 : 528, 1986.
14. Ellingsen, J. E., Rolla, G., Eriksen, H. M., and Nordbo, H. : Extrinsic dental stain caused by chlorhexidine and other denaturing agents. J. Dent Res 9 : 317, 1982.
15. Flotra, L., Gjermo, P., Rolla, G., and Waerhaug, J. : Side effect of chlorhexidine mouth washes. Scand J Dent Res 79 : 119, 1971.
16. Gjermo, P. : chlorhexidine in dental practice. J. Clin Periodontol 1 : 143, 1974.
17. Pitts G., Pianotti, R., and Feary, TW. : The in vivo effects of an antiseptic mouthwash on odor - producing microorganism. J. Dent Res, 60 : 1891−1896, 1981.
18. Fornell, J., Sundin, Y., and Lindhe, J. : Effects of Listerine on dental plaque and gingivitis. Scand J Dent Res 83 : 18−25, 1975.
19. Siegrist, B. E. et al. : Efficacy of supervised rinsing with chlorhexidine digluconate in comparison to phenolic and plant alkaloid compounds. J. Periodont. Res 16 : 60, 1986.
20. Lamster, I. B., Alfano, M. C., Seiger, M. C., and Gordon. : The effect of Listerine Antiseptic on reduction of existing plaque and gingivitis. Clin Prev Dent 5 : 12−16, 1983.
21. Gordon, J. M., Lamster, I. B., and Seiger, M. C. : Efficacy of listerine antiseptic in inhibiting the development of plaque and gingivitis, J Clin Periodontol 12 : 697, 1985.
22. Ross, N. M. et al. : Long - term effects of Listerine antiseptic on dental plaque and gingivitis. J Clin Dent 1 : 92−95, 1989.
23. Paunio K, Knuttila M, Mielityinen H. : The effect of chlorhexidine gluconate on the formation of experimental granulation tissue. J Periodontol 49 : 92, 1978.
24. Bassetti C, Tallenburger A. : Influence of chlorhexidine rinsing on the healing of oral mucosa and osseous lesion. J Clin Periodontol 7 : 443, 1980.
25. Gabler W, Bullock W, Creamer H. : The influence of chlorhexidine on superoxide generation by induced human netrophils. J Periodont Res 22 : 445, 1987.
26. Watts T, Addison T, Johnson B. : Effect of chlorhexidine solution on neutrophil locomotion in vitro. J Dent 17 : 287, 1989.
27. Helgeland K, Heyden G, Rolla G. : Effect on chlorhexidine on animal cells in vitro. Scand J Dent Res 79 : 209, 1971.
28. Chales D. Alleyn, Robert B. O'Neal, Scott L. Strong, Michael J. Scheidt, Thomas E. Van Dyke, and James C. McPherson. : The effect of chlorhexidine Treatment of root surface on the attachment of human gingival fibroblasts in vitro. J Periodontol 62 : 434−438, 1991.
29. Jefferg J. Pucher and Jon C. Daniel. : The effect of chlorhexidine digluconate on human Fibroblasts in vitro. J Periodontol 62 : 526−532, 1993.
30. Lindhe J, Heyden G, Svanberg G, Löe H, Schiott C. : Effect of local applications of chlorhexidine on the oral mucosa of the hamster. J Periodont Res 5 : 177−182, 1970.

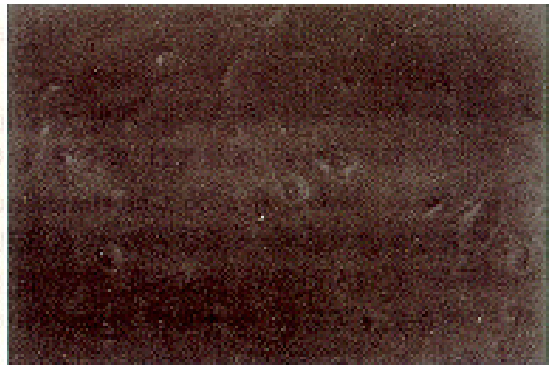
31. Ramfjord SP, Engler WO, Hiniker JJ. : A radioautographic study of healing following a simple gingivectomy. II. The connective tissue. J. Periodontol 37 : 179－189, 1966.

