

수종의 저장용액에서 치주인대세포의 생존율 비교

최원경 · 최형준 · 최병재 · 이종갑

연세대학교 치과대학 소아치과학교실

Abstract

A COMPARATIVE STUDY OF PRESERVING ABILITY OF HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT CELLS STORED IN DIFFERENT STORAGE MEDIA

Won-Kyung Choi, Hyung-Jun Choi, Byung-Jai Choi, Jong-gap Lee

Dept. of Pediatric Dentistry, Collage of Dentistry, Yonsei University

Preservation of the remaining periodontal ligament cells on an avulsed tooth is very important to the successful outcome of replantation. HBSS is recommended as the most suitable storage medium for the avulsed tooth that cannot be replanted immediately. But their availability near the site of an accident is doubtful.

The purpose of this in vitro study was to compare periodontal ligament cells stored in different storage media obtained easily on the spot. Human periodontal ligament cells were collected from the premolar teeth extracted for orthodontic treatment. Cells were cultured in α -MEM culture medium containing 20% FBS, at 37°C 100% humidity, in a 5% CO₂ incubator. Cells were cultured in 96 well culture plate, 5×10⁴ cells per well with α -MEM and incubated for 24 hours. After discarding the medium, those cells were cultured in α -MEM contained with 10% FBS, pasteurized milk, sterilized saline, unstimulated saliva and bench-dried state at 25°C room temperature for 30, 60, 90, 120, 180 minutes respectively. And then each group was measured using MTT assay.

The results were as follows.

1. Between the group of each time, there was statistically significant difference. Periodontal ligament cells viability was highest in pasteurized milk and was reduced stepwisely in sterilized saline, unstimulated saliva and bench-dried state(p<0.05).
2. between the time of each group, there was statistically significant difference (p<0.05) but was

no statistically significant difference at 90 - 120 minutes in pasteurized milk and at 60 - 90 minutes and 120 - 180 minutes in sterilized saline(p>0.05).

In conclusion, HBSS as storage medium of an avulsed tooth is not practical on the spot. Insteadily pasteurized milk can be recommended to maintain the periodontal ligament cells viability.

Key word : MTT assay, periodontal ligament cell viability, storage media,

I. 서 론

치아와 지지조직의 손상은 유아가 기어다니기 시작하면서 발생하며 걸음마를 시작하면서부터 빈도가 증가하는데 주로 넘어지거나 부딪혀서 손상을 받게된다. 아동이 학교에 들어가면 놀이나 운동경기, 교통사고 및 싸움등으로 여러 가지 손상을 받게된다. 외상성 손상의 종류로는 치아진탕, 아탈구, 치아 파절, 치근파절 및 치아탈구등이 있는데 영구전치가 맹출하는 7 - 11세 아동에서는 발육중인 짧은 치근과 느슨한 치주인대로 인하여 치아와 지지조직의 손상시 치아탈구가 빈번히 발생한다^{1,2)}. 탈구된 치아를 재식하는 경우의 성공은 치조와에서의 시간, 치주인대세포의 보존, 치근의 발육정도, 감염방지, 고정, 적절한 시기의 근관치료에 달려있다. 재식된 치아의 가장 흔한 속발증으로는 치근흡수가 있으며 치조와 외에서의 시간과 치주인대세포 보존을 위한 저장 환경에 따라 다양한 정도로 발생한다³⁾. 즉시 재식하는 것이 바람직하지만 그렇지 못한 경우는 치근흡수를 방지하고 치아재식의 성공율을 높이기 위해 치주인대세포의 보존이 중요하다고 알려져있다⁴⁾.

탈구된 치아의 재식시 저장용액과 치조와에서의 시간에 따른 치근흡수에 대한 연구를 살펴보면, Andreasen등은⁵⁾ 원숭이 치아를 인위적으로 탈구시켜 수돗물, 생리적 식염수, 타액, 건조된 상태로 보관후 재식하여 치근흡수를 관찰하였는데 표면흡수는 구강의 잔류 시간과 저장용액의 종류에 무관하게 모든 경우에서 발생하였으며, 30분 건조 경과후 재식한 경우는 염증성 치근 흡수가 발생하였고 60분이 경과한 경우는 대체 치근흡수가 발생할 확률이 높았으며, 30분 건조된 치근 표면에서는 28%의 치주인대세포만이 생존함을 보고하였다. Blomlöf등은³⁾ 건

조된 상태로 보관시 심한 치근흡수를 피하기 위한 한계시간은 30 - 40분이라고 하였다.

