

Fluoride, Bisphosphonate 및 Gallium이 상아질 흡수 억제에 미치는 영향

연세대학교 치과대학 치과보존학교실

백은영 · 유윤정* · 노병덕 · 최윤정* · 이승중

Abstract

THE EFFECT OF FLUORIDE, BISPHOSPHONATE AND GALLIUM ON DENTIN RESORPTION IN VITRO

Eun-Young Baek · Yun-Jung Yu · Byoung-Duck Roh
Yun-Jeong Choi* · Seung-Jong Lee

Dept. of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Yonsei University

Replacement resorption is followed by the delayed replantation of an avulsed tooth. Currently no effective treatment is substantiated for replacement resorption. The purpose of this study was to investigate the effect of stannous fluoride, bisphosphonate (etidronate disodium) and gallium nitrate, which have been shown to reduce dentin resorption, on human dentin. Osteoclasts were collected from tibiae of chick embryo. The cells were well agitated to prevent adhesion and seeded onto the sliced human dentin wafers which had been soaked in either culture media(control), or several different concentrations of stannous fluoride, etidronate disodium (1-hydroxyethylidene -1,1-bisphosphonate disodium), and gallium nitrate. Resorption was measured by counting the number of resorptive pit produced by the cells. Results are as follows. Stannous fluoride and etidronate disodium showed statistically significant reduction of dentin resorption($p < 0.05$) but the effect of stannous fluoride seemed to be its high cytotoxicity. Etidronate disodium did not show cytotoxicities in all experimented concentrations. Gallium nitrate did not show differences in resorption either between different concentrations or from the control group.

Key words : stannous fluoride, etidronate disodium, bisphosphonate, gallium nitrate, resorption pit, cytotoxicity, osteoclast.

I. 서 론

치과 임상에서 외상 등에 의한 악안면 손상의 일부로 치조골로부터 치아가 탈락된 경우를 흔히 경험 할 수 있다. Andreasen⁶⁾에 의하면 치아 탈구가 영구 치열 손상의 1~16%를 차지하며 유치열에서는 7~13%를 차지한다고 했다. 외상으로 인해 치조와로부터 완전히 탈구된 치아를 다시 원래의 치조와내로 삽입하여 그 기능을 회복시키는 것을 치아재식이라고 하는데, 탈구된 치아를 재식할 때 발생하는 가장 큰 문제는 치근흡수이며, 치근흡수의 정도는 치아 발육 정도⁵⁾, 탈구 후 재식까지의 시간^{5, 8, 63, 71)}, 치주인대의 손상 정도^{63, 71)}, 탈구된 치아의 보관 조건^{8, 15, 16)} 등에 영향을 받는다.

치아 재식 후 세가지 유형의 치근 흡수가 일어날 수 있는데⁴⁴⁾, 첫 번째 유형의 치근흡수는 표면 흡수(surface resorption)로써 치아가 탈구될 때 기계적 손상을 받은 치근 백악질 표면에 얇고 작은 흡수와가 발생하는 것을 말한다. 이러한 표면흡수는 새로운 백악질이 생성되면 저절로 치유가 된다고 했다⁷⁾. Seltzer등⁶²⁾은 전 치부의 약 62%, 구치부의 98%에서 이러한 표면 흡수를 발견할 수 있었다고 했으나, 방사선상으로는 감지할 수 없었다고 했다. 두번째 유형의 치근 흡수는 염증성 흡수(inflammatory resorption)로써 근관내의 괴사성 조직에 의해 야기된 치주인대의 염증 반응으로 인한 파치세포의 지속적인 자극에 의하여 유발되는 것으로 재식후 2주쯤부터 볼수 있으며 몇 달내에 치아 탈락을 일으킬 수 있다는 보고가 있다⁹⁾. 염증성 흡수는 근관치료에 의해 염증이 있는 괴사된 치수를 제거 함으로써 예방할 수 있다²³⁾. 세번째로는 대체성 치근흡수(replacement resorption)⁴⁴⁾가 있는데 골성유합(ankylosis)이라고도 하며 임상에서 재식 치아의 infraposition이 있거나 혹은 타진에 금속성 소리가 나는 것에 의해 진단할 수 있다. 방사선 상으로는 치근이 골질로 대체되고 정상적인 치주인대 공간이 소실되는 것으로 알 수 있다. Andreasen⁹⁾은 치아 재식후 약 3개월에 치근쪽 1/3에서 이러한 대체성 치근흡수를 종종 볼수가 있으며 대부분의 경우

1년 이내에 일어난다고 보고 하였다. 골성유합이 일어나는 기전은 아직 확실하게 밝혀지지는 않았으나 치주인대의 생활력이 중요하다고 보고 되고 있다^{42, 63, 71)}. 치주인대의 생활력은 탈구후 재식까지의 시간^{5, 8, 63, 71)}과 탈구된 치아의 저장 방법^{8, 15, 16)} 등에 의하여 영향을 받을 수 있다.

Chamber등²³⁾은 초기에 근관 치료를 함으로써 재식 치아의 염증성 흡수를 없앨 수는 있었지만 6년의 관찰 기간 동안 재식 치아의 100%에서 골성 유합을 관찰하였다고 보고 하였다. Hammarström등⁴²⁾은 정상 골의 재형성(remodeling)을 일으키는 것과 같은 방식으로 치근흡수를 일으키는 세포가 자극을 받아 치근이 지속적으로 흡수되어 치조골이 치아 경조직과 유합됨을 보고하였다. Tronstad⁷⁰⁾은 이를 파골세포의 '실수(mistake)'로 인한 것이라 하였는데 일단 치근의 치주인대가 제거되면 파골세포가 백악질, 상아질, 골을 구분하지 못하고 모든 경화된 조직을 흡수하여 새로운 골로 대체하게 된다고 보고하였다. Pierce⁵³⁾는 외상후 노출된 치근면이 파골세포의 화학주성인자(chemoattractant)로서의 역할을 할 수 있다고 보고하였다. Andersson⁴⁾은 골성 유합에 대한 효과적인 치료는 없다고 하였다.

골 흡수는 골을 구성하고 있는 유기 성분과 무기 성분이 제거 되는 것으로 경조직을 흡수하는 세포들은 일반적으로 다핵세포이며 세포 표면적이 상당히 크고 흡수하는 조직쪽으로 투명대(clear zone), 변연 주름(ruffled border)이 나타나는 특징을 보이는데^{19, 26, 39)}, 골표면에 직접 접촉하여 골을 흡수하는 이러한 세포를 파골세포라 부르며 이러한 세포에 의한 경조직 흡수 기전에 대해서는 최근에 이르러서야 많은 부분이 밝혀졌다¹⁹⁾. 이 세포들은 흡수하는 조직에 따라 파골세포, 파연골세포, 파치세포로 불리우지만 비슷한 형태와 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 파치세포도 골을 흡수하는 다른 세포들과 마찬가지로 다수의 핵을 보이는 거대세포로 변연 주름과 투명대가 나타나지만 불명확한 투명대를 보이며 핵의 수효는 비교적 적어 통계적으로 7~8개를 보인다고 하였다¹⁾. 이와는 달리 주사전자현미경을 이용한 연구들

에서는 파치세포, 파연골세포, 파골세포에서 미세 구조상 별다른 차이를 발견할 수는 없었다고 하였다.

Chamber²⁴⁾가 파골세포를 기계적으로 분리하는데 성공한 이후 Chamber와 Magnus²⁷⁾는 쥐에서 파골세포를 분리하여 시험관에서 배양하여 Calcitonin의 효과를 관찰 하였으며, Boyde²⁰⁾은 파골세포가 시험관에서 상아질을 흡수하는 양상을 관찰하였고 Jones⁴⁹⁾은 포유류 및 조류의 파골세포를 장골에서 분리하여 비탈회 및 탈회 치아 경조직의 흡수 양상을 주사전자현미경으로 관찰하고 경조직의 종류나 파골세포를 얻어낸 동물의 종에 관계 없이 흡수가 관찰된다고 보고하였다. Sasaki⁵⁰⁾도 쥐의 골수세포로부터 파골세포를 얻어 상아질에서의 흡수 양상을 관찰하였다.

파골세포의 작용에 영향을 미치는 약제에 대해서는 상당히 많은 연구가 이루어져 왔다. 파골세포에 의한 골흡수 작용을 억제하는데 영향을 줄 수 있는 인자로는 칼시토닌, 불소, bisphosphonate, gallium 등 여러 약제에 대한 연구 보고가 있다. 불소의 경우, Posner⁵⁴⁾은 불소가 치아의 백악질 혹은 상아질에 결합하여 fluorapatite를 형성하여 결정 크기가 증가하여 용해에 저항성을 가지게 한다고 하였으며 Goldhaber³⁷⁾는 치아와 불안정하게 결합된 불소가 유리되어 파골세포의 효소 활성을 억제시킬 수 있다고 보고하였다. Paget's disease⁴⁹⁾나 골다공증 치료⁷⁴⁾에 임상적으로 많이 사용되고 있는 bisphosphonate는 아직 골흡수 억제 기전이 확실하게 밝혀 지지는 않았지만 파골세포의 강력한 대사 억제제로서의 작용이 밝혀지고 있으며 다수의 연구 보고에서 실험 동물에서나 인간의 임상 실험에서도 골흡수를 감소 시킨다는 것이 증명되었다. Gallium의 경우는 악성 고칼슘혈증⁷³⁾에 칼시토닌이나 bisphosphonate보다 오히려 골흡수 억제의 효과가 뛰어난 것으로 임상적으로 증명이 되었는데, Bockman¹⁸⁾은 gallium이 수산화인회석의 형성과 성숙을 촉진하고 칼슘과 인이 많이 함유된 크고 완전한 결정을 형성하여 흡수에 큰 저항성을 가진다고 하였으며, Warrel⁷³⁾은 골의 흡수와(resorption

pit) 생성의 감소는 gallium이 파골세포를 직접적으로 억제하고 조골세포를 coupling기전에 의해 간접적으로 억제시킨다고 주장하였다. Gallium의 골흡수 억제 기전도 역시 아직 확실하게 밝혀지지 않는 것이다.