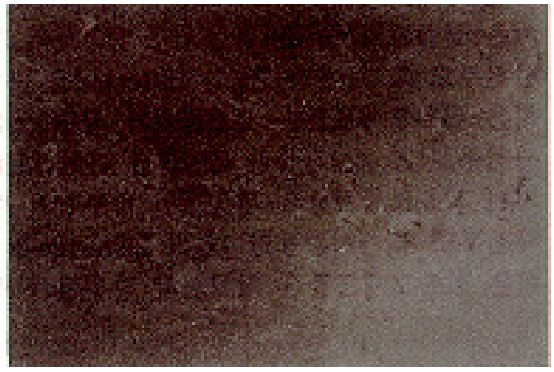
32. Engler WO, Ramfjord SP, Hiniker JJ. : Healing following a simple gingivectomy. A tritiated thymidine radioautographic study. I. Epithelialization. J Periodontol 37 : 298－308, 1966.

사진부도 및 설명

사진부도 1. 30초간 배양액을 가한 대조군(배양 3일째)
치은 섬유모세포들은 정상적인 방추형의 형태 및 세포돌기를 보인다.
사진부도 2. 30초간 0.12% Chlorhexidine을 가한군(배양 3일째)
치은 섬유모세포들의 세포돌기는 소실되고 둥근형태를 보인다.
사진부도 3. 1시간동안 HBSS를 가한 대조군(배양 3일째)
치은 섬유모세포들은 정상적인 방추형의 형태 및 세포돌기를 보인다.
사진부도 4. 1시간동안 0.0012%의 chlorhexidine을 가한군(배양 3일째)
치은 섬유모세포들은 정상적인 방추형의 형태 및 세포돌기를 보인다.
사진부도 5. 30초간 HBSS를 가한 대조군(배양 3일째)
치은 섬유모세포들은 정상적인 방추형의 형태 및 세포돌기를 보인다.
사진부도 6. 30초간 100% Listerine을 가한군(배양 3일째)
치은 섬유모세포들은 세포돌기가 일부 소실되고 약간 둥글어진 형태가 일부에서 나타났다.
사진부도 7. 1시간동안 HBSS를 가한 대조군(배양 3일째)
치은 섬유모세포들은 정상적인 방추형의 형태 및 세포돌기를 보인다.
사진부도 8. 1시간동안 1%의 Listerine을 가한군(배양 3일째)
치은 섬유모세포들은 정상적인 방추형의 형태 및 세포돌기를 보인다.

사진부도





—Abstract—

EFFECTS OF CHLORHEXIDINE AND LISTERINE ON CELL ACTIVITY OF HUMAN GINGIVAL FIBROBLAST *IN VITRO*

Kang, Jung - Koo, Yoo, Hyung - Keun, Shin, Hyung - Shik

Department of Periodontology, College of Dentistry, Wonkwang University

Chlorhexidine and Listerine are widely used in dentistry due to its effectiveness on plaque control and bactericidal action. The effects of these agent on chronic gingivitis and wound healing following surgical periodontal therapy in human has been favorable. Understanding the effects of chlorhexidine and Listerine on human gingival fibroblast will provide the rationale for its use during the healing process of periodontal surgery. The purpose of this study was to compare the effects of chlorhexidine and Listerine on human gingival fibroblast.

Human gingival fibroblasts were cultured from the healthy gingiva on the extracted premolar of orthodontic patients. Human gingival fibroblast were trypsinized and cultured in growth medium added range of 0.0012−0.12% chlorhexidine and 1−100% Listerine mouth wash solution. The cell used in this study were between fifth to eighth passage number. The cell morphology were examined by inverted microscope and the cell activity were measured by MTT assay.

The Morphology of gingival fibroblast added Chlorhexidine and Listerine at the concentration of all range were became globular and lost their cytoplasmic process. Our results indicate that a 0.0012% concentration of chlorhexidine and 1% concentration of Listerine were shows minimal cytotoxicity, but above these concentraion, there was a significant difference between the cell activity in the experimental group and control group($p<0.05$).

These results suggested that direct exposure of chlorhexidine and Listerine significantly inhibits fibroblast acitivity which may interfere with regeneration of the periodontium.