대체성 치근흡수나 염증성 치근흡수는 바람직하지 못한 치주인대의 반응의 결과로서 조절되지 않으면 결국 치아 상실을 초래한다. 치근흡수를 방지하여 치아재식의 성공률을 높이기 위해서는 재식할 때까지 치주인대세포의 생활력 보존이 필요하다. 이를 위하여 세포조직액의 증발을 막기 위한 다양한 방법들이 연구되었는데 plastic foil로 감싸거나 cryopreservative agent를 이용하거나 저장용액에 담가오는 방법들이 있다^{3,6)}. 저장용액으로는 수돗물, 타액, 생리적 식염수, 우유, 달걀 흰자, 세포 배양액, 조직 이식 저장액등이 이용될 수 있다⁷⁾.

저장 용액에 대한 평가 중 온도에 따른 생존율을 비교한 논문에서는 4℃와 23℃에서 치주인대세포의 생존율은 4℃에서 보다 높고 세포부종은 낮은 것으로 보고되었는데, 이는 저온에서 세포독성물질의 활성화가 감소되기 때문이다⁸⁻¹⁰⁾. 그러나 최근에 얼음에 저장시킨 후 재식하여 임상적 결과 향상을 유도하는 연구는 광범위한 치근흡수가 발생하여 실패하였다¹¹⁾. 결국 임상적 성공에는 구강의 존재 시간이 더 중요한 것임을 암시한다.

저장용액의 평가에서 중요한 것은 치주인대세포의 생존에 영향을 주는 삼투압, 필수영양소 함유, pH, 세균과 독소의 유무등이 있다¹²⁾. 이중에서도 중요한 것이 저장용액의 삼투압으로서 세포막의 통합성 유지를 위해서는 세포외액과 등장성인 용액을 사용해야한다^{10,13)}. 이런 조건에 맞는 이상적인 용액으로 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)이 추천되고 있으나⁹⁾ 사고 현장에서 쉽게 구할 수가 없으므로 손쉽게 구할 수 있는 다양한 저장용액들이 연구되어왔다. 초기에는 건조한 상태보다는 타액에서

장하는 것이 높은 재식 성공을 보인다고 하였으나⁷⁾ 타액이나 수돗물은 저장성 용액으로 세포의 팽윤에 의한 파괴 때문에 생리적 식염수나 우유 같은 등장성 용액에 대해서 연구하게 되었다^{10,14-16)}. Rosenfab등은¹⁷⁾ 달걀 흰자를 저장용액으로 사용하여 치주인대 세포의 생존율을 평가하였는데 우유와 대등한 결과를 나타내었다. Huang등은⁹⁾ 콘택트렌즈용 식염수를 이용하였으나 보존약제가 첨가되므로 치주인대 세포의 생존율은 낮았으며 이의 사용은 추천되지 않는다고 하였다. Oslon등은¹⁵⁾ 스포츠현장에서 쉽게 구할 수 있는 Gatorade를 이용하여 치주인대 세포의 생존율을 평가하였는데, 등장성이고 이온을 함유하며 당류도 포함되어 있지만 pH 2.8로 낮아서 세포의 생존을 방해함을 보고하였다.

세포의 생존력을 측정하는 방법으로는 직접 생활 세포수를 세거나¹⁷⁾, lactate dehydrogenase를 이용하여 세포를 분해한 후 단백질을 측정하거나¹⁸⁾, 세포 증식시 방사선 동위원소를 이용하거나¹²⁾, fluorescein diacetate나¹⁶⁾ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxy-phenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium(MTS) assay¹⁵⁾ 또는 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) assay^{19,20)} 등의 효소활성 실험을 이용하는 방법이 있다.

