

# 치근면 탈회제인 테트라사이클린과 구연산이 치주인대세포의 증식과 전개에 미치는 영향에 대한 비교

박재완 · 이재목 · 서조영

경북대학교 치과대학 치주과학교실

## I. 서 론

치주염은 결합조직부착의 소실, 치조골의 흡수, 점합상피의 근단이동과 같은 치주조직의 병적인 변화를 야기하며 계속적으로 진행하게 되면 치아의 상실을 일으킬 수 있다. 통상적인 치주치료는 치주조직을 정상적인 해부학적 형태로 돌이키지 못하는 회복의 치유양상을 보여준다. 하지만 궁극적인 치주치료의 목적은 이전에 치주질환에 이환된 부위에서 치주조직의 신부착을 통한 재생을 얻는 것이며 재생은 병적으로 노출되었던 치근면에 신생백악질, 치주인대, 그리고 치조골의 형성을 의미한다<sup>1)</sup>. 재생을 얻기 위해서는 치근면으로부터 치석, 치태, 및 세포독성물질의 제거가 필요하며<sup>2)</sup> 노출되었던 치근면에 치주인대세포가 먼저 이주하여 부착되어야 한다<sup>3,4)</sup>. 그리하여 세포의 부착을 증진시킬 수 있는 치근면을 형성해 주기 위해 그 동안 많은 물질의 치근면처리가 시도되어왔다.

Register<sup>5)</sup>는 동물실험에서 염산으로 탈회시 결합조직 재부착과 증가된 백악질형성과 골형성을 보고하였으며 Boyko 등<sup>6)</sup>은 비탈회면보다 탈회면에 더 많은 세포부착이 있었으며 탈회물질간의 차이는 없다고 하였고 Pitaru 와 Melcher<sup>7)</sup>는 탈회면이 섬유아세포의 부착, 이주, 수축을 쉽게하고 일정방향의 섬유성부착을 일으킨다고 하였다. 그리고 여러종류의 산을 사

용한 실험에서 Register 와 Burdick<sup>8)</sup>은 2-3 분간 pH 1의 구연산을 도포하였을 때 최적의 백악질형성과 신생결합조직부착이 있다고 하였다. 가장 많이 보고된 구연산의 치근면도포는 치근면탈회<sup>9)</sup>, 교원질노출<sup>10)</sup>, 독성물질의 제거<sup>11)</sup>, 섬유아세포의 성장을 증진<sup>6)</sup>, 항균효과<sup>12)</sup> 그리고 상아세관의 확대 및 도말층을 제거<sup>13)</sup> 시키는 작용이 있다고 보고되어있다.

Albair 등<sup>14)</sup>과 Proye 와 Polson<sup>15)</sup>은 기계적 처치후 구연산으로 탈회하는 것이 신생결합조직부착에 유리하다고 하였으며, 발치후 치근면 처리없이 재이식술을 시행한 경우 재부착이 일어났고 치근면의 치주인대와 백악질을 제거후 재이식술을 시행한 경우 긴 점합상피가 일어났으며<sup>15,16)</sup> 노출된 치근면에 구연산처리시 신생결합조직부착이 일어났다<sup>17)</sup>.

반면에 Bogle 등<sup>18)</sup>은 구연산의 도포후 치근흡수와 골성장직이 나타남을 보고하였고, Pettersson과 Aukhil<sup>19)</sup>은 milipore filter를 사용하여 구연산처리한 군과 처리하지않은 군의 비교시 구연산처리군에서 많은 비율의 골성장직과 치근흡수 그리고 더 적은 신생백악질 형성을 보고하여 구연산이 치주인대세포에 손상을 줄 가능성이 있다고 하여 구연산의 임상적용에 문제점을 제기하였다. 한편 연조직 이식시에 구연산을 사용시 구연산처리가 치근면피개에 상당한 증진을 보였다<sup>20,21-23)</sup>.

구연산과 마찬가지로 많이 쓰이는 테트라사

이클린은 치주병원균의 제거에 효과적인 광범위항균제이며<sup>24)</sup> 치면에 강하게 흡착되어 활성형으로 방출되고<sup>25)</sup> 구연산과 유사한 효과외에 교원질 분해효소 활성도를 저해하며<sup>26)</sup> 골조직이식시 치유를 증진시키는 효과도 가진다고<sup>27, 28)</sup> 보고되었다. 세포의 부착에 대한 보고에서 Terranova<sup>29)</sup>은 테트라사이클린처리시 fibronectin 부착을 증가시키고 섬유아세포의 부착과 성장을 용이하게 하며 구연산보다 3배이상의 섬유아세포의 부착이 있다고 하였고 Claffey<sup>30)</sup>은 테트라사이클린처리시 거의 모든 표본에서 결합조직부착을 보였고 구연산과 유사한 부착 증진을 보인다고 하였으며 Frantz와 Polson<sup>31)</sup>은 쥐에 매복한 테트라사이클린처리된 상아질편에서 세포의 이동과 부착이 증가한다고 하였고 Wikesj 등<sup>32)</sup>은 구연산과 테트라사이클린이 같은 정도의 골강직과 치근흡수를 야기하고 결합조직회복을 유도하는 능력이 비슷하다고 보고하였다.

치근면탈회에 있어서 Wikesj 등<sup>33)</sup>은 테트라사이클린이 활택된 상아질표면의 도말층 제거와 상아세관과 섬유질의 노출을 일으키며 구연산처리시와 유사한 치근면탈회를 일으킨다고 하였다.