이탈된 치아의 외흡수는 치과 임상에서 매우 큰 관심의 대상이다. 이의 방지를 위하여 여러 연구 보고가 있었으나 만족스런 결과를 얻지 못한 상태이다. 이에 저자는 파골세포를 억제하는 영향을 줄 수 있는 약제 중에서 치과 임상에서 흔히 사용되고 있는 불소 제제와 bisphosphonate 제제 중에서는 제1세대인 etidronate disodium, 그리고 gallium nitrate를 선택하여 사람의 상아질 시편에 전처리하여 파골세포에 의한 상아질 흡수의 억제 효과에 대한 다소의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 연구 재료 및 방법

가. 연구 재료

1. 상아질 시편 형성

최근 발치된 균열이 없는 건전 영구치 대구치를 선택하여 70% ethanol에 저장 하였다. 치관과 치근에 잔류된 조직을 scaler로 제거하고 각 치아의 치관부를 레진에 매몰하여 1.5cm×1.5cm×1.5cm의 block을 제작한 후 hard tissue microtome을 이용하여 치아 장축에 평행하도록 3mm×3mm×0.5mm의 상아질 시편을 제작한 후 70% ethanol에 저장하였다. 이때 세포 배양하는 면을 알 수 있도록 반대쪽 면에 연필로 표시를 하였다. 후에 도말층을 제거하기 위해 상아질 시편을 10% citric acid용액에 1초간 산처리 한후 2분간 소독된 식염수에 담가 두었다가 200 unit/ml penicillin, 200µg/ml streptomycin 및 0.5µg/ml amphotericin B가 함유된 α-MEM배지(이하 세포배양배지라 칭함, Gibco, Gaithersburg, MD, U.S.A.)로 세번 세척한 다음 실험 용액과 식염수에 37°C에서 48시간 동안 보관하였다가 상아질 시편을 96 well plate의 각 well에 1개씩 넣었다.

2. 실험 용액 제조

①Stannous fluoride 분말(Mallinckrodt chemical works, St Louis, U.S.A.)로부터 0.1%와 0.5%의 stannous fluoride 용액을 제조하였다.

②Etidronate disodium(1-hydroxyethylene-1, 1-bisphosphonate disodium) 분말(초당 co. Korea)로부터 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M의 etidronate disodium 용액을 제조하였다.

③Gallium nitrate 분말(Sigma, St Louis, U.S.A.)로부터 1.0×10^{-4} M, 2.0×10^{-4} M, 3.9×10^{-4} M의 gallium nitrate 용액을 제조하였다.

나. 연구 방법

1. 파골세포 분리

닭의 수정란을 19일간 37°C , 70% 습도의 향온기(Forma Scientific, Inc., U.S.A.)에 보관한 후 수정란으로부터 embryo를 꺼내 경골을 분리하여 근육과 골막을 제거하였다. 세포배양배지가 5ml 놓여져 있는 시험관에 소독된 가위로 경골을 잘게 잘라 넣고 시험관을 2분동안 vibration한후 10번 pipetting 하여 파골세포가 물리적으로 떨어져 나오게 하였다. 분리한 골세포 부유액을 2겹의 망(직경 100um)을 통과시킨후 각 약제로 처리한 상아질 시편이 들어 있는 96 well plate의 각 well당 $180\mu\text{l}$ 씩 분주하였고 fetal bovine serum(FBS, Gibco, Gaithersburg, MD, U.S.A.) $20\mu\text{l}$ 를 각각의 well에 첨가하여 37°C , 5% CO_2 향온향습기에서 48시간동안 배양하였다. 파골세포는 표면에 잘 붙는 성질을 지녔으므로 파골세포의 부착을 막기 위하여 골세포 배양배지, 피펫 및 용기는 4°C 를 유지하였다.

2. 파골세포 확인

분리한 골세포내에 파골세포가 존재하는지를 확인하기 위하여 배양한 골세포를 파골세포 표지 효소인 tartrate 저항성 산성인산분해효소(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP) 검색 kit (Sigma, St Louis, U.S.A.)로 TRAP 염색을 실시하였다.

TRAP 염색을 위하여 분리한 골세포를 24 well plate에서 48시간동안 배양한 후 25ml citrate 용액(18mmol/L citric acid, 9mmol/L sodium citrate, 12mmol/L sodium chloride, surfactant)과 65ml acetone, 8ml 37% formaldehyde가 혼합된 고정액으로 30초간 고정하고 37°C 증류수로 세척하였다. 그후 0.5ml Fast Garnet GBC Base 용액(7.0mg/mL), 0.5ml sodium nitrate 용액(0.1mol/L), 45ml 증류수, 0.5ml naphthol AS-BI phosphate 용액(12.5mg/mL), 2.0ml acetate 용액(2.5mol/L), 그리고 1.0ml tartrate 용액(0.335mol/L)이 함유된 혼합액으로 고정된 세포를 37°C 에서 1시간 염색하고, 위상차현미경(Olympus, Japan)상에서 핵이 두 개 이상인 TRAP 양성 다핵세포(파골세포)의 존재를 관찰하였다. 상아질 시편 표면의 파골세포를 주사전자현미경(Hitachi, Japan)으로 관찰하기 위해서는 배양이 완료된후 시편을 꺼내 0.1M cacodylate 완충용액(pH 7.4)에 각각 5분씩 두 번 수세하고 2.5% glutaraldehyde (0.1M cacodylate 완충액, pH 7.4)용액 4°C 에서 1시간 동안 전고정하여 세척한 후 1% osmium tetroxide(0.1M cacodylate 완충액, pH 7.4)용액 4°C 에서 후고정하고 알콜 농도를 50%에서 서서히 100%로 높여가며 탈수시킨 후, 액체 이산화탄소를 이용하여 critical point drying시켜 gold-palladium으로 피복하여 관찰하였다.

3. 흡수와 개수 측정

48시간동안 골세포를 배양한 상아질 시편을 5% NaOCl에 10분간 처리하여 세포를 제거하고 잔류된 NaOCl을 제거하기 위해 증류수로 세번 세척하였다. 1% toluidine blue(Sigma, St Louis, U.S.A.)로 5분간 염색하여 증류수에 네번 세척하고 건조시켜 광학현미경(Olympus, Japan)을 이용하여 상아질 시편 표면에 생긴 흡수와의 개수를 세었다.

흡수율을 확인하기 위하여 시편을 주사전자현미경으로 관찰하였다.

4. 세포 독성 검사

본실험에서 사용한 약제(stannous fluoride,

etidronate disodium, gallium nitrate)의 세포 독성 유무를 확인하기 위하여 다음과 같이 MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-di-phenyl-tetrazolium bromide, Sigma, St Louis, U.S.A.) 검정을 실시하였다. 연세대학교 부속 치과병원 치주과에 내원한 환자의 치은조직으로부터 분리 배양한 치은 섬유아세포를 FBS가 10%로 함유된 세포배양배지 0.2ml당 5×10^3 개 되도록 부유한후 96-well plate(Corning Co., U.S.A.)의 각 well당 부유액을 0.2ml씩 분주하였다. 그 후 37°C, 5% CO₂ 항온항습기에서 24시간 배양하여 세포를 부착시킨 다음, 세포 배양액을 제거한 후, 각 약제가 일정한 농도로 함유되어 있으며 FBS가 10%로 함유된 세포배양배지를 각 well에 0.2ml씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ 항온항습기에서 30분, 24시간 및 72시간 배양하였다. 대조군에는 FBS가 10%로 함유된 세포배양배지 0.2ml만을 분주하였다. 각 배양이 끝난후 phosphate-buffered saline(PBS)에 녹인 MTT 용액(5mg/ml) 0.05ml을 각 well에 넣고 4시간 동안 반응시킨 후 배지와 MTT용액을 버리고 여기에 다시 dimethylsulfoxide(DMSO) 0.05 ml을 각 well에 넣고 결정이 남아 있지 않도록 잘 흔든 후에 ELISA reader(Bio-tek Instruments Inc., U.S.A.)로 570nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 각 약제에 의한 세포 독성 정도를 평가하였다.

5. MultiTest™slide(Millenium® Biologix, Canada)에 의한 흡수와 면적 측정

Etidronate disodium이 흡수와 형성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 단위 면적화된 얇은 인공 골편이 깔려있는 MultiTest™slide에서 아래와 같이 평가하였다. MultiTest™slide에 식염수 및 $10^{-6}M$, $10^{-5}M$, $10^{-4}M$ 의 etidronate disodium 용액을 48시간동안 넣었다가 제거하고, 상아질 시편에서 시행했던 것과 같은 방법으로 골세포를 배양하여 파골세포에 의해 흡수된 면적을 Microst(Millenium® Biologix, Canada)로 측정하여 골흡수 면적을 %로 나타내었다.

6. 실험 자료의 분석

대조군과 각 실험 용액의 각 농도에 따른 유의차를 비교하기 위하여 비모수 검정법의 연속형인 Mann-Whitney U test로 분석하였으며, p값 0.05 이하를 통계적으로 유의한 수준으로 판정하였다.

III. 연구성적

1. 파골세포 확인

파골세포의 존재 확인에 이용되는 방법중의 한가지인 TRAP 염색을 실시한 후 위상차현미경으로 관찰한 결과, 분리한 골세포 내에서 TRAP 양성 반응을 보이며 핵을 두개이상 가진 붉은색의 다핵 거대세포 즉 파골세포의 존재를 확인할 수 있었다(사진 1).

주사전자현미경상에서는 직경이 약 30μm이며 판상돌기(lamellipodia)가 잘 발달되어 얇게 퍼져서 상아질 표면을 덮고 있는 파골세포를 확인할 수 있었다(사진 2).

2. 흡수와 관찰

광학현미경하에서 toluidin blue로 진하게 염색된 흡수위를 확인할 수 있었으며 염색된 흡수위는 원형 또는 타원형의 형태를 보였다(사진 3).

주사전자현미경 관찰에서는 주위의 상아질과 뚜렷하게 구분되는 경계가 있는 분화구 형태의 흡수위를 보였으며 흡수위에는 확장된 상아세관이 뚜렷하게 노출되어 있었다(사진 4).

3. 흡수와 형성에 대한 약제의 영향 평가

대조군과 각 실험 용액의 각 농도에 따라 파골세포에 의하여 형성된 상아질 흡수 정도를 평가하기 위하여 광학현미경 하에서 toluidin blue로 염색된 흡수위의 개수를 세어 평가하였다.

①stannous fluoride군(Fig. 1)

Stannous fluoride가 파골세포에 의한 상아질 흡수에 미치는 영향을 평가하기 위하여 식염수에 저장했던 대조군 시편과 0.1%와 0.5% stannous fluoride에 저장했던 실험군 시편에서 형성된 흡수와의를 세었다. 네번의 반복된 실험으로부터 대조군의 경우는 평균 10.0 ± 1.9 개의 흡수와의가 형성된 반면, stannous fluoride 0.1% 용액과 0.5% 용액 실험군에서는 흡수와의를 형성하지 못하였다.