이러한 다양한 측정방법을 이용하여 치주인대 세포의 생존율을 높이기 위한 여러 가지 방법들이 연구되어져 왔으나 저장용액에 대한 평가가 서로 다른 경우가 많았고 국내에서 보고된 바가 적었다. 본 실험은 이에 착안하여 치아재식후 성공률을 높이기 위한 치주인대세포의 보존에 적합하면서도 사고현장에서 쉽게 구할 수 있는 저장용액을 평가하기 위해, 살아있는 세포의 효소활성을 이용한 MTT assay로써 수종의 저장용액에서 치주인대세포의 생존율을 측정하였으며, 각 저장용액의 삼투압을 측정하여 그 영향을 비교하였다.

II. 실험 재료 및 방법

가. 실험 재료

1. 치주인대세포의 배양

교정용 목적으로 발거된 건강한 제 1소구치를 치

관부에서 치은부착부 2mm까지를 5% NaOCl에 1분간 위치시킨 후 치근 중간 1/3 부위에서 치주인대 조직을 # 15 blade로 채취한 뒤 HBSS(Gibco/BRL Life Technologies Inc., USA.)와 함께 1000 rpm에서 5분간 원심분리를 2회 시행하였다.

원심분리된 조직은 25cm² 배양접시에서 20% Fetal bovine serum(FBS)(Gibco/BRL Life Technologies Inc., USA.), 100unit/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin, 0.5mg/ml amphotericin-B가 포함된 α -minimal essential medium(α -MEM)(Gibco/BRL Life Technologies Inc., USA.)에 넣고 37°C, 100% 습도, 5% CO₂ 공기혼합 배양기(Forma Scientific Inc., USA.)에서 배양하였다.

치주인대세포가 단층으로 증식하게 되면 0.05% trypsin(Gibco/BRL Life Technologies Inc., USA.)으로 부착세포를 분리하고 100mm 세포 배양접시를 이용하여 10% FBS함유 α -MEM배지로 5-7일 간격으로 계대배양하였다. 본 실험에서는 세포의 균일한 특성을 얻기 위해 4세대의 세포를 사용하였다.

2. 저장용액

저온살균된 우유, 멸균된 생리적 식염수, 비자극성 타액, 건조된 상태로 방치하는 것과 대조군으로 10% FBS함유 α -MEM 배지를 사용하였다. 비자극성 타액은 치주질환이 없는 3인으로부터 받아서 -70°C로 냉동보관하여 사용하였다.

나. 실험 방법

1. MTT assay를 이용한 세포생존율 측정

4세대로 배양된 세포를 0.05% trypsin으로 처리하여 부착세포를 분리시켜 원심분리한 후 trypan blue(Gibco/BRL Life Technologies Inc., USA.)로 염색하여 hemocytometer로 세포수를 측정하고 96well의 배양접시에 각 well당 5×10⁴개의 세포가 존재하도록 10% FBS함유 α -MEM배양액 200 μ l를 넣은 후 공기혼합 배양기에서 배양하였다.

배양 1일후 세포가 배양접시바닥에 완전히 부착된 상태를 확인한 후 배양액을 제거하고 대조군은 10% FBS함유 α -MEM 200 μ l를 주입하고, 저온살균된 우유, 멸균된 생리적 식염수, 타액을 각각 200 μ l씩 넣고 나머지군은 건조한 상태로 두었다.

25°C 실온에서 배양 30, 60, 90, 120, 180분 후에 저장용액을 제거하고 1M phosphate buffer 용액에 1mg/ml로 용해시킨 200µl의 MTT용액(Sigma Chemical Co., USA.)을 각 well에 첨가후 4시간동안 공기혼합 배양기에서 세포배양을 실시하였다. 세포배양후 배양액을 제거하고 50µl의 Dimethyl sulfoxide(DMSO)(Sigma Chemical Co., USA.)용액을 첨가하여 형성된 formazan 결정을 용해시킨 후 ELISA reader(Toyo instrument Inc., Japan.)로 파장 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 본 실험은 각 군마다 4개의 표본을 이용하여 3회 반복 시행하였다.

2. 삼투압 측정

20µl의 10% FBS함유 α-MEM, 저온살균된 우유, 멸균된 식염수, 타액으로 OSMOMETER FISKE 110(Fiske Associates Inc., USA.)으로 3회 자동측정하였다.