선학들의 연구를 통해 주로 치은섬유아세포에 대한 실험<sup>34, 35-37, 7, 29)</sup>이 이루어져왔으며 치주인대세포의 치근면부착에 대한 연구는 드문 실정이다. 치은섬유아세포와 치주인대세포는 결합조직세포임에는 동일하나 그 성상의 차이가 있다고 보고<sup>38, 39, 40, 41)</sup>되어있으므로 치근면의 신부착에 주된 역할을 하는 치주인대세포에 대한 테트라사이클린과 구연산의 효과를 비교해보고자 증식세포수를 측정하였고 치근면의 부착양상을 주사전자현미경으로 관찰하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 치주인대세포의 배양

교정치료를 목적으로 발거된 제1소구치를 초기배양과정에서 야기될 수 있는 세균감염을 방지하기 위해 200 U/ml Penicillin(근화제약, 한국)과 200 µg/ml Streptomycin(동아제약,

한국)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(Gibco사, 미국, 이하 DMEM으로 표기)에 침수시켰다. 치아를 DMEM으로 3회 세척한 후, 치근 중앙부 1/3 부위의 치주인대를 큐렛으로 채취하여 세절한 다음 35mm 세포배양접시에 고르게 분포시켜 10% Fetal Bovine Serum(Gibco사, 미국, 이하 FBS로 표기)에 100 U/ml Penicillin과 100 µg/ml Streptomycin이 포함된 DMEM을 넣고 37°C, 100% 습도, 5% CO<sub>2</sub> 공기혼합배양기(Sanyo사, 일본)에서 배양하였다. 치주인대세포가 조직세편으로부터 증식되어 완전히 배양접시를 피개하는 단층밀생이 형성된 후 0.05% trypsin/0.02% EDTA를 이용하여 세포를 분리하여 100mm 세포배양접시를 이용하여 계대배양하였다. 본 실험에서는 3, 4세대의 치주인대세포를 사용하였다.

### 2. 시편제작

중중치주염으로 발거된 치아들중 치근활택술만 시행한 군을 실험 1군(대조군)으로 하고 치근활택술후 구연산처리한 군을 실험 2군, 치근활택술후 테트라사이클린처리한 군을 실험 3군으로 하였다. 각 치아들을 치석을 제거한후 큐렛을 사용하여 치근면활택술을 시행하고 치아의 장축방향으로 disk를 사용하여 종단절단한후 치주염에 이환되었던 부위와 건전한 치면의 경계부위를 round bur를 사용하여 표시한 다음 disk를 이용하여 치주염에 이환되었던 부위만 남도록 절단하였다. 실험에 사용되는 모든 시편을 121°C, 15 psi 에서 15분간 고압멸균한 후, 1군은 인산완충생리식염수에 침수시켰고 2군, 3군은 각각 pH 1의 구연산(Junsei사, 일본)용액에 3분간과 100 mg/ml 농도의 테트라사이클린(Sigma사, 미국)용액에 5분간 침수시킨후 인산완충생리식염수로 3회 세척하였다.

### 3. 증식세포수 측정

각군의 시편을 시간대별로 각 3개씩의 시편을 24 well 조직배양기에 넣고 1×10<sup>5</sup> cells/ml의 치주인대세포를 가진 배양액 1 ml 씩을 넣어 배양하였다. Klebe<sup>26)</sup>가 세포부착이 배양 5분후

부터 시작되어 6시간까지 계속되며 그 후에는 세포분열이 시작된다고 보고하였으므로 본 실험에서 6시간 배양후 치주인대세포가 부착된 각 시편을 새로운 배양기에 이동하고 10% FBS를 포함하는 DMEM 1 ml씩을 넣고 24시간, 48시간 및 72시간동안 배양하여 배양액을 완전히 제거한후 인산완충생리식염수로 세척하였다. 0.05% trypsin/0.02% EDTA로 처리하여 배양기에서 10분간 배양시킨 다음 분리된 세포수를 광학위상차현미경하에서 hemocytometer를 이용하여 각 시편당 3회씩 세포수를 측정하여 그 평균치를 산정하였다. 각 군의 단위면적당 증식된 세포수는 위상차현미경하에서 측정된 세포수를 시편의 면적으로 나누어 계산하였고 유의성 검증을 위해 one way ANOVA 분석을 시행하였다.

#### 4. 세포부착후 주사전자현미경 관찰

각군의 시편을 관찰할 시간에 따라 3군으로 나누어 24 well 조직배양기에 넣은 후, 각각의 조직배양기에  $1 \times 10^4$  cells/ml의 치주인대세포를 가진 배양액 1 ml 씩을 넣어 배양하였다. 세포배양개시후 30분, 6시간, 24시간에 배양액을 제거하고 2.5% glutaraldehyde(0.1 M 인산완충액, pH 7.4)에서 고정후, 고정액을 제거하고 0.1 M 인산완충생리식염수로 5회 세척하여 1% osmium tetroxide(0.1 M 인산완충액, pH 7.4)에서 후고정한 다음 인산완충생리식염수로 세척하고 2% tannic acid(0.1 M 인산완충액, pH 7.4)로 처리한 다음 일련의 에틸알콜로 탈수하고 임계점조기를 이용하여 임계점으로 건조시키고 ion coater를 이용하여 금으로 증착시키고 주사전자현미경(Hitachi사, Model S-2300, 일본)을 사용하여 세포전개양상을 관찰하였다.