②etidronate disodium군(Fig. 2)

대조군과 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M의 etidronate disodium용액을 처리한 실험군에서 흡수와 개수를 비교하였다. 네번의 반복된 실험으로부터 대조군의 경우 형성된 흡수와의는 평균 18.3 ± 2.8 개로 나타났고 10^{-6} M etidronate disodium군은 18.9 ± 3.3 개, 10^{-5} M의 etidronate disodium군은

5.8 ± 1.3 개, 10^{-4} M의 etidronate disodium군은 6.1 ± 2.0 개의 흡수와의가 형성되었으며 각군의 형성된 흡수와 개수를 통계학적으로 비교하여 보면, 대조군과 10^{-6} M etidronate disodium군 사이에는 유의성 있는 차이가 없었으나, 대조군과 10^{-5} M etidronate disodium군, 대조군과 10^{-4} M의 etidronate disodium군 사이에는 유의성 있는 차이가 있었다($P < 0.05$).

③gallium nitrate군(Fig. 3)

대조군과 1.0×10^{-4} M, 2.0×10^{-4} M, 3.9×10^{-4} M의 gallium nitrate용액을 처리한 실험군에서 얻은 흡수와 개수를 비교하였다. 네번의 반복된 실험으로부터 대조군의 경우 형성된 흡수와의는 평균 9.2 ± 2.6 개로 나타났고 1.0×10^{-4} M gallium nitrate군은 10.6 ± 3.4 개, 2.0×10^{-4} M gallium nitrate군은 8.6 ± 2.2 개, 3.9×10^{-4} M의 gallium nitrate군은 7.5 ± 2.6 개의 흡수와의가 형성

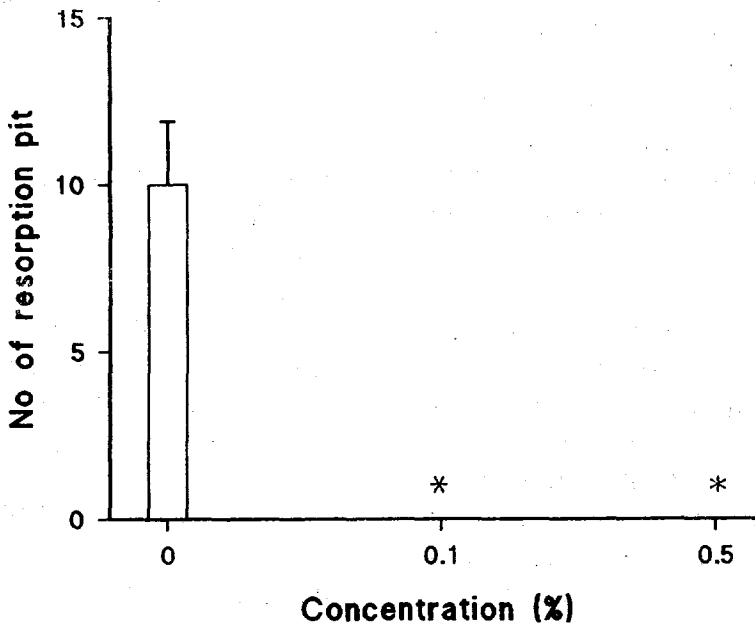


Fig. 1. Effects of stannous fluoride on formation of resorption pit on dentin slice. Osteoclasts were cultured on dentin slices untreated or treated with 0.1%, 0.5% stannous fluoride. After 48hrs, number of resorption pits on dentin slices were counted under light microscope. Data are expressed as the mean \pm S.E. of 4 experiments. * $p < 0.05$ compared to non-treated group corresponding to each concentrations.

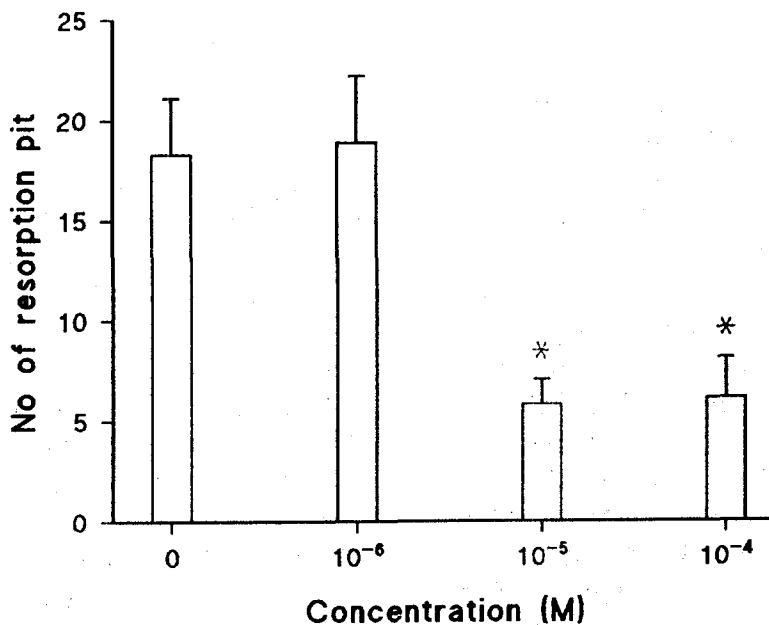


Fig. 2. Effects of etidronate disodium on formation of resorption pit on dentin slice. Osteoclasts were cultured on dentin slices untreated or treated with 10⁻⁶M, 10⁻⁵M, 10⁻⁴M etidronate disodium. After 48hrs, number of resorption pits on dentin slices were counted under light microscope. Data are expressed as the mean ± S.E. of 4 experiments. *p<0.05 compared to non-treated group corresponding to each concentrations.

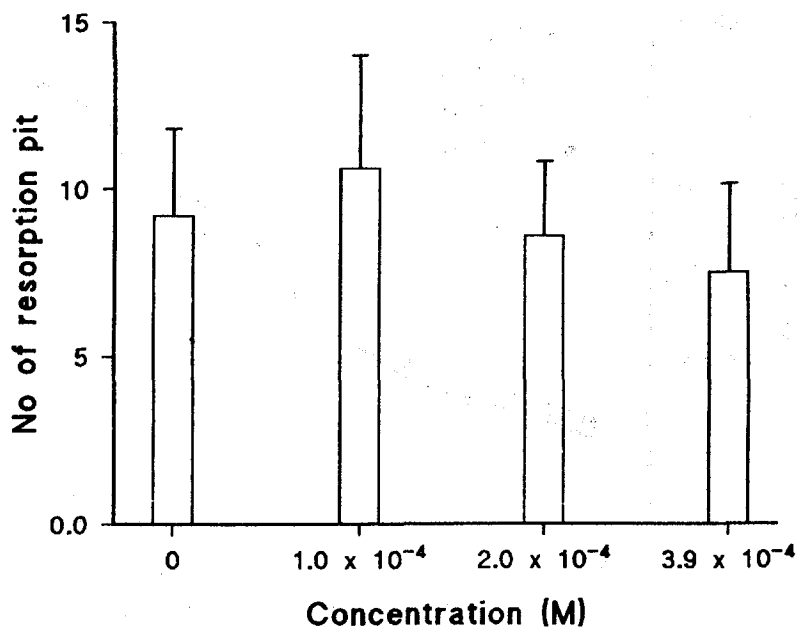


Fig. 3. Effects of gallium nitrate on formation of resorption pit on dentin slice. Osteoclasts were cultured on dentin slices untreated or treated with 1.0×10⁻⁴M, 2.0×10⁻⁴M, 3.9×10⁻⁴M gallium nitrate. After 48hrs, number of resorption pits on dentin slices were counted under light microscope. Data are expressed as the mean ± S.E. of 4 experiments. *p<0.05 compared to non-treated group corresponding to each concentrations.

되었으며 각군의 형성된 흡수와 개수를 통계학적으로 비교하여 보면, 대조군과 각 실험군 사이에는 유의성 있는 차이가 없었다.

5. 세포 독성 검사

①stannous fluoride군 (사진 5)

Stannous fluoride를 세포 독성 평가를 위한 배지에 용해시키면 곧 침전물이 생성되기 시작하였으며 이러한 침전물로 인하여 흡광도 평가에 방해가 주어 올바른 수치를 얻을 수 없었으므로 MTT 검정을 시행할 수가 없었다. 광학 현미경 관찰에서 배지에 있던 모든 치은 섬유아 세포가 시약 첨가 후 모양이 둥글게 변한 것으로 보아 생활력을 잃은 것을 알 수 있었다. 이로써 stannous fluoride의 세포 독성이 매우 큰 것을 알 수 있었다.

②etidronate disodium군 (Fig. 4)

실험 용액을 첨가하지 않은 정상 대조군의 경우에는 흡광도가 배양 30분후 0.117 ± 0.005 에서 1일째에는 0.167 ± 0.012 , 3일째에는 0.541 ± 0.012 로 증가하였다. Etidronate disodium을 첨가 한 경우에는 10^{-6} M군의 흡광도는 배양 30분후 0.109 ± 0.005 , 1일째에는 0.168 ± 0.009 , 3일째에는 0.483 ± 0.032 로 증가하였고 10^{-5} M군의 흡광도도 배양 30분후 0.107 ± 0.005 에서 1일째에는 0.159 ± 0.004 , 3일째에는 0.525 ± 0.011 로 증가하였다. 10^{-4} M군의 흡광도도 또한 배양 30분후 0.127 ± 0.005 에서 1일째에는 0.189 ± 0.01 , 3일째에는 0.53 ± 0.007 로 증가하였다. 이상의 결과로 모든 농도의 실험용액에서 대조군과 유의차가 없는 것으로 평가되었다.