Table 1. Median optic density according to kind of storage media.

material	time(min)	Median OD	Range
α-MEM	30	0.253	0.223~0.276
	60	0.252	0.238~0.277
	90	0.246	0.195~0.265
	120	0.249	0.234~0.278
	180	0.253	0.230~0.277
Milk	30	0.211	0.195~0.238
	60	0.196	0.173~0.221
	90	0.167	0.148~0.183
	120	0.159	0.143~0.211
	180	0.141	0.125~0.159
Saline	30	0.185	0.166~0.208
	60	0.157	0.142~0.186
	90	0.145	0.121~0.225
	120	0.132	0.107~0.188
	180	0.121	0.097~0.150
Saliva	30	0.145	0.114~0.208
	60	0.123	0.104~0.138
	90	0.105	0.085~0.128
	120	0.085	0.075~0.129
	180	0.072	0.064~0.119
Bench-dried	30	0.000	0.000~0.044
	60	0.000	0.000~0.000
	90	0.000	0.000~0.000
	120	0.000	0.000~0.000
	180	0.000	0.000~0.000

3. 통계 분석

각 조사시점에서 저장용액간의 비교는 유의성있는 차이가 있는지 알아내기 위하여 비모수적인 방법인 Kruskal-Wallis test를 시행하였으며, 저장용액간의 차이를 알아 보기위해 multiple comparison-duncan method를 이용하였고, 각 저장용액에서의 조사시점에 따른 비교는 Friedman test를 시행하였다. 모든 실험에서 p<0.05를 유의한 수준으로 평가하였다.

Ⅲ. 실험 성적

가. MTT assay를 이용한 수종의 저장용액에서의 치주인대세포의 생존을 비교값

각 저장용액에 대한 조사시점별의 optic density(OD)값은 Table 1 및 Fig. 1과 같다.

각 조사시점에서의 저장용액간의 비교를 보면 시간대별로 10% FBS 함유 α-MEM, 저온살균된 우유, 멸균된 생리적 식염수, 타액, 건조보관은 모두 유의성있는 차이를 보였으며, 순서대로 감소하는 OD값

Table 2. Comparison of storage media at each time.

	30min	60min	90min	120min	180min
α-MEM	0.253	0.252	0.246	0.249	0.253
Milk	0.211	0.196	0.167	0.159	0.141
Saline	0.185 *	0.157 *	0.145 *	0.132 *	0.121 *
Saliva	0.145	0.123	0.105	0.085	0.072
Bench-dried	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

* statistically significant at p<0.05 (Kruskal-Wallis test/duncan method)

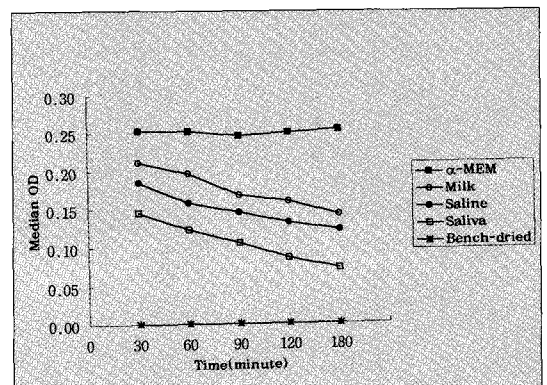


Fig. 1. Change of median optic density.

Table 3. Comparison between the time for each storage medium. (Friedman test)

	α -MEM	Milk	Saline	Saliva	Bench-dried
30min	0.253	0.211	0.185	0.145	0.000
60min	0.252	0.196	0.157	0.123	0.000
90min	0.246	0.167	0.145	0.105	0.000
120min	0.249	0.159	0.132	0.085	0.000
180min	0.253	0.141	0.121	0.072	0.000

* statistically significant at $p < 0.05$
 - statistically insignificant at $p > 0.05$

Table 4. Median osmolarity of storage media(unit: mOsm)

	α -MEM	Milk	Saline	Saliva
Osmolarity	298	282	288	97

을 보임으로서 우유에서 가장 많은 세포가 활성화상태로 존재함을 알 수 있다(Table 2).