### III. 성 적

#### 1. 증식세포수 측정

세포증식실험에서 각 시간당 세포부착수는 24시간, 48시간, 72시간제 모두에서 치근활택군보다는 구연산처리군에서, 구연산처리군보다

는 테트라사이클린처리군에서 더 많은 부착을 보였으며( Fig. 1 참조), 각 군간의 통계학적 유의성이 24시간에서 치근활택군과 테트라사이클린처리군사이( $P < 0.01$ )에 그리고 구연산처리군과 테트라사이클린처리군사이( $P < 0.05$ )에 나타났으며, 48시간에서도 치근활택군과 테트라사이클린처리군사이( $P < 0.01$ )에 그리고 구연산처리군과 테트라사이클린처리군사이( $P < 0.05$ )에 유의성 있는 차이를 보였고, 72시간에서는 치근활택군과 테트라사이클린처리군사이( $P < 0.05$ )에 통계학적 유의성을 나타내었다(Table 1 참조). 각 군에서 시간경과에 따른 세포부착은 점차 증가되는 양상을 보였으며, 각 시간간의 통계학적 유의성이 치근활택군에서는 24시간과 72시간사이( $P < 0.01$ )와 48시간과 72시간사이( $P < 0.05$ )에서, 구연산처리군에서는 24시간과 72시간사이( $P < 0.05$ )와 48시간과 72시간사이( $P < 0.05$ )에, 테트라사이클린처리군에서는 24시간과 72시간사이( $P < 0.05$ )에서 나타났다(Table 2 참조).

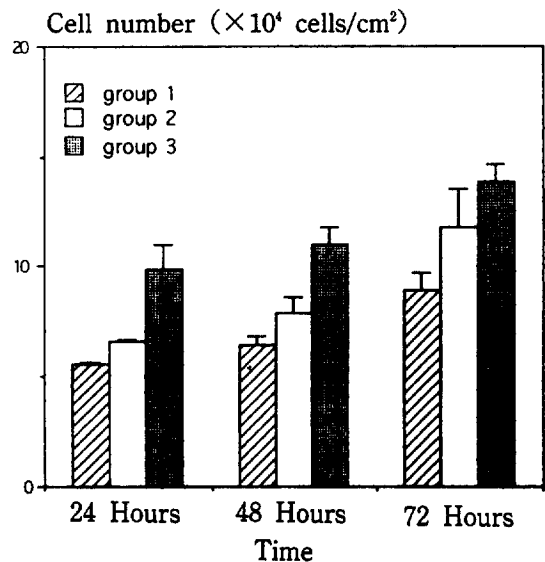


Fig. 1. Periodontal ligament cell proliferation experiment on the root surfaces which were planed or treated with citric acid or tetracycline HCl.

Table 1. Statistical comparisons of the cell counts among groups at each time (one way ANOVA analysis)

	Group 1	Group 2	Group 3
24 Hours			
48 Hours			
72 Hours			

\* :  $P < 0.05$

\*\* :  $P < 0.01$

Table 2. Statistical comparisons of the cell counts among times at each group (one way ANOVA analysis)

	Group 1	Group 2	Group 3
24 Hours			
48 Hours			
72 Hours			

\* :  $P < 0.05$

\*\* :  $P < 0.01$

## 2. 주사전자현미경 관찰조건

30분간 배양한후 치근활택군에서는 부착된 세포수가 많지 않았으며 대부분 구형의 세포들이 나타났고 표면은 소기포로 덮혀 있었으며 핵이 원형을 유지하면서 세포질에서 세포돌기를 내어 부착개시한 양상을 보였고(Fig. 2), 구연산처리군에서는 치근활택군보다 더 많은 수의 세포가 관찰되었고 세포가 조금 편평해지면서 세포질이 넓게 퍼져 부착하는 양상을 보였으며 중심부의 세포표면은 여전히 소기포로 덮혀 있었다(Fig. 3). 그리고 테트라사이클린처리군에서는 구연산처리군보다 더 편평해진 양상을 보인 세포가 좀 더 많이 관찰되었으며 보다 넓게

퍼진 양상이 관찰되었고 치근면에는 노출된 상아세관의 입구가 관찰되었다(Fig. 4).

배양 6시간후 모든 군에서 세포가 얇게 퍼져 세포를 통해 치면이 보였으며 치근활택군에서는 핵이 확산되어 방추상형을 보이기 시작했으며 세포가 다소 신장되는 양상을 보였고 치근면에 치근활택술시 큐렛이 지나간 흔적이 남아 있었으며(Fig. 5), 구연산처리군에서는 세포가 전체적으로 극성을 띠면서 좀 더 신장되었으며 핵은 원형을 상실하고 세포의 한쪽에 치우쳐져 있었고(Fig. 6), 테트라사이클린처리군에서는 구연산처리군과 유사하나 세포가 넓게 퍼져 인접세포와 연결되는 양상이 관찰되었다(Fig. 7).

24시간 배양후 소견에서 치근활택군에서는 세포가 신장되어 뚜렷한 극성을 보였으며 편평화로 인해 핵은 거의 인지할 수 없었고(Fig. 8) 구연산처리군과 테트라사이클린처리군에서는 치근활택군보다 많은 돌기를 내어 인접세포와 연결되었으며 더욱 신장된 양상을 보였고 방추형에 가까운 세포들이 많이 관찰되었다(Fig. 9, 10).

## IV. 고 찰

치주질환이 진행되면 치조골의 파괴와 부착상실이 일어나고 치아동요도가 증가되어 결국은 치아상실을 초래하게 된다. 그러므로 치주치료는 치주조직의 재생은 도모하기위해 시행되어야 하며 이를 위해서는 시술후 초기 단계에 치주인대세포가 결손부주위로 이주하여야 한다.