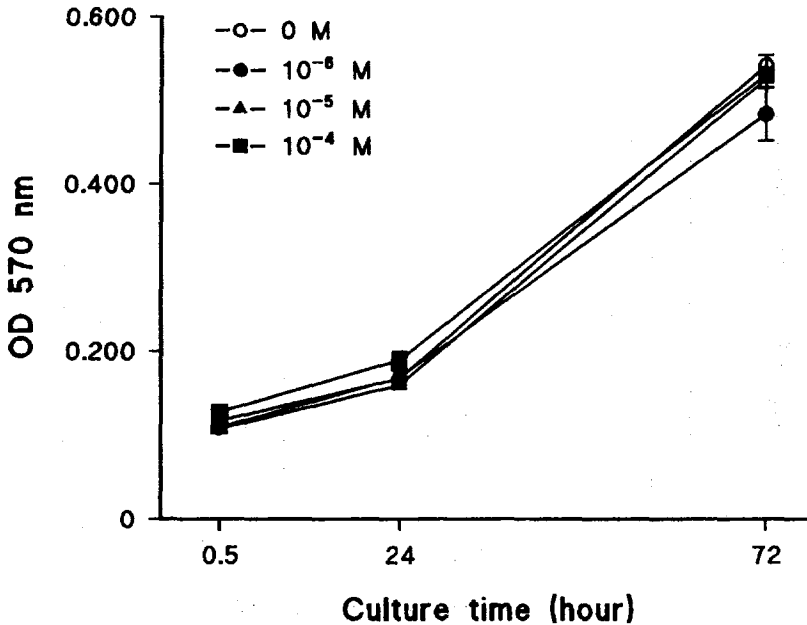


Fig. 4. Cytotoxic effect of etidronate disodium on gingival fibroblasts. Gingival fibroblasts were cultured in medium with or without 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M etidronate disodium. After 0.5hr, 24hrs, 72hrs, cell proliferations were estimated by MTT method. Data are expressed as the mean \pm S.E. * $p < 0.05$ compared to non-treated group corresponding to each concentrations.

③gallium nitrate군(Fig. 5)

실험 용액을 첨가하지 않은 정상 대조군의 경우에는 흡광도가 배양 30분후 0.246 ± 0.005 에서 1일째에는 0.364 ± 0.015 , 3일째에는 0.605 ± 0.020 로 증가하였다. Gallium nitrate를 첨가한 경우에는 1.0×10^{-4} M군의 흡광도는 배양 30분후 0.224 ± 0.004 , 1일째에는 0.458 ± 0.017 , 3일째는 0.748 ± 0.032 로 증가하였고 2.0×10^{-4} M군의 흡광도는 배양 30분후 0.195 ± 0.008 에서 1일째에는 0.402 ± 0.018 , 3일째에는 0.778 ± 0.032 로 증가하였다. 3.9×10^{-4} M군의 흡광도는 배양 30분후 0.209 ± 0.010 에서 1일째에는 0.431 ± 0.017 , 3일째에는 0.905 ± 0.017 로 증가하였다. 이상의 결과에서 배양 30분후에는 대조군에 비해 모든 농도의 실험군에서 흡광도가 감소하였으나($P < 0.05$), 배양 24시간과 72시간후에는 오히려 대조군보다 모든 농도의 실험군에서 흡광도가 더 증가하였다($P < 0.05$).

6. MultiTest™slide에 의한 흡수와 면적 평가 (Fig. 6)

상아질 시편 실험에서 흡수와 개수를 감소시키고 세포 독성도 없다고 증명된 etidronate disodium 용액이 흡수와의 면적도 감소 시키는지를 상아질과 조성이 비슷한 단위 면적화된 인공 골편이 깔려있는 MultiTest™slide에서 평가 하였다. 이때 파골세포에 의해 흡수된 면적은 Microst(Millennium® Biologix, Canada)로 측정하였으며 %로 나타내었다.

식염수를 사용한 대조군의 경우에는 골흡수와 면적이 $17 \pm 4.0\%$ 로 나타났으나 10^{-6} M군은 $16 \pm 10\%$, 10^{-5} M군은 $18 \pm 6.8\%$, 10^{-4} M군은 $3.1 \pm 1.3\%$ 로 나타났다. 이상의 결과로 보아 대조군과 10^{-4} M군은 유의성 있는 차이를 나타냈으나($P < 0.05$), 대조군과 10^{-5} M군, 대조군과 10^{-6} M군 사이에는 유의성 있는 차이가 없었다.

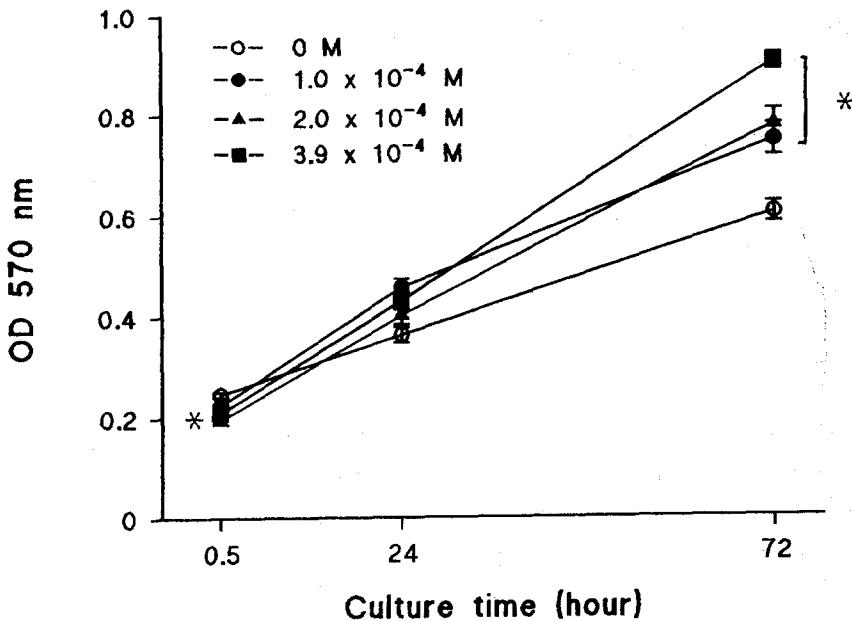


Fig. 5. Cytotoxic effect of gallium nitrate on gingival fibroblasts. Gingival fibroblasts were cultured in medium with or without 1.0×10^{-4} M, 2.0×10^{-4} M, 3.9×10^{-4} M gallium nitrate. After 0.5hr, 24hrs, 72hrs, cell proliferations were estimated by MTT method. Data are expressed as the mean \pm S.E. * $p < 0.05$ compared to non-treated group corresponding to each concentrations.

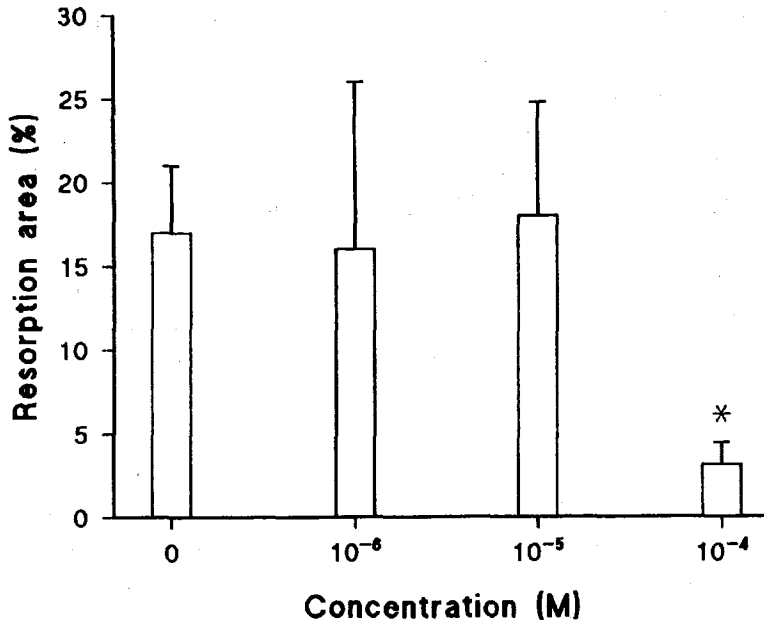


Fig. 6. Effects of etidronate disodium on formation of resorption pit on Multitest™slide. Osteoclasts cultured on Multitest™slide untreated or treated with 10⁻⁶M, 10⁻⁵M, 10⁻⁴M etidronate disodium. After 48hrs, area of resorption pits on Multitest™slide were estimated. Data are expressed as the mean ± S.E. of 2 experiments. *p<0.05 compared to non-treated group corresponding to each concentrations.

IV. 총괄 및 고찰

파골세포의 가장 큰 특징은 골흡수를 한다는 것이며³⁹⁾ 왕성하게 골을 흡수하는 파골세포의 형태학적인 특징 중 중요한 것으로 세가지를 들 수 있다. 즉 세포 크기가 큰 다핵세포라는 것, 골을 흡수하는 부위의 주름변연(ruffled border), 그리고 이 주위를 둘러싸고 있는 투명대(clear zone)가 있다는 것이다³⁹⁾. 파골세포는 세포 융합에 의하여 거대세포가 되므로 형성된지 얼마 안되는 세포는 핵의 수효가 적고, 오래된 세포는 핵의 수효가 평균 10~20개이며, 50개 이상인 경우도 있다고 한다. 그리고 매우 활발하게 움직여서 세포 모양이 변하며, 대개 세포의 크기는 20~100um 정도로 단핵세포에 비하여는 상당히 크다고 한다³⁹⁾. 파골세포가 골표면과 면한 부위의 세포막은 주변이 골표면과 가까이 밀착되어 있어 중앙 부위에는 외부와 차단된 공간을 마련하여 준다. 중앙부위의

세포막은 미세하게 함입 및 돌출되어 있어 ruffled border라고 하는데 여기를 통하여 산 및 효소가 분비되어 골조직내의 수산화인회석 결정과 교원질 섬유를 녹인다고 한다^{19,39)}.

파골세포의 존재를 확인하는 지표로는 TRAP 염색^{50,67)}, 칼시토닌 수용체의 확인²⁷⁾, 면역 세포학 검사^{11,12)}가 있으며 파골세포의 골흡수 능력을 주사전자 현미경으로 관찰하는 방법도 구별 방법에 넣을 수가 있다. 본 실험에서 사용된 TRAP 염색 반응은 식세포 및 파골세포에 있는 acid phosphatase에 대하여 tartrate를 첨가하면 식세포에서는 acid phosphatase가 반응을 못하지만 파골세포는 계속 반응을 하므로 배양세포 중 파골세포를 확인하는 방법으로 많이 이용되고 있다^{21,50,67)}. 그리고 파골세포가 아닌 다른 세포 즉 단핵세포나 활성화된 식세포도 TRAP 반응에 양성을 보일 수 있으므로⁶⁷⁾, 이 반응이 파골세포에만 특징적이라고는 말할 수는 없으므로 파골세포의 확인은 핵이 두 개이상인 다

핵세포, TRAP에 양성반응, 흡수와 형성 능력으로 알 수가 있다. 본 실험에서는 TRAP염색 반응과 뚜렷하게 형성된 흡수와를 통해 파골세포를 확인할 수 있었다.