각 저장용액에서 조사시점에 따른 변화를 보면, 대조군으로 사용한 10% FBS 함유 α -MEM에서는 유의차있는 변화가 없는데 이는 치주인대세포가 3시간이내에는 증식되지 않았음을 보여준다. 저온살균된 우유에서는 90 - 120분 경과사이에만 유의차가 없고 시간이 흐름에 따라 세포수가 유의성있게 감소함을 보여준다. 식염수의 경우는 60 - 90분, 120 - 180분 경과사이에만 유의차가 없고 시간이 흐름에 따라 세포수가 유의성있게 감소함을 보여준다. 타액의 경우는 시간의 흐름에 따라 세포수가 유의성있게 감소함을 보여준다. 건조된 경우는 30분에서만 일부 생존세포가 존재하였으며 60분 경과 후에는 생존세포는 없었다(Table 3).

나. OSMOMETER FISKE 110을 이용한 삼투압 측정

10% FBS함유 α -MEM, 저온살균된 우유, 멸균된 식염수는 288 - 298mOsm로서 모두 체액과 유사한 삼투압을 보였으나 비자극성 타액은 97mOsm로 저장성 용액임을 나타내었다(Table 4).

Ⅳ. 총괄 및 고찰

치아의 외상으로 인한 탈구시 재식술을 시행하게 된다. 그러나 재식후 여러 가지 인자들에 의해 치근

흡수가 발생하여 실패의 원인이 되므로 재식후 치근 흡수 방지를 위하여 치아탈구후 치주인대세포의 생활력유지가 중요하다.

치주인대세포의 생활력 유지와 치근흡수에 대한 실험은 원숭이^{3,6,21,22)}나 개^{23,24)} 및 쥐²⁵⁾를 이용하여 인위적으로 탈구시킨 후 재식하여 관찰하는 동물 실험들이 있고, 사람에게 대해서는 in vitro 실험을 통한 치주인대세포의 저장용액에 대한 생존을 평가 실험이 시행되어져 왔다^{8-10,13-18,22,26-28)}.

세포의 생존력을 측정하는 방법들을 살펴보면, 생활 세포수 산정은¹⁷⁾ neutral red나 trypan blue를 이용하여 세포 염색후 생활 세포를 hemocytometer로 측정하는 것이며, lactate dehydrogenase는¹⁸⁾ 치주인대세포의 과산산물로서 파괴된 정도를 알 수 있고, 방사선 동위원소를¹²⁾ 이용하여 유사분열중인 세포를 관찰할 수 있으며, fluorescein diacetate는¹⁶⁾ 살아있는 세포내에서 intracellular esterase에 의해 형광물질로 바뀌는 것으로 측정될 수 있다. MTT assay는 세포독성 검사에서 널리 쓰이는 방법으로 효소활성 실험의 일종이며 색의 차이를 이용하여 세포수나 활성도를 알 수 있다^{27,29)}. MTT 용액속에 있는 tetrazolium ring이 활성화된 미토콘드리아내에 있는 dehydrogenase와 반응하여 비용해성의 보라색 MTT formazan을 형성하게된다. 이를 DMSO용액으로 용해시킨 후 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정함으로써 세포독성이나 세포활성정도를 색의 변화정도를 통해 알 수 있게 한다. 따라서 생활 세포수 산정이나 방사선 동위원소를 이용하는 것보다 많은 양을 간단하면서도 빠르고 정확하게 측정할 수 있다. Lekic등에¹⁰⁾ 의하면 4℃ 우유에 15 - 120분 저장시 염색법에 의한 세포수 감소는 50%, 부착능력은 5배 감소, clonogenic capacity는 25배 감소한다고 하

었는데 구강외 시간과 저장환경이 clonogenic capacity에 많은 영향을 주었음을 알 수 있었다. 그러므로 dye inclusion에 의한 세포막의 통합성을 평가하는 생활 세포수 산정방법보다 회복능력이나 clonogenic capacity를 알아보는 것이 재식후 치주인대세포의 치유능력 평가에 중요하므로 본 실험에서는 세포활성을 평가하는 MTT assay를 이용하였다.

본 실험은 외상으로 인한 치아탈구 발생시 치주인대세포의 생존력 보존을 위한 저장용액으로 사고현장에서 쉽게 구할 수 있는 우유, 식염수, 타액을 저장용액으로 이용하였다. 탈구된 치아의 저장환경에는 저장온도, pH, 삼투압, 저장 시간, 저장용액의 구성성분, 세균의 유무등 여러 요소가 관여하는데 본 실험에 사용된 저장용액의 온도는 25℃로 일정한 조건을 부여하였으며 pH 6.8 - 7.2 로서 체내 상태와 유사하였으며 구성성분과 삼투압 및 세균의 유무에서 차이를 보였다.