치주인대세포에 대한 연구에서 Somerman등<sup>40)</sup>은 동일환자, 동일세대의 치주인대세포와 치은섬유아세포를 비교하여 단백질과 교원질합성이 치주인대세포에서 더 많았고 Alkaline phosphatase도 더 높게 나타났으며 치주인대세포는 접착억제현상이 있어서 단층을 형성하나 치은섬유아세포는 접착억제현상이 없어서 중층을 형성하였고 형태는 신장된 방추형으로 동일하였으며 증식속도의 차이는 없다고 하였고 Somerman등<sup>41)</sup>은 여러물질이 치주인대세포와 치은섬유아세포의 부착과 전개에 미치는 영향을

비교하여 두 세포가 다른 부착성질을 가진다고 보고하였으며 아울러 Piche등<sup>39)</sup>은 치주조직에서 유래된 세포들의 성상을 연구하여 치주인대세포가 섬유아세포와 조골세포의 성상을 모두가 가진다고 하였고 서등<sup>40)</sup>은 치주인대세포가 치은섬유아세포보다는 골세포와 유사한 양상을 띤다고 하였다. 면역형광법을 사용한 Hou와 Yaeger<sup>38)</sup>는 치은섬유아세포와 치주인대섬유아세포는 기능적으로 이질의 아군집을 가지며 세포외기질의 합성과 표현에 있어서 본질적으로 다르다고 보고함으로써 치주인대세포와 치은섬유아세포의 차이를 보고하였다. 이상의 논문들을 근거로하여, 본 실험에서는 치은섬유아세포와 성상에 있어서 차이가 있지만 그에 대한 연구가 드문 치주인대세포를 사용하였다.

대표적인 치근면탈회제중 구연산의 치근면에 대한 작용에 관해 Garrett등<sup>10)</sup>은 주사전자현미경과 투과전자현미경을 이용한 실험에서, 구연산이 활택된 치근면에서 4  $\mu\text{m}$  두께의 탈회면을 형성하므로써 상아질기질내의 교원질을 노출시킨다고 하였으며 Fine등<sup>11)</sup>은 치주질환에 이환된 치근면으로부터 구연산이 독소의 제거에 효과적이라고 하였고 Boyco등<sup>12)</sup>은 세포가 부착할 수 있는 기질로써 치근면의 친화력을 증진시켜 섬유아세포의 부착을 증진시킨다고 보고하였다. 그리고 Daly<sup>13)</sup>는 치주염에 이환된 치근면에 존재하는 치태부착물에 대한 구연산의 항균효과를 보고하였고 Polson등<sup>13)</sup>은 치근활택술후 구연산처리한 치근면에서 도말층의 제거와 상아세관에서 깔대기모양의 입구를 보였다고 보고하였다. 한편 구연산의 조직부착효과에 대해서는 Albair등<sup>14)</sup>은 구연산처리한 치아에서 기존의 백악질과 신생백악질에 교원질섬유가 치근면에 수직으로 부착하였다고 보고하였고 Fernyhough와 Page<sup>43)</sup>는 fibronectin이나 구연산처리후 세포부착이 치근면처리하지않은 군보다 증가되었고 구연산처리에서 부착이 가장 높았으며 구연산탈회군에서 3일까지 세포증식이 증가되었고 치근활택술후에 치주질환의 이환유무에 관계없이 세포가 부착될 수 있다고 하였으며 Polson등<sup>44)</sup>은 구연산탈회시 부착된 세포수가 증가되었고 섬유성부착이 일어났으며

상피하방증식이 억제되었다고 하였다. 이와 최<sup>35)</sup>는 정상치아와 이환치아의 백악질에 구연산의 도포후 치은섬유아세포의 부착양상을 주사전자현미경을 이용하여 관찰한 결과 세포배양 24시간 이후에서 탈회된 치근면과 탈회되지않은 치근면사이의 세포부착양상의 현저한 차이가 있다고 하였고 김과 최<sup>36)</sup>는 구연산탈회 및 탈회후 fibronectin 도포시 치은섬유아세포의 부착에 대한 주사전자현미경 관찰결과, 정상치근 및 이환치근에서 치근활택술 여부에 상관없이 구연산탈회후 fibronectin 도포군에서 섬유아세포의 부착효과가 가장 우수한 것으로 보고하였으며 이와 박<sup>36)</sup>은 정상치아나 치근활택술을 시행한 군보다 구연산처리군에서 가장 많은 세포가 부착되었다고 보고하였다. 세포부착 1시간후의 관찰에서 Baran등<sup>45)</sup>은 치주인대세포가 치근면의 탈회유무에 관계없이 치근면에 부착되었으며, 탈회된 치근면이 비탈회면보다 더 많은 세포부착을 보였고, 상아질과 치주질환에 이환되지 않은 백악질에서 질환에 이환되었던 백악질에서보다 더 많은 세포부착을 관찰할 수 있었으나, 세포의 치근면에 대한 초기의 부착양상에서 각 군들 사이의 분명한 형태학적인 차이는 발견할 수 없었다고 보고하였다.

다음으로 테트라사이클린의 작용기전에 관한 연구는 구연산과 유사한 탈회와 교원질노출 효과에 대한 보고 외에 Baker등<sup>26)</sup>은 테트라사이클린이 치면에 강하게 흡착되어 활성형으로 방출된다고 보고하였고 Golub등<sup>26)</sup>은 테트라사이클린이 교원질분해효소 활성도를 방해한다고 하였으며 Al-Ali등<sup>27)</sup>과 Pepelassi등<sup>28)</sup>은 독시사이클린을 골이식술에 병용사용했을때 치유를 촉진시킨다고 하였다.

테트라사이클린의 부착에 대한 효과로는 Terranova등<sup>29)</sup>은 테트라사이클린이 섬유아세포와 fibronectin의 부착을 증진시키며 구연산보다 더 많은 섬유아세포 부착이 있었으며 섬유아세포에 위해효과가 없다고 하였으며 Alger등<sup>46)</sup>은 치주수술시 테트라사이클린도포와 테트라사이클린과 fibronectin을 병용도포한 실험에서 테트라사이클린도포시 더 많은 결합조직부착을 보였고

fibronectin의 병용도포는 테트라사이클린만 도포한 것보다 결합조직부착을 부분적으로 감소시켰다고 보고하였다.