파골세포는 세포배양시 유리 및 플라스틱 표면, 골표면에 달라붙는 능력이 아주 강하다. 그래서 본 실험에서는 실험과정중 용기에 파골세포가 붙어버리는 것을 피하기 위해 가능한 모든 조작을 4°C에서 시행하였고 모든 용기는 미리 배양액으로 적시어 두었다. 파골세포 배양의 문제점은 파골세포가 세포분열을 하는 증식세포가 아니고 포유 동물에서는 많은 양의 파골세포를 얻을 수 없다는 점이다. 많은 양의 파골세포를 얻으려면 조류에서 얻을 수 있으며, 특히 달걀을 낳는 암탉을 저칼슘 사료로 키우면 가장 많은 파골세포를 얻을 수 있다고 한다⁵². 본 실험에서는 파골세포만을 따로 배양하지는 않았다. 왜냐하면 파골세포가 흡착하려는 성질이 아주 크기때문에 여러단계를 거치면 많은 양의 파골세포를 얻기가 어려워 적은 수의 흡수와만을 얻을 수 있기 때문에 비교가 어렵기 때문이다. 하지만 본 실험의 단점은 파골세포를 pipetting에 의한 기계적인 동작에 의하여 떨어 뜨려 얻었기 때문에 파골세포를 고르게 분산시키기 어렵다는 것과 chick embryo에서는 많은 양의 파골세포를 얻을 수는 있지만 그 번이가 개체마다 크다는 것이다. 그리하여 각 well에 넣어주는 파골세포의 양을 정확히 세어 넣어 주지는 못하였지만 한 번의 실험당 항상 같은 발육 상태를 가진 chick embryo를 다섯마리씩 선택하여 얻은 조직을 일정량의 배양액에 섞어 같은 양을 각 well에 넣어 주도록 노력하였다.

흡수와를 비교 평가 하는데 있어서는 흡수와와 체적을 측정하는 것이 가장 정확하다고 할 수 있으나, Takada 등⁶⁶은 골흡수와를 tangential section에서 측정할 때 깊이가 매우 얇아 흡수와 면적만으로도 부피를 평가할 수 있다고 하였다. Chamber 등²⁹은 흡수와 총면적에 평균 깊이를 곱하여 골흡수량을 계산하였으며 골손실의 절대적인 양은 중요하지 않고 실험군 간의 상대적인 양이 오히려 더 중요하므로 평균 깊이라는 상수는 제거하고 흡수 면적만을 사

용할 수 있다고 주장하였다. Murrills와 Dempster⁵¹는 골흡수와와 개수와 면적, 부피 사이에는 상관 관계가 있다고 보고하였고, Sato와 Grasser⁵⁹, Arnett와 Dempster¹⁰는 반사현미경하에서 흡수와 개수가 전자현미경에서의 면적이나 부피와 상관 관계가 있음을 증명하였다. 골의 흡수와는 toluidine blue로 염색함으로써 쉽게 관찰할 수 있는데, 이로써 흡수량은 상아질 시편을 toluidine blue로 염색하여 광학 현미경하에서 흡수와와 개수를 세어 봄으로써 쉽게 평가 할 수 있다^{10, 20, 51}. 본 연구에서도 상아질 흡수와가 광학현미경과 주사전자현미경의 관찰에서 정확히 일치 하는 것으로 보아, 광학현미경하에서 toluidine blue로 염색하여 흡수와를 세는 것이 주사전자현미경하에서 흡수와 부피를 계산하는 복잡한 방법을 대체하는 간편한 방법이 될 수 있음을 보였다.

파골세포의 작용에 영향을 미치는 약제에 대해서는 상당히 많은 연구가 이루어져 왔다. 골흡수 작용을 억제하는데 영향을 줄 수 있는 인자로는 칼시토닌^{26, 27}, 불소^{37, 54}, bisphosphonate^{49, 74}, gallium^{18, 73} 등 여러 약제에 대한 연구 보고가 있다. 본 연구에서는 불소제제로 stannous fluoride를, bisphosphonate계로는 etidronate disodium을, gallium 제재로는 gallium nitrate를 사용하였는데, 이들 약제가 상아질 흡수억제에 미치는 영향 및 이러한 약제들의 세포독성을 검정하기 위하여 MTT 검정을 시행하였다. MTT 검정은 정상 세포의 mitochondrial dehydrogenase에 의하여 MTT가 환원, blue formazan 결정이 생성되는 것을 이용하여 이것의 흡광도를 측정하여 간접적으로 살아 있는 세포수를 비교함으로써 세포독성, 세포증식 및 세포의 활성화 등을 측정할 수 있는 방법이다.

불소는 마시는 물이나 음식에서 자연적으로 발견할 수 있는데 어린이에게서는 치아 우식 예방에 주로 이용이 되며 골다공증으로 고통 받는 어른들에게도 치료제로 사용이 되기도 한다⁶⁸. 치근 흡수에서 불소의 작용기전은 아직 확실히 밝혀지지는 않았다. Taylor 등⁶⁸은 불소가 조골세포, 파골세포 양쪽 모두에 직접적으로

영향을 줄 수 있고 간접적으로는 근처의 다른 세포에 의해 cytokine의 분비를 변화시켜 이러한 세포에 영향을 줄 수 있다고 하였다. Posner등⁵⁴⁾에 의하면 불소가 치아의 백악질 혹은 상아질에 결합하여 fluorapatite를 형성하여 결정 크기가 증가하여 용해에 저항성을 가지게 한다고 하였으며, Goldhaber³⁷⁾는 치아와 불안정하게 결합된 불소가 유리되어 파골세포의 효소 활성을 억제시킬 수 있다고 보고하였다. Chen등³⁰⁾은 혈청의 칼슘 양을 조절하는 부갑상선 호르몬과 같은 systemic hormon의 생성에 간접적으로 영향을 미칠 수 있다고 하였다.

재식하기전 탈구된 치아를 불소에 담근후에 시행하여야 한다고 주장하는 연구 보고가 많이 있는데 Schulman등⁶⁴⁾은 발치된 원숭이의 치아를 1M의 sodium fluoride에 담가 두었다가 재식을 시행하여 식염수에 저장했던 것과 비교하여 치근흡수가 상당히 감소하였음을 보였으며, 보다 커진 수산화인회석 결정으로 인해 흡수에 더 저항성을 가졌을 것이라고 하였다. Bjorvatn과 Massler⁷⁴⁾는 10%의 stannous fluoride가 재식된 쥐의 구치에서 치근흡수를 감소시켰으나 치주인대의 치유과정에는 해로운 영향을 주었다고 하였으며 불소의 농도가 높을수록 흡수는 감소되었지만 치주인대에는 더욱더 많은 손상을 주었다고 보고 하였다. 또한 Schulman등⁶⁵⁾은 불소가 치주인대 섬유에 손상을 줄 수 있기 때문에 치주인대 섬유가 생활력이 있을 수 있다고 볼 수 있는 탈구 후 30분에서 60분 이내에 재식할 수 있을 때에는 불소를 사용하지 말 것을 주장하였으며, 재식된 치근으로부터 인접의 치조골로 불소가 유리되어 골흡수를 억제하고 골형성을 증가시켜 오히려 골성유합을 증가시킬 수 있다고 하였다. Taylor등⁶⁸⁾은 불소가 흡수와 깊이를 감소시키고, 조직배양에서 파골세포의 운동성과 분비 기능을 억제하였음을 보고 하였고 파골세포에 대한 효과는 세포독성 때문은 아니라고 했다. 본 연구에서는 0.1%와 0.5%의 stannous fluoride로 상아질 시편을 처리하고 파골세포에 의한 흡수 정도를 평가하였는데 전혀 흡수와가 형성되지 않았다. MTT 세포독성 평가에서 보면 stannous fluoride를

세포 독성 평가를 위한 배지에 용해시키면 끈 침전물이 생성되기 시작하였으며 이러한 침전물로 인하여 흡광도 평가에 방해를 주어 올바른 수치를 얻을 수 없어 MTT 검정을 시행할 수가 없었다. 하지만 광학 현미경 관찰에서 배지에 있던 모든 치은 섬유아 세포가 시약첨가 후 길쭉하던 모양이 둥글게 변한 것으로 보아 생활력을 잃은 것을 알 수 있었다. 이로써 stannous fluoride의 세포 독성이 매우 큰 것을 알 수 있었으며 치아 재식시 stannous fluoride에 처리하는 것은 치주인대 섬유에 손상을 줄 수 있으리라 사료되기에 Schulman등⁶⁵⁾이 주장한 바와 같이 치주인대의 생활력이 있을 경우 치아 재식을 시행 할 경우에는 오히려 골성유합을 일으킬 수 있으므로 피하는 것이 좋을 것으로 사료된다.

Bisphosphonate는 과거 26년간 Paget's disease나 악성종양에 의한 고칼슘혈증, 또는 골다공증과 같은 bone과 칼슘 대사에 일어나는 질병을 치료하는 약제로 사용되어져 왔다^{33, 34, 74)}. Bisphosphonate는 화학적으로 매우 안정되어 거의 대사가 일어나지 않으므로 혈중에서 대사 물질은 발견되지 않는다고 한다³⁴⁾. Bisphosphonate는 동맥, 신장, 피부, 심장 또는 구강내에 서까지도 연조직 석회화를 억제할 수 있으며 뇨결석이나 ectopic ossification의 형성을 억제할 수 있다고 한다³⁴⁾. Fleish³⁴⁾는 bisphosphonate를 치아 표면에 도포한후 치석 생성이 감소됨을 보고하였다. Bisphosphonate는 파골세포의 활동과 골의 무기질 침착을 억제하는 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 이것의 작용기전으로는 수산화인회석 결정에 대해 높은 결합 친화력으로 인하여 bisphosphonate가 골의 mineral surface에 축적되어 수산화인회석의 용해를 억제하여 골흡수를 억제하는 효과가 있는 것으로 보고되었는데³⁴⁾ 최근에는 bisphosphonate가 파골세포의 수를 감소시키거나 bisphosphonate가 침착된 골을 파골세포가 탐식하여 파골세포내 대사에 장애를 초래하여 파골세포의 작용이 억제되는 작용에 의해 골흡수를 억제한다^{22, 59)}고 하며 또한 bisphosphonate가 조골 세포에 작용하여 파골세포의 활동을 활성화시

키는 cytokine 등의 생성을 억제시킴으로써 파골세포의 생성이나 기능이 감소되는 것으로 보고되고 있다⁷²⁾. Carano 등²²⁾은 bisphosphonate가 파골세포와 골이 결합하는 능력을 30~40%까지 감소시키며 파골세포에 의한 H⁺ 이온 축적과 단백질 합성을 감소시킨다고 하였으며 이러한 결과는 bisphosphonate가 파골세포의 대사를 강력하게 억제한다는 것을 암시하는 것이라고 하였다. 그러나 어떠한 기전이 인체 내에서 일어나는 기전인지에 대하여는 아직까지 명확하게 밝혀지지 않고 있다.