Andreasen등은¹⁾ 치아의 재식후 발생하는 치근흡수를 방지하기 위해서는 30분이내 재식술 시행시 90%에서 2년 경과까지 치근흡수가 없다고 하였으며 2시간이상 경과된 경우 재식치의 치근 흡수가 95%에서 발생한다고 하였고, 미완성 치근의 경우 3시간이내 재식시 재혈관화가 이뤄질 수 있으며, 1시간 경과 후 재식할 때에는 2.4% sodium fluoride 용액에 20분간 담근 후 재식해야 치근흡수가 적다²³⁾ 고한 것에 근거하여 본 실험에서는 실험 시간을 임상적으로 중요하다고 알려진 시점인 30 - 180분 동안으로 설정하였다.

Lindskog등은¹²⁾ H³이용한 치주인대세포의 유사분열 실험에서 우유에서는 6시간이 경과되어도 변화가 없으나 타액에서는 급격히 감소하여 3시간후에는 유사분열이 일어나지 않으며 건조한 상태로 보관한 경우에는 1시간후면 유사분열이 일어나지 않았다고 하였다. 탈구된 치아를 재식하였을 때 타액에 1시간 저장한 경우는 치근흡수가 발생하지 않았으나 2시간이상인 경우 치근흡수를 보였고, 우유는 6시간 저장에도 미미한 치근흡수를 보였으며, 건조한 상태로 25℃ 실온에 30분간 방치한 경우 일부에서 생존세포가 있었으나 60분 경과후에는 생존율 0%였다고 보고하였다. 이는 Söder등의²⁸⁾ 연구와도 일치된 결과를 보인다. 그러나 Blomlöf등에³⁾ 의하면 저장용액에 넣지 않더라도 탈구된 치아를 plastic

foil로 감싸면 1시간 경과후 치주인대세포가 70% 생존하며 재식하여도 즉시 재식한 것과 유사한 치근흡수를 나타냄을 관찰하고 치주인대세포막의 증발을 막는 것이 중요하다고 하였다. 따라서 치아탈구 발생시에는 치주인대세포를 건조되지 않도록 보존하는 것이 중요한데 plastic foil외에도 다양한 저장용액에 담가둠으로써 세포막의 증발을 막을 수 있다. 본 실험에서는 3시간까지의 시간이 경과됨에 따라 활성화된 세포수는 점진적으로 감소함을 알 수 있다. 우유에서는 3시간 경과후 초기의 70%가 생존하지만 식염수에서는 50%, 타액에서는 1시간후에는 50%, 3시간후 25%만 생존함을 알 수 있다. 실험의 결과는 우유, 식염수, 타액, 건조 순으로 생존율이 감소하여 우유가 가장 좋은 저장용액임을 보여준다. 이는 많은 선학들의 연구결과와도 일치한다.

세포생존과 세포막의 통합성에 대한 저장용액의 구성성분과 삼투압에 대한 연구에서 Blomlöf등은²⁶⁾ 타액에 NaCl을 생리적 수준까지 첨가하여 삼투압을 높였더니 식염수와 유사한 수준까지 생존력이 향상됨을 보고하였는데 이는 삼투압의 중요성을 설명해주는 것으로 저장성 용액에 의한 세포팽윤과 이로인해 세균독소에 의한 세포막파괴가 촉진됨을 의미한다. Söder등은²⁸⁾ 우유, 식염수, physiologic sucrose, 타액, 타액과 같은 삼투압의 sucrose용액을 대상으로 한 실험에서 같은 삼투압의 sucrose용액보다 타액에서 낮은 생존율을 보였는데 이는 같은 삼투압이기는 하지만 타액내의 세균때문에 세포파괴가 촉진되었기 때문이라고 하였다. Lindskog등은¹²⁾ SEM을 이용하여 타액에 저장할 때 치주인대세포의 표면을 거의 완전히 덮고 있는 사상균을 관찰하였다. 저온살균된 우유에서도 소량 덮고 있는 것이 발견되었으나 치주인대세포에 세균이 부착되더라도 병인성 요소가 중요하므로 저온 살균된 우유보다는 타액에 존재하는 세균에 의해 치주인대세포의 파괴가 촉진된다 하겠다. 이들의 세포독성은 온도 의존성이라 37℃에서 최고 효과를 나타내므로⁸⁾ 저온저장이 유리할 수 있으나 이견을 보이는 논문들이^{6,11)} 많으므로 임상 적용에 대해서는 보다 광범위한 연구가 요구된다. 본 실험에서 사용된 저장용액에서의 치주인대세포 생존율 결과를 보면 타액은 우유와 식염수에 비해 생존 세포수와 활성이 급격히 감소함을 알 수 있었다. 이는 체내의 환경에 크게 못미치는 타액의 삼투압이