한편 고농도의 테트라사이클린은 세포독성을 나타낼 수 있는데 Somerman<sup>47)</sup>은 미노사이클린이 50 µg/ml 까지 치은섬유아세포의 부착을 증진시키며 200 µg/ml 에서 부착의 소량 감소를 보고하여 고농도에서는 세포의 전개를 저해시킨다고 하였고 Tsukuda와 Gabler<sup>48)</sup>는 독시사이클린이 25 µg/ml 이상 농도에서 치주인대세포의 부착에 감소를 가져왔고 50 µg/ml 이상 농도에서 세포독성의 증가를 보여 독시사이클린이 치주인대세포의 부착과 전개에 방해될 수 있다고 제안하였다.

테트라사이클린의 흡착능에 대해서는 Demirel<sup>49)</sup>이 국소도포된 독시사이클린의 흡착능을 연구하여 백악질과 상아질에서 독시사이클린의 결합은 차이가 없었으나 100 mg/ml 농도에서 14일동안 항균효과를 보임으로써 독시사이클린의 흡착능을 입증하였다.

본 실험에서 치주질환에 이환된 치아의 치근활택군과 치근활택술후 구연산처리군 그리고 치근활택술후 테트라사이클린처리군으로 나누어 배양된 치주인대세포를 부착시킨후 치주인대세포의 증식과 전개양상을 관찰함으로써 구연산과 테트라사이클린처리의 효과를 비교해 보고자 하였다. 세포증식실험에 있어서 Klebe<sup>50)</sup>가 시간경과에 따른 세포부착은 배양 5분후 부터 세포부착이 시작되어 6시간까지 계속되며 그 후에는 세포분열이 시작된다고 보고하였으므로 본 실험에서 6시간 배양후 시편을 새로운 배양기에 옮겨 세포증식률을 측정하였다. 군간에는 부착된 세포수가 24, 48, 72시간 모두에서 치근활택군, 구연산처리군, 테트라사이클린처리군순으로 높았고 치근활택군과 테트라사이클린처리군 사이에 유의성있는 차이를 보였으며 24, 48시간에서는 구연산처리군과 테트라사이클린처리군 사이에 유의성있는 차이를 보여 탈회군이 비탈회군보다 증가된 세포증식을 보였고 테트라사이클린처리군이 구연산처리군보다 증식률이 높았다. 이와 같은 증식률의 증가는 탈회로 인해 노출된 교원섬유가 화학주성을

자극하여 치주인대세포의 이주 및 부착을 증진시킴으로써 높은 증식률을 보인것으로 사료되며 이는 7일후의 세포증식이 테트라사이클린이 구연산보다 많았다고 보고한 Terranova<sup>29)</sup>의 결과나 테트라사이클린처리군이 치근활택군보다 2일째부터 세포증식이 증가하고 테트라사이클린처리군과 구연산처리군 사이에는 7일째부터 통계학적 유의성이 있다고 한 정과 정<sup>37)</sup>의 결과와 유사하나 본 실험에서는 유의한 차이가 24시간부터 나타나기 시작했다.

시간대간에는 치근활택군, 구연산처리군, 테트라사이클린처리군에서 24시간과 72시간 사이에 유의성있었고 48시간과 72시간 사이에는 치근활택군과 구연산처리군에서 유의성을 보였으므로 구연산이 3일까지 세포증식이 증가된다고한 Fernyhough와 Page<sup>43)</sup>의 보고와 유사한 결과를 보였으며 24시간에서 초기부착된 세포수가 많은 군에서 세포분열에 의한 증식이 비례적으로 증가되었다고 사료된다.

세포부착양상을 관찰한 보고로는 Rajaraman<sup>51)</sup>은 사람의 이배체성 세포를 이용한 시험관적실험에서 주사전자현미경으로 관찰하여 세포부착과 전개의 과정을 먼저 기질에 세포가 접촉점을 이루며 부착하는 단계, 세사상돌기가 원심성으로 성장하는 단계, 세포질의 막양구조 형성단계, 세포전개의 마지막이며 이동의 시작인 세포중심부의 평면화단계의 4단계로 구분하였고 Garant와 Cho<sup>52)</sup>는 황중격섬유내의 치주인대섬유아세포의 배열 및 극성에 대해 보고한 바에 의하면 전방극에서 세포질돌기 또는 엽족(lobopodia)이 형성되며 핵도 전방극에서 관찰되었으며 세포질돌기가 기질과 접촉하여 수축함으로써 세포가 전방으로 이동한다고 하였다.

본 실험의 주사전자현미경관찰에서 모든 군이 24시간 경과후 전개가 거의 완성되는 양상을 보였고 테트라사이클린처리군의 초기전개가 다소 빠르게 진행됨이 관찰되었으며 테트라사이클린처리군과 구연산처리군이 세포가 부착되는 양상에서 치근활택군보다는 전개가 다소 진전된 양상을 나타내었으나 두 군간에는 유사한 전개가 진행되어 탈회면과 비탈회면의 차이는

나타나나 두 군간의 뚜렷한 차이는 보이지 않았다. 이는 탈회면과 비탈회면의 부착양상의 차이를 보고한 이와 최<sup>35)</sup>, 김과 최<sup>34)</sup>의 결과와 유사하였으며 정상치아와 치근활택술을 시행한 치근면 그리고 구연산에 의하여 탈회된 치근면에서 치주인대세포의 부착상태를 관찰하여 구연산처리군에서 초기 세포부착양상이 다소 빠르게 진행된다고 보고한 이동<sup>53)</sup>의 보고와도 유사하게 나타났다.