Bisphosphonate에 대한 생체실험으로는 Robinson과 Shapiro⁵⁵⁾는 쥐의 제1대구치를 발치하여 10분간 0.1% disodium EHBP에 저장한 후 재식하여 치근 흡수를 관찰한 결과 저장 용액에 대한 치근 흡수의 양의 차이에는 유의차가 없었다고 보고 하였다. 그러나 Sato와 Grassler⁵⁹⁾는 10⁻⁹에서 10⁻³M의 etidronate가 골흡수 능력을 감소시켰으며 50%까지 억제시키는 효과적인 농도는 10⁻⁶M이라고 보고하였다. Leonard⁴⁷⁾에 의하면 쥐에서 bisphosphonate가 치주 조직 파괴를 예방할 수 있었음을 보고하였으나, Schaff 등⁶⁰⁾은 치주질환으로 이환된 쥐에서 EHBP (1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonic acid)나 식염수로 피하 주사한 경우 치조골 흡수의 억제 효과 비교에서 유의차가 없었으며 6개월 후 골성유합도 생겼다고 보고하였다. 그러나 유사한 실험에서 Gotcher와 Jee³⁸⁾는 실험 동물에서 골흡수를 확실하게 지연시킬 수 있었고 골성유합도 관찰할 수 없었다고 하였다.

본 실험에서는 10⁻⁶M, 10⁻⁵M, 10⁻⁴M의 etidronate disodium 용액에 상아질 시편을 저장한 후 파골세포에 의한 흡수 정도를 평가하기 위하여 대조군과 10⁻⁶M, 10⁻⁵M, 10⁻⁴M의 etidronate disodium 용액을 처리한 실험군에서 흡수와 개수를 비교하였다. 각 군의 흡수와 개수를 대조군과 통계학적으로 비교하여 보면, 10⁻⁶M etidronate disodium 군과는 유의성 있는 차이가 없었으나, 10⁻⁵M, 10⁻⁴M의 etidronate disodium 군과는 유의성 있는 차이가 있었다 (P < 0.05). 대조군에 비해 흡수와 개수가 10⁻⁵M 실험군과 10⁻⁴M 실험군에서 60% 이상 감소한

것을 알 수 있었다.

MultiTest™ slide에 의한 흡수와 면적 평가는 상아질 시편 실험에서 흡수와 개수를 감소시키고 세포 독성도 없다고 증명된 etidronate disodium 용액만을 실험에 이용하였는데, 흡수와 개수의 감소가 흡수와 면적도 감소 시키는지를 상아질과 조성이 비슷한 단위 면적화된 인공 골편에서 평가 하였는데 대조군과 10⁻⁴M 군은 유의성 있는 차이를 나타냈으나 (P < 0.05), 대조군과 10⁻⁵M 군, 대조군과 10⁻⁶M 군 사이에는 유의성 있는 차이가 없었다. 대조군과 10⁻⁴M 실험군과 비교할 때 흡수와 면적이 80% 이상 감소한 것을 알 수 있었다. 이와 같이 etidronate disodium은 세포 독성이 없으며, 파골세포에 의한 흡수 억제 효과도 있는 것으로 나타났으므로 치근막이 손상된 치아의 재식전에 전처리한다면 파골세포에 의한 치근흡수를 억제할 수 있을 가능성을 생각할 수 있고 또한 치주 인대 세포에도 영향을 주지 않을 것으로 사료된다. 또한 치주인대세포의 생활력이 있는 경우라도 세포에는 손상을 주지 않기 때문에 사용할 수는 있겠지만 가능하면 탈구된 시간을 줄여 빨리 재식을 시행하여 치주인대의 손상을 줄이는 것이 치근 흡수를 줄이고 나아가 골성유합의 가능성도 줄여 줄 수 있으므로 탈구 후 즉시 재식하는 경우보다는 지연된 재식의 경우 사용하는 것이 더 효과적이라 여겨진다.

Gallium nitrate도 bisphosphonate와 마찬가지로 Paget's disease⁴⁹⁾나 악성종양에 의한 고칼슘혈증⁷³⁾, 또는 골다공증과 같은 bone과 칼슘 대사에 일어나는 질병을 치료하는 약제로 시도되고 있으며, gallium nitrate가 calcitonin이나 bisphosphonate보다 악성 고칼슘혈증에 더 효과적인 골흡수 억제제라는 보고가 있다⁷³⁾. Bockman 등¹⁸⁾은 gallium이 수산화인회석의 형성과 성숙을 촉진하고 칼슘과 인이 많이 함유된 크고 완전한 결정을 형성하여 흡수에 큰 저항성을 가진다고 하였으며 이는 matrix nucleation을 방해하여 새로운 수산화인회석 결정의 형성을 막아 기존 결정을 보다 크게 자라게 함으로 이를 수 있다고 하였다. 이러한 큰 결정은 작은 결정보다 용해에 강하다고 하였다³¹⁾. Warrel 등⁷³⁾은

gallium이 파골세포를 직접적으로 억제하고 조골세포를 coupling기전에 의해 간접적으로 억제시켜 골 흡수와 생성을 감소시킨다고 하였다. Matkovic등⁴⁹⁾은 gallium이 골형성을 억제시켜 골흡수를 감소시킨다고 하였으며, Warrel등⁷³⁾은 파골세포와 조골세포의 binding site에 gallium이 칼슘과 경쟁하여 calcium channel에 영향을 주어 podosome 형성의 억제를 유도하여 파골세포의 골흡수 작용과 조골세포의 분비기능에 필요한 podosome을 억제한다고 하였다. Matkovic등⁴⁹⁾은 gallium nitrate가 transferrin으로부터 iron을 경쟁적으로 치환시켜 gallium-transferrin complex를 형성하여 ribonucleotide reductase를 억제하고 DNA 합성을 방해하여 파골세포의 기능과 조골세포의 증식을 억제한다고 하였다. Donnelly등³¹⁾에 의하면 gallium이 cell-mediated bone resorption에 필수적인 단백질 분해효소, H⁺-production, H⁺-transport를 억제한다고 했다. Bockman등¹⁸⁾은 gallium으로 치료받은 동물에서 증가된 metaphysial bone calcium content를 보였고 bone mineral crystal size가 증가함을 보고하였다. Hall과 Chamber⁴⁰⁾은 0.01-100µg/ml gallium nitrate가 파골세포에 의해 만들어진 흡수소에서 농도와 비례하는 억제를 보인다고 하였으며 gallium은 파골세포를 억제할 뿐이지 독성은 없다고 하였다. Schenk등⁶¹⁾은 성장하는 동물에서 항흡수 약제로 bisphosphonate와 같은 약제로 치료할 때 long bone이 impaired remodeling으로 인해 형성부전을 보이는 반면 gallium은 성장시 출몰성 골재형성에 부작용을 보이지 않았다고 한다⁶¹⁾. 이로써 Donnelly³¹⁾는 gallium의 항흡수 작용 기전이 bisphosphonate와는 다르다고 주장하였다. Liewehr등⁴⁸⁾은 식염수와 10⁻⁶M gallium nitrate에 상아질 시편을 저장한 후 파골세포에 의한 흡수와의 형성을 비교하여 gallium nitrate용액에서 흡수와 수가 감소함을 보고하였다.

본 실험에서는 1.0×10⁻⁴M, 2.0×10⁻⁴M, 3.9×10⁻⁴M의 gallium nitrate용액을 제조하여 Liewehr등⁴⁸⁾에 의한 실험과 유사하게 시행하였으나 대조군과 비교하여 실험군에서 흡수와

개수의 차이에서 유의차를 보이지 않았다. 그리고 MTT 세포독성 검사에서는 gallium nitrate가 대조군과 비교하여 실험군에서 배양 초기(30분)에 낮은 정도의 세포독성이 있는 것으로 나타났다. Liewehr등⁴⁸⁾과는 달리 본 실험에서는 흡수와 개수는 많이 생겼지만 실험 용액간의 유의차가 없었던 것은 실험 시편수의 차이에 기인하거나, chick embryo로부터 얻은 파골세포의 양의 변이에 원인이 있을 수도 있다고 사료 된다. 그러므로 골흡수 억제에 효과가 탁월하다는 gallium이 정말 상아질 흡수에 영향을 미칠 수 있는지의 여부는 향후 연구가 더 필요할 것으로 여겨진다.

이상의 결과에서 chick embryo에서 얻은 파골세포가 인간의 상아질에서 흡수와를 형성하는 것을 알 수 있었으며, 상아질을 etidronate disodium으로 전처리 하였을 때 대조군과 비교하여 흡수와 형성이 60% 이상 감소 되었다. 비록 시험관 내에서 시행하여 얻은 결과이지만 임상에서도 역시 상아질 흡수를 감소시키는 효과가 있을 것으로 기대된다. 예를들어 치아 재식전에 이러한 용액에 치아를 담가준다면 혹은 탈구된 치아의 근관을 etidronate disodium 약제의 reservoir로 이용하여 상아세관을 통해 치근 외면으로 확산시켜 상아질 흡수를 억제할 수 있는 농도에 이르게 할 수 있다면 대치성 치근 흡수를 억제할 수 있는 가능성을 보여준다고 사료된다. 그리하여 이러한 약제를 상아세관을 통해 투과시킬 수 있는지, 있다면 어떤 농도가 효과적인지 평가 하는 작업이 필요하리라 본다. 또한 파골세포에 대한 억제 기전과 영향 인자에 대해 다각적인 연구가 이루어짐으로써 이를 바탕으로 하여 치아 재식시 대치성 치근흡수를 조기에 차단할 수 있는 효과적인 예방방법을 찾을 수 있으리라 생각된다.