치근면탈회에 대한 테트라사이클린과 구연산의 효과를 비교한 보고에서 Hanes<sup>54)</sup>은 소치아의 상아질에 테트라사이클린과 구연산처리에서 테트라사이클린이 구연산보다 더 적은 탈회정도를 보인다고 하였고, Labahn<sup>55)</sup>은 건전한 제3대구치의 상아질에서 테트라사이클린보다 구연산이 상아세관의 형태에 더 많은 변화를 야기한다고 보고하였으나 Hanes<sup>54)</sup>이 사용한 테트라사이클린의 농도는 구연산에 비해 본 실험에서의 농도보다 훨씬 낮은 농도인 5% 농도였고 Labahn<sup>55)</sup>은 경구용 테트라사이클린을 사용하였으므로 본 실험의 정제된 테트라사이클린만 사용한 결과와 차이가 있으리라고 사료된다. 그리고 Lafferty<sup>56)</sup>은 치주염에 이환된 치근면의 상아질표면을 주사전자현미경상에서 관찰하여 테트라사이클린과 구연산처리가 유사한 형태학적 특징을 나타냄을 관찰하였다. 본 실험에서는 세포로 덮히지 않은 치근면에서의 탈회양상이 뚜렷한 차이는 없으나 테트라사이클린처리군에서 구연산처리군보다 상아세관이 좀 더 관찰되었다.

테트라사이클린과 구연산은 전개양상은 유사하나 치주인대세포증식에 있어서는 테트라사이클린이 더 나은 효과를 나타낸 본 실험의 결과는 구연산에서는 나타나지 않는 테트라사이클린의 효과인 치면에 흡착되어 방출되고 교원질분해효소 활성도를 저해하는 작용과 연관이 있을 것으로 생각되며 더 명확한 기전에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. 요약

치근면처리후 신부착에 관여하는 치주인대

세포의 부착을 비교하기위해 치근활택술만 시행한 군, 치근활택술후 구연산처리한 군, 치근활택술후 테트라사이클린처리한 군으로 분류하여 치주인대세포에 대한 부착양상을 관찰하였다. 세포증식실험에서는 각군의 시편을 조직배양기에 넣고  $1 \times 10^5$  cells/ml 농도의 치주인대세포를 1 ml씩 넣어 6시간 배양후 새 배양기에 옮겨 24시간, 48시간 및 72시간동안 배양하여 세포수를 측정하였고 세포부착후 주사전자현미경 관찰에서는 각각의 조직배양기에  $1 \times 10^4$  cells/ml의 치주인대세포를 가진 배양액 1 ml 씩을 넣어 배양하여 세포배양개시 후 30분, 6시간, 24시간에 고정후 탈수하고 임계점으로 건조시켜 주사전자현미경을 사용하여 세포부착양상을 관찰하였다.

세포증식실험에서 부착된 세포수가 24, 48, 72시간 모두에서 치근활택군, 구연산처리군, 테트라사이클린처리군순으로 높았고 치근활택군과 테트라사이클린처리군사이에 통계학적 유의성이 있었으며 24, 48시간에서는 구연산처리군과 테트라사이클린처리군사이에 통계학적 유의성이 있어 탈회군이 비탈회군보다 증가된 세포증식을 보였고 테트라사이클린처리군이 구연산처리군보다 증식된 세포수가 많았다.

주사전자현미경관찰에서 모든 군이 24시간 경과 후 전개가 거의 완성되는 양상을 보였고 테트라사이클린처리군의 초기전개가 다소 빠르게 진행됨이 관찰되었으며 테트라사이클린처리군과 구연산처리군이 세포가 부착되는 양상에서 치근활택군보다는 전개가 다소 진전된 양상을 나타내었으나 두 군간에는 유사한 전개가 진행되어 탈회면과 비탈회면의 차이는 나타나나 두 군간의 뚜렷한 차이는 보이지 않았다. 이상의 연구결과 테트라사이클린과 구연산처리가 치근활택술만 시행한 경우보다 치주인대세포의 증식 및 전개에 더 유리하며, 테트라사이클린과 구연산은 치주인대세포의 전개양상은 유사하나 치주인대세포증식에 있어서는 테트라사이클린에서 더 나은 효과가 있었다.

## 참고문헌

1. Stahl, S. S. : Repair potential of the soft tissue root interface, *J. Periodontol.*, 48 : 545-552, 1977.
2. Wirthlin, M. R. : The current status of new attachment therapy, *J. Periodontol.*, 52 : 529-544, 1981.
3. Melcher, A. H. : On the repair potential of periodontal tissues, *J. Periodontol.*, 47 : 256-260, 1976.
4. 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.
5. Register, A. A. : Bone and cementum induction by dentin demineralized in situ, *J. Periodontol.*, 44 : 49-54, 1973.
6. 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.
7. Pitaru, S. and Melcher, A. H. : Organization of and oriented fiber system in vitro by human gingival fibroblasts attached to dental tissue relationship between cells and mineralized and demineralized tissue, *J. Periodont. Res.*, 22 : 6-13, 1987.
8. Register, A. A. and Burdick, F. A. : Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin demineralized in situ I. optimum range, *J. Periodontol.*, 46 : 646-655, 1975.
9. Register, A. A. and Burdick, F. A. : Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin demineralized in situ II. defect repair, *J. Periodontol.*, 47 : 497-505, 1976.
10. Garret, J. S., Crigger, M. and Egelberg, J. : Effect of citric acid on diseased root surfaces, *J. Periodont. Res.*, 13 : 155-163, 1978.
11. Fine, D. H., Morris, M. L., Tabak, L. and Cole, J. D. : Preliminary characterization of material eluted from the roots of periodontally diseased teeth, *J. Periodont. Res.*, 15 : 10-19, 1980.
12. Daly, C. G. : Antibacterial effect of citric acid treatment of periodontally diseased root surfaces in vitro, *J. Clin. Periodontol.*, 9 : 386-392, 1982.
13. 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 : 443-466, 1984.
14. Albair, W. B., Cobb, C. M. and Killoy, W. J. : Connective tissue attachment to periodontally diseased roots after citric acid demineralization, *J. Periodontol.*, 53 : 515-526, 1982.
15. Proye, M. P. and Polson, A. M. : Effect of root surface alterations on periodontal healing. I. surgical denudation, *J. Clin. Periodontol.*, 9 : 428-440, 1982.
16. Proye, M. P. and Polson, A. M. : Repair in different zones of the periodontium after tooth reimplantation, *J. Periodontol.*, 53 : 379-390, 1982.
17. Polson, A. M. and Proye, M. P. : Effect of root surface alterations on periodontal healing. II. citric acid treatment of the denuded root, *J. Clin. Periodontol.*, 9 : 441-454, 1982.
18. Bogle, G. A., Claffey, N. and Egelberg, J. : Healing of horizontal circumferential periodontal defects following regenerative surgery in beagle dogs, *J. Clin. Periodontol.*, 12 : 837-849, 1985.
19. Pettersson, E. C. and Aukhil, I. : Citric acid conditioning of roots affects guided tissue regeneration in experimental periodontal wounds, *J. Periodont. Res.*, 21 : 543-552, 1986.