V. 결 론

본 연구는 chick embryo의 골세포로부터 얻은 파골세포를 배양하여 stannous fluoride, etidronate disodium, gallium nitrate가 파골세포에 의한 상아질 흡수 억제에 미치는 영향을

평가하고자 실시하였다. 대조군으로는 상아질 시편을 식염수에 저장하고, 실험군으로는 상아질 시편을 0.1%, 0.5% stannous fluoride, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M etidronate disodium, 1.0×10^{-4} M, 2.0×10^{-4} M, 3.9×10^{-4} M gallium nitrate의 각 용액에 48시간 저장한후 파골세포를 상아질 시편위에 배양하여 형성된 흡수와를 평가 하였으며, 파골 세포의 존재는 tartrate 저항성 산성인산분해효소(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)를 염색하여 확인 하였으며, MTT 검정법으로 각 실험용액의 세포독성을 검사한 후 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 파골세포의 존재는 TRAP 염색법에서 붉은 색의 양성 반응과 핵이 두 개 이상인 다핵 거대세포로 확인 할 수 있었으며, 주사전자 현미경상에서 특징적인 상아질 흡수와를 관찰할 수 있었다.
2. 0.1%와 0.5% stannous fluoride로 처리한 실험군에서는 흡수와가 형성되지 않았는데, stannous fluoride의 강한 세포독성에 의해 파골세포가 생활력을 소실한 때문으로 추정된다.
3. 10^{-6} M etidronate disodium로 처리한 실험군은 상아질 흡수 억제를 보이지 않았으나, 10^{-5} M, 10^{-4} M의 etidronate disodium군에서는 유의할만한 상아질 흡수 억제효과를 보였다($P < 0.05$). Etidronate disodium의 세포독성은 모든 농도에서 나타나지 않았다.
4. 1.0×10^{-4} M, 2.0×10^{-4} M, 3.9×10^{-4} M의 gallium nitrate로 처리한 모든 실험군에서 상아질 흡수 억제효과를 보이지 않았다. Gallium nitrate는 모든 농도에서 배양 초기(30분)에 낮은 세포독성을 보였다.

참 고 문 헌

1. Addison W.C. : The distribution of nuclei in human odontoclasts in whole cell preparations, Archs. Oral Biol., 23 : 1167-1171, 1978.
2. Alvarez J.I., Teitelbaum S.L., Blair H.C., Greenfield E.M., Athanasou N.A., Ross F.

P. : Generation of avian cells resembling osteoclasts from mononuclear phagocytes, Endocrinol., 128 : 2324-2335, 1991.

3. Amano S., Hanazawa S., Kawata Y., Ohta K., Kitami H., Kitano S. : An assay system utilizing devitalized bone for assessment of differentiation of osteoclastic progenitors, J. Bone Min. Res., 7 : 321-328, 1992.
4. Andersson L., Bodin I., Sorensen S. : Progression of root resorption following replantation of human teeth after extended extraoral storage, Endod. Dent. Traumatol., 5 : 38-47, 1989.
5. Andreasen J.O., Hjorting-Hansen E. : Replantation of teeth I. Radiographic Clinical study of 110 Human Teeth replanted after accidental loss, Acta Odont. Scand., 24 : 263-286, 1966.
6. Andreasen J.O. : Traumatic Injuries of the Teeth, Munksgaard, Copenhagen, 193, 206, 1972.
7. Andreasen J.O. : Relationship between cell damage in the periodontal ligament after replantation and subsequent development of root resorption, A time-related study, Acta. Odont. Scand., 39 : 15-25, 1981.
8. Andreasen J.O. : Effect of extra-alveolar period and storage media upon periodontal and pulpal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys, Int. J. Oral Surg., 10 : 43-53, 1981.
9. Andreasen J.O., Kristerson L. : The effect of extra alveolar root filling with calcium hydroxide on periodontal healing after replantation of permanent incisors in monkeys, J. Endod., 7 : 349-54, 1981.
10. Arnett T.R., Dempster A.W. : A comparative study of disaggregated chick and rat osteoclasts in vitro : effects of calcitonin and prostaglandins, Endocrinol., 120 : 602-608, 1987.

11. Athanasou N.A., Quinn J.M. : Immunophenotypic difference between osteoclasts and macrophage polykaryons-Immunohistological distinction and implication for osteoclast ontogeny and function, *J. Clin. Pathol.*, 43 : 997-1003, 1990.
12. Athanasou N.A., Puddle B., Quinn J., Woods C.G. : Use of monoclonal antibodies to recognize osteoclasts in routinely processed bone biopsy specimens, *J. Clin. Pathol.*, 44 : 664-666, 1991.
13. Aubin J.E. : Osteoclast adhesion and resorption-The roll of podosome, *J. Bone Miner. Res.*, 7 : 365-368, 1992
14. Bjorvatn K., Massler M. : Effect of fluorides on root resorption in replanted rat molars, *Acta. Odont. Scand.*, 29 : 17-29, 1971.
15. Blomlöf L., Otteskog P. : Viability of human periodontal ligament cells after storage in milk or saliva, *Scand. J. Dent. Res.*, 88 : 436-440, 1980.
16. Blomlöf L., Lindskog S., Andersson L., Hedström K.G., Hammarström L. : Storage of experimentally avulsed teeth in milk prior to replantation, *J. Dent. Res.*, 62 : 912-916, 1983.
17. Blomlöf L., Lindskog S., Hammarström L. E. : Influence of pulpal treatments on cell and tissue reactions in the marginal periodontium, *J. Periodont.*, 59 : 577-583, 1988.
18. Bockman R.S., Boskey A.L., Blumenthal N.C., Alock N.W., Warrel R.P. : Gallium increases bone calcium and crystallite perfection of hydroxyapatite, *Calcif. Tissue Int.*, 39 : 376-381, 1986.
19. Bonucci E. : New knowledge on the origin, function and fate of osteoclasts, *Clin. Ortho. Rel. Res.*, 158 : 252-269, 1980.
20. Boyde A., Nadire N.A., Jones S.J. : Resorption of dentin by isolated osteoclasts in vitro, *Brit. Dent. J.*, 156 : 216-220, 1984.
21. Burstone M.S. : Histochemical demonstration of acid phosphatases with naphthol AS-phosphates, *J. Natl. Cancer. Inst.*, 20 : 601-615, 1958.
22. Carano A., Teitelbaum S.L., Konsek J.D., Schlesinger P.H., Blair H.C. : Bisphosphonates directly inhibit the bone resorption activity of isolated avian osteoclasts in vitro, *J. Clin. Invest.*, 85 : 456-461, 1990.
23. Chambers I.G., Reade P.C., Poker I.D. : Early post-operative endodontic therapy limits inflammatory root resorption of autotransplanted maxillary canine teeth, *Brit. J. Oral. Max. Surg.*, 26 : 364-369, 1988.
24. Chambers T.J. : phagocytosis and trypsin-resistant glass adhesion by osteoclasts in culture, *J. Pathol.*, 27 : 55-59, 1979.
25. Chambers T.J. : Phagocytic recognition of bone by macrophages, *J. Pathol.*, 135 : 1-7, 1981.
26. Chambers T.J. : The pathobiology of the osteoclast, *J. Clin. Pathol.*, 38 : 241-252, 1985.
27. Chambers T.J., Magnus C.J. : Calcitonin alters the behavior of isolated osteoclasts, *J. Pathol.*, 136 : 27-39, 1982.
28. Chambers T.J., Dunn C.J. : Pharmacological control of osteoclastic motility, *Calcif. Tissue Int.*, 35 : 566-570, 1983.
29. Chambers T.J., Fuller K., McSheehy P.M.J. : The effects of calcium regulating hormones on bone resorption by isolated human osteoclastoma cells, *J. Pathol.*, 145 : 297-305, 1985.
30. Chen C.J., Anast C.S., Brown E.M. : Effects of fluoride on parathyroid hormone. Secretion and intracellular second messengers in bovine parathyroid cells, *J. Bone Miner. Res.*, 3 : 279-288, 1988
31. Donnelly R., Bockman R.S., Doty S. : Bone particles from gallium-treated rats are re-

- sistant to resorption in vivo, *Bone and Mineral*, 12 : 167–179, 1991.
32. Flanagan A.M., Chambers T.J. : Dichloromethylenebisphosphonate (Cl₂MBP) inhibits bone resorption through injury to osteoclasts that resorb Cl₂MBP-coated bone, *Bone Min.*, 6 : 33–43, 1989.
 33. Fleisch H. : Experimental basis for the use of bisphosphonate in Paget's disease of bone, *Clin. Ortho. Rel. Res.*, 217 : 72–78, 1987.
 34. Fleisch H., Bisphosphonates : A new class of drugs in diseases of bone and calcium metabolism, *Recent Results in Cancer Res.*, 116 : 1–28, 1989.
 35. Francis M.D. : A brief history of etidronate, In Summit L. ed, *Diphosphonates-The First Decade.*, Virginia Commonwealth University, Williamsburg, Virginia, 7–14, 1988.
 36. Francis M.D., Russell R.G.G., Fleisch H. : Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo, *Science*, 165 : 1264–1265, 1969.
 37. Goldhaber P. : The inhibition of bone resorption in tissue culture by non toxic contributions of sodium fluoride, *Israel J. Med. Sci.*, 3 : 617–626, 1967.
 38. Gotcher J.E., Jee W.S.S. : The progress of the periodontal syndrome in the rice rat. II. The effects of a diphosphonate on the periodontium, *J. Periodon. Res.*, 16 : 441–455, 1981.
 39. Gothlin G., Ericsson J.L.E. : The osteoclast. Review of ultrastructure, origin, and structure-function relationship, *Clin. Orthoped Rel. Res.*, 120 : 201–228, 1976.
 40. Hall T.J., Chambers T.J. : Gallium inhibits bone resorption by a direct effect on osteoclasts, *Bone Min.*, 8 : 211–216, 1990.
 41. Hammarström L., Lindskog S. : General morphological aspects of teeth and alveolar bone, *Intl. Endod. J.*, 18 : 93–108, 1985.
 42. Hammarström L., Blom L., Lindskog S. : Dynamics of dentoalveolar ankylosis and associated root resorption, *Endod. Dent. Traumatol*, 5 : 163–175, 1989.
 43. Heithersay G.S. : Replantation of avulsed teeth. A review, *Australian dent. J.*, 20 : 63–72, 1975.
 44. Heithersay G.S. : Clinical endodontic and surgical management of tooth and associated bone resorption, *Int. Endod. J.*, 18 : 72–9, 1985.
 45. Jones S.J., Boyde A., Ali N.N. : The resorption of biological and non-biological substrates by cultured avian and mammalian osteoclasts, *Anat. Embryol.*, 170 : 247–256, 1984.
 46. Kahn A.J., Stewart C.C., Teitelbaum S.L. : Contact-mediated bone resorption by human monocytes in vitro, *Science*, 199 : 988–90, 1978.
 47. Leonard E.P., Reese W.V., Madel E.J. : Comparison of the effects ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate and dichloromethane diphosphonate upon periodontal bone resorption in rice rats, *Arch. Oral Biol.*, 24 : 707–708.
 48. Liewehr F.R., Craft D.W., Primack P.D., Kulild J.C., Turgeon D.K., Sutherland D.E., Schuster G.S., Pashley D.H. : Effect of bisphosphonates and gallium on dentin resorption in vitro, *Endod. dent. Traumatol.*, 11 : 20–26, 1995.
 49. Matkovic V., Aapseloff G., Shepard D.R., Gerber N. : Use of gallium to treat Paget's disease of bone : a pilot study, *Lancet*, 335 : 72–75, 1990.
 50. Minkin C. : Bone acid phosphatase : tartarate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function, *Calcif Tissue*

- Int., 34 : 285–290, 1982.
51. Murrills R.J., Dempster D.W. : The effects of stimulators of intracellular cyclic AMP on rat and chick osteoclasts in vitro : validation of a simplified light microscope assay of bone resorption, *Bone*, 11 : 333–344, 1990.
 52. Oursler M.J., Collin-Osdoby P., Anderson F., Lim L., Weber D., Osdoby P. : Isolation of avian osteoclasts-Improved techniques to preferentially purify viable cells, *J. Bone Miner. Res.*, 6 : 375–368, 1991.
 53. Pierce A. : Pathophysiological and therapeutic aspects of dentoalveolar resorption, *Aust. Dent. J.*, 34 : 437–448, 1989.
 54. Posner A.S., Eanes E.D., Harper R.A., Zipkin I. : X ray diffraction analysis of the effect of fluoride on human bone apatite, *Arch. Oral Biol.*, 8 : 549–570, 1963.
 55. Robinson P.J, Shapiro I.M. : Effect of diphosphonates on root resorption, *J. Dent. Res.*, 55 : 116,1976.
 56. Roodman G.D., Ibbotson K.J., Mac Donald B.R., Kuehl T.J., Mundy G.R. : 1,25-dihydroxy-vitamin D3 causes formation of multinucleated cells with several osteoclast characteristics in cultures of primate marrow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 : 8213–8217, 1985.
 57. Sakamoto S., Sakamoto M. : Biochemical and immunohistochemical studies on collagenase in resorbing bone in tissue culture, *J. Perio. Res.*, 17 : 523–526, 1982.
 58. Sasaki T., Takahashi N., Higashi S., Suda T. : Multinucleated cells formed on calcified dentin from mouse bone marrow cells treated with 1,25-dihydroxy vitamin D3 have ruffled borders and resorb dentin, *Anat. Rec.*, 221 : 379–391, 1989.
 59. Sato M., Grasser W. : Effects of bisphosphonates on isolated rat osteoclasts as examined by reflected light microscopy, *J. Bone Min. Res.*, 5 : 31–40, 1990.
 60. Schaaf J.E., Kafrawy A.H., Standish S.M. : Effects of diphosphonate on experimental periodontal disease in hamsters, *J. Dent. Res.*, 57 : 195,1978. Abstract No. 483.
 61. Schenk R., Merz W.A., Muhlbauer R., Russell R.G.G., Fleisch H. : Effect of ethane-1-hydroxyl-1, 1-diphosphonate (EHDP) and dichloromethylene diphosphonate (Cl₂MDP) on the calcification and resorption of cartilage and bone in the tibial epiphysis and metaphysis of rats, *Calcif. Tissue Res.*, 11 : 196–214, 1973.
 62. Seltzer S., Soltanoff W., Bender I.B., Ziontz M. : Biologic aspects of endodontics. 1. Histologic observations of the anatomy and morphology of root apices and surrounding structures, *Oral Surg.*, 22 : 375–385, 1966.
 63. Söder P.O., Otteskog P., Andreasen J.O., Modeer T. : Effect of drying on viability of the periodontal membrane, *Scand. J. Dent. Res.*, 85 : 164–168, 1977.
 64. Schulman L.B., Kalis P., Goldhaber P. : Fluoride inhibition of tooth-replant root resorption in cebus monkeys, *J. Oral Ther. Pharm.*, 4 : 331–337, 1968.
 65. Shulman L.B., Gedalia I., Feingold R.M. : Fluoride concentration in root surfaces and alveolar bone of fluoride-immersed monkey incisors three weeks after replantation, *J. Dent. Res.*, 52 : 1314–1316, 1973.
 66. Takada Y., Kusuda M., Hiura K., Sato T., Mochizuki H., Nagao Y., Tomura M., Yahiro M., Hakeda Y., Kawashima H., Kumegawa M. : A simple method to assess osteoclast-mediated bone resorption using unfractionated bone cells, *Bone Min.*, 12 : 347–359, 1992.
 67. Takahashi N., Yamana H., Yoshiki S., Roo-

- dman G.D., Mundy G.R., Jones S.J., Boyde A., Suda T. : Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures, *Endocrinol*, 122 : 1373-1382, 1988.
68. Taylor M.L., Boyde A., Jones S.J. : The effect of fluoride on the patterns of adherence of osteoclasts cultured on and resorbing dentin : a 3-D assessment of vinculin-labelled cells using confocal optical microscopy, *Anat. Embryol*, 180 : 427-435, 1989.
69. Taylor M.L., Maconnachie E., Frank K., Boyde A., Jones S.J. : The effect of fluoride on the resorption of dentin by osteoclasts in vitro, *J. Bone Min. Res.*, 5 : s121-s130, 1990.
70. Tronstad L. : Root resorption - etiology, terminology and clinical manifestations, *Endod. Dent. Traumatol.*, 4 : 241-252, 1988.
71. Van Hassel H.J., Oswald R.J. Harrington G.W. : Replantation 2. The role of the periodontal ligament, *J.O.E.*, 6 : 506-509, 1980.
72. Vitte C., Fleisch H., Guenther H.L. : Osteoclasts mediate the bisphosphonate inhibition on bone resorption through synthesis of an osteoclast-inhibiting activity, *J. Bone Miner. Res.*, 9(suppl) : s142, 1994.
73. Warrel R.P., Israel R., Frisone M., Snyder T., Gaynor J.J., Bockman R.S. : Gallium nitrate for acute treatment of cancer-related hypercalcemia, *Ann Intern. Med.*, 108 : 669-674, 1988.
74. Watts N.B., Harris S.T., Genant H.K., Wasnich R.D., Miller P.D., Jackson R.D., Licata A.A., Ross P., Woodson G.C., Yanover M.J., Mysiw W.J., Kohse L., Rao M.B., Steiger P., Richmond B., Chesnut C.H. : Intermittent cyclical etidronate treatment of postmenopausal osteoporosis, *N. Engl. J. Med.*, 323 : 73-79, 1990.

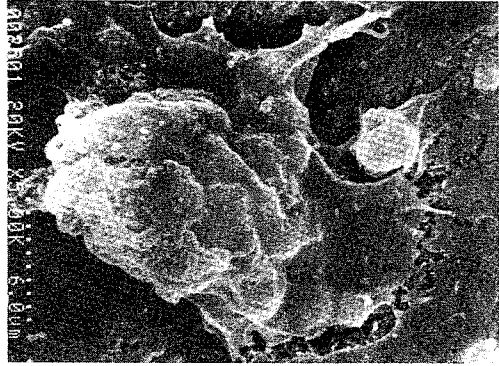
사진부도설명

- 사진 1. TRAP-positive multinuclear cells isolated from bone of chick embryo ($\times 400$)
- 사진 2. Scanning electron microscope view of the osteoclast on dentin slice ($\times 5000$)
: Osteoclast has thin and well developed lamellipodia on dentin surface.
- 사진 3. Light microscope view of resorption pit on dentin slice ($\times 200$)
: Note the resorption pits which, when stained with toluidin blue, contrast against the dentin background.
- 사진 4. Scanning electron microscope view of resorption pit on dentin slice ($\times 1500$)
: Diameters of dentinal tubules of resorption pits were larger than those of normal dentinal tubules.
- 사진 5. Cytotoxic effect of stannous fluoride on gingival fibroblast
- ① gingival fibroblast cells after 3 days untreated
: gingival fibroblasts were well proliferated.
 - ② gingival fibroblast cells after 3 days treated with 0.5% stannous fluoride
: All gingival fibroblasts were dead.

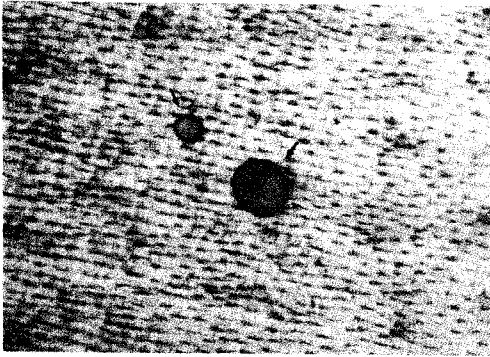
백 은 영 논문 사진부도



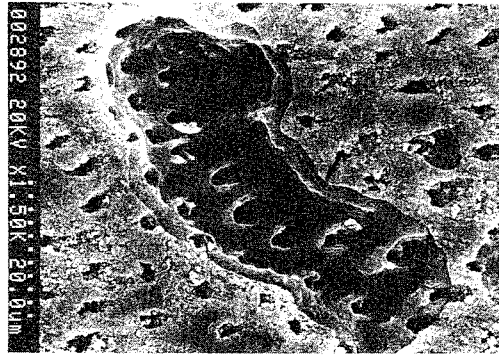
사진부도 1.



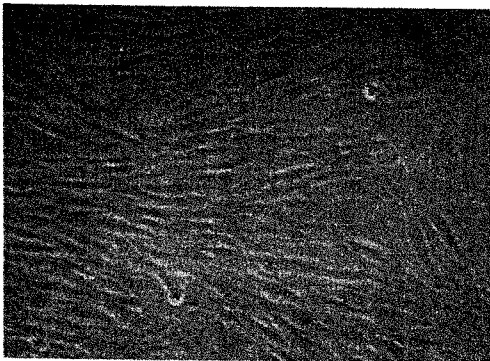
사진부도 2.



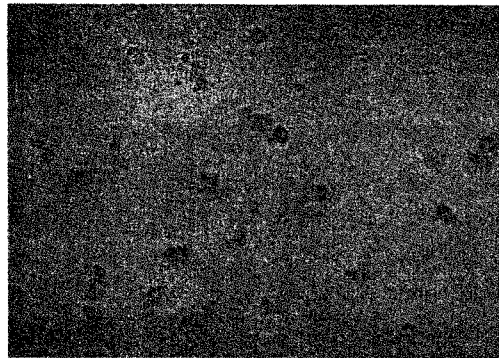
사진부도 3.



사진부도 4.



①



②

사진부도 5.