20. Shiloah, J. : The clinical effects of citric acid and laterally positioned pedicle flaps in the treatment of denuded root surfaces. A pilot study, *J. Periodontol.*, 51 : 652-654, 1980.
21. Miller, P. D. Jr. : Root coverage using a free soft tissue autograft following citric acid application. Part I : Technique, *Int. J. Perio. Resto. Dent.*, 2 : 65-70, 1982.
22. Miller, P. D. Jr. : Root coverage using the free soft tissue autograft following citric acid application. II : Treatment of the carious root, *Int. J. Perio. Resto. Dent.*, 3 : 38-41, 1983.
23. Miller, P. D. Jr. : Root coverage using the free soft tissue autograft following citric acid application. III : A successful and predictable procedure in areas of deep-wide recession, *Int. J. Perio. Resto. Dent.*, 5 : 14-37, 1985.
24. Genco, R. J. : Antibiotics in the treatment of human periodontal disease, *J. Periodontol.*, 52 : 545-558, 1981.
25. 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.
26. 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, *J. Periodont. Res.*, 18 : 516-526, 1983.
27. Al-Ali, W., Bissada, N. F. and Greenwell, H. : The effect of local doxycycline with and without tricalcium phosphate on the regenerative healing potential of periodontal osseous defects in dogs, *J. Periodontol.*, 60 : 582-590, 1989.
28. Pepelassi, E. M., Bissada, N. F., Greenwell, H. and Farah, C. F. : Doxycycline-tricalcium phosphate composite graft facilitates osseous healing in advanced periodontal furcation defects, *J. Periodontol.*, 62 : 106-115, 1991.
29. Terranova, V. P., Franzetti, L. C., Hic, S., Diflorio, R. M., Lyall, R. M., Wikesj, 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.
30. Claffey, N., Bogle, G., Bjorvatn, K., Selvig, K. and Egelburg, J. : Topical application of tetracycline in regenerative periodontal surgery in beagles, *Acta. Odontol. Scand.*, 45 : 141-146, 1987.
31. Frantz, B. and Polson, A. : Tissue interactions with dentin specimens after demineralization using tetracycline, *J. Periodontol.*, 59 : 714-721, 1988.
32. Wikesj, U. M. E., Claffey, N., Christersson, L. A., Franzetti, L. C., Genco, R. J., Terranova, V. P. and Egelberg, J. : Repair of periodontal furcations defects in beagle dogs following reconstructive surgery including root surface demineralizing with tetracycline hydrochloride and topical fibronectin application, *J. Clin. Periodontol.*, 15 : 73-80, 1988.
33. Wikesj, 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.
34. 김종우, 최상묵 : 치근면 탈회 및 fibronectin 도포가 치은조섬유아세포 부 착에 미치는 영향에 관한 실험적 연구, *대한치주과학회지*, 18 : 1-19, 1988.
35. 이상엽, 최상묵 : 정상 및 이환백악질에 대

- 한 치은조섬유아세포의 부착에 관한 전자현미경적 연구, 대한치주과학회지, 17 : 105-114, 1987.
36. 이향, 박준봉 : 치근면의 구연산 탈회가 치은섬유아세포의 부착 및 증식에 미치는 영향, 대한치주과학회지, 18 : 163-172, 1988.
  37. 정보미, 정현주 : 염산 Tetracycline으로 처리된 치근면에 대한 섬유아세포의 부착효과, 대한치주과학회지, 19 : 108-114, 1989.
  38. Hou, L. T. and Yaeger, J. A. : Cloning and characterization of human gingival and periodontal ligament fibroblasts, J. Periodontol., 64 : 1209-1218, 1993.
  39. Piche, J. E., Carnes, Jr. D. L. and Graves, D. T. : Initial characterization of cells derived from human periodontia, J. Dent. Res., 68 : 761-767, 1989.
  40. Somerman, M. J., Archer, S. Y., Imm, G. M. and Foster, R. A. : A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro, J. Dent. Res., 67 : 66-70, 1988.
  41. Somerman, M. J., Foster, R. A., Imm, G. M., Sauk, J. J. and Archer, S. Y. : Periodontal ligament cells and gingival fibroblasts respond differently to attachment factors in vitro, J. Periodontol., 60 : 73-77, 1989.
  42. 서조영, 최제용, 유현모, 박준봉, 조준승 : 치주인대세포와 치은섬유아세포의 성장에 관한 비교, 대한구강생물학회지, 15 : 14-28, 1991.
  43. Fernyhough, W. and Page, R. C. : Attachment, growth and synthesis by human gingival fibroblasts on demineralized or fibronectin-treated normal and demineralized tooth roots, J. Periodontol., 54 : 133-140, 1983.
  44. 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.
  45. Baran, C., Ozcan, G., Yalim, M., Yokoya, Y., Hasegawa, K. and Balos, K. : Effect of citric acid treatment on initial attachment of human periodontal ligament fibroblast-like cells(in vitro), J. Japan. Ass. Periodont., 34 : 187-193, 1992.
  46. 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.
  47. 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.
  48. Tsukuda, 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.
  49. Demirel, K., Baer, P. N. and McNamara, T. F. : Topical application of doxycycline on periodontally involved root surfaces in vitro : Comparative analysis of substantivity on cementum and dentin, J. Periodontol., 62 : 312-316, 1991.
  50. Klebe, R. J. : Isolation of a collagen-dependent cell attachment factor, Nature, 250 : 248-251, 1974.
  51. 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.
  52. Garant, P. R. and Cho, M. I. : Cytoplasmic polarization of periodontal ligament fibroblasts, J. Periodont. Res., 14 : 95-106, 1979.
  53. 이상구, 서조영, 박준봉 : 치근면 구연산 도포가 치주인대세포의 부착과 전 개에 미치는

- 는 영향, 대한치주과학회지, 23 : 77-96, 1993.
54. Hanes, P. J., O'Brien, N. J. and Garnick, J. J. : A morphological comparison of radicular dentin following root planing and treatment with citric acid or tetracycline HCl, J. Clin. Periodontol., 18 : 660-668, 1991.
55. 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.
56. 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.

## EXPLANATION OF FIGURES

- Fig. 2. The root planed surface after 30 mins.
- A few PDL cells are attached and show round appearance(Bar- : 100 $\mu$ m).
  - PDL cell attached by basal cytoplasmic process is mostly covered by blebs (Bar- : 50??).
- Fig. 3. The citric acid treated surface after 30 mins.
- Attached PDL cells are more than Fig.2a(Bar- : 100 $\mu$ m).
  - PDL cells are more or less flattened and spreaded(Bar- : 50 $\mu$ m).
- Fig. 4. The tetracycline HCl treated surface after 30 mins.
- There are slightly increased proportion of flattened PDL cells. Exposed dentinal tubules are observed(Bar- : 100 $\mu$ m).
  - PDL cells are more spreaded than Fig.3b(Bar- : 50 $\mu$ m).
- Fig. 5. The root planed surface after 6 hrs.
- PDL cells have elongated form(Bar- : 100 $\mu$ m).
  - The nucleus is elongated and shows fusiform appearance. Root surface is observed through thinly spreaded cytoplasm(Bar- : 10 $\mu$ m).
- Fig. 6. The citric acid treated surface after 6 hrs.
- PDL cells are more elongated with polarity(Bar- : 100 $\mu$ m).
  - The nucleus is located at the periphery of the cell and has elongated form (Bar- : 10 $\mu$ m).
- Fig. 7. The tetracycline HCl treated surface after 6 hrs.
- The widely spreaded cells are connected with adjacent cells(Bar- : 100 $\mu$ m).
  - The cell shape is similar to the citric acid treated after 6hrs.(Bar- : 10??).
- Fig. 8. The root planed surface after 24 hrs.
- Elongated cells have a distinct polarity(Bar- : 100 $\mu$ m).
  - The nucleus is not almostly recognized(Bar- : 50 $\mu$ m).
- Fig. 9. The citric acid treated surface after 24 hrs.
- PDL cells are more elongated than root planed group, have numerous processes and is connected to each other with processes(Bar- : 100 $\mu$ m).
  - There are many cells with fusiform appearance(Bar- : 50 $\mu$ m).
- Fig. 10. The tetracycline HCl treated surface after 24 hrs.
- The cell morphology of the tetracycline treated group is similar to the citric acid treated group(Bar- : 100 $\mu$ m).
  - The spreading of cell was almostly completed(Bar- : 50 $\mu$ m).

## 논문사진부도( I )

## 논문사진부도(Ⅱ)

### 논문사진부도(Ⅲ)

## THE COMPARISON OF CITRIC ACID AND TETRACYCLINE HCL ON TREATED ROOT SURFACES ON THE PROLIFERATION AND SPREADING OF PERIODONTAL LIGAMENT CELLS

Jae-Wan Park, Jae-Mok Lee, Jo-Young Suh

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

The purpose of this study was to compare the effects of citric acid and tetracycline HCl application to the root surfaces of periodontally diseased teeth on the proliferation and spreading of human periodontal ligament cells. The roots were prepared so that the comparison could be made among root planed, citric acid treated and tetracycline HCl treated surfaces.

In the cell proliferation experiment, human periodontal ligament cells at a concentration of  $1 \times 10^5$  cells/ml were seeded in each culture well with specimens and incubated for 6 hours. Then, the specimens were transferred to a fresh culture well and incubated for 24, 48, 72 hours respectively. The cell counting was done after trypsinization.

In the cell spreading experiment,  $1 \times 10^4$  cells/ml were seeded in each culture well and incubated for 30min, 6 hours and 24 hours at  $37.5^\circ\text{C}$  in a  $\text{CO}_2$  incubator. Then, all specimens were fixed with phosphate buffered glutaraldehydes, postfixed with phosphate buffered osmium tetroxide, stained with phosphate buffered tannic acid, dehydrated in ethanol, dried at a critical point, coated with gold and examined under a scanning electron microscope.

The results were as follows :In the cell proliferation experiments, the number of attached cells increased more in the tetracycline treated group than in the other groups. In the initial attachment, the appearance of the tetracycline treated the groups was slightly more spread out than in the other groups. After 6 hours of incubation, it was observed in most of the cells that cell morphologic alteration went from ovoid shapes to spindle shapes. After 24 hours of incubation, the cells of all groups had a fusiform appearance and were connected to each other by numerous cytoplasmic processes.

The tetracycline and citric acid treated groups had a similar spreading appearance of periodontal ligament cells, but the tetracycline treated group was more effective in the cell proliferation than the citric acid group.