중요하게 작용하여 세포를 팽윤시키고 세포막의 통합성을 약화시켜 구강내 정상 세균층에 의한 세균과 세균 효소 및 세균 독소에 의한 세포막의 파괴가 촉진되었기 때문으로 생각된다.

본 실험에서 우유와 식염수는 등장액이므로 타액보다 우수한 세포생존율을 보이나 식염수보다는 우유에서 더 높은 생존율을 보인다. 즉 같은 삼투압이라도 저장액의 구성 성분이 세포 생존에 중요함을 의미한다. Alacam등에¹⁸⁾ 의하면 식염수는 Ca^{2+} , Mg^{2+} 같은 대사용 필수 이온이 결여되어 있으나 우유에는 이외에도 필수영양소가 있어서 세포 보호 효과를 갖는다고 하였다. 이는 physiologic sucrose가 식염수보다 생존율이 높은 이유로 glucose가 있기 때문인 것과 같은 이유이다¹³⁾. 그러나 등장성 용액이면서 glucose와 fructose를 가지고 있는 Gatorade는 pH 2.8로 낮아서 세포생존에 적당치 않으며¹⁵⁾ 렌즈 세척용 식염수는 등장성 용액이며 멸균된 상태이나 보존을 위한 약제가 포함되어 있어서 세포생존에는 불리하다⁹⁾. Osion등에¹⁵⁾ 의하면 platelet derived growth factor(PDGF)는 치주인대세포를 유사분열시키는 효과가 있다고 하였으며 Belford등은³⁰⁾ 우유로부터 중배엽성에서 유래된 세포의 활성을 촉진하는 growth factor를 추출하였다. 따라서 우유가 저장용액으로 좋은 이유는 pH buffer system 작용, 등장성 용액, growth factor와 필수 영양소 함유로 인한 세포 보호 효과, 세포독성을 가진 세균이 없기 때문이라고 할 수 있다.

이상에서 살펴본 바와 같이 저온살균된 우유, 멸균된 식염수, 타액을 탈구된 치아의 저장용액으로 평가해 볼 때 우유에서 가장 많은 세포가 활성화 상태로 존재하였으며 식염수, 타액 순으로 감소함을 알 수 있었다. 따라서 외상으로 인한 치아탈구 발생시 저장용액으로 HBSS가 추천되고 있으나 사고 현장에서 쉽게 구할 수 있고 치주인대세포의 생활력 보존에도 유리한 저온살균된 우유에 탈구된 치아를 담가오도록 추천할 수 있겠다. 끝으로 본 연구에서는 치아 재식후 성공률을 높이기 위한 여러 가지 방법중 치주인대 치유능력을 보고자 치주인대세포를 저장용액에 보관후 세포수나 세포활성도 등을 관찰하였으나 in vitro 실험이므로 재식후 발생하는 치근 흡수를 평가하기 위해서는 in vivo에서의 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료되며 저장용액의 온도에

따른 평가 및 이온음료같은 다른 저장용액들에 대한 비교연구가 필요하리라 사료되는 바이다.

V. 결 론

치아탈구 발생시 사고 현장에서 쉽게 구할 수 있는 저장용액을 이용하여 치주인대세포의 생존율을 비교해보고자 치주인대세포를 10% FBS함유 α -MEM에서 배양한 후 α -MEM에서 저장한 균을 대조군으로 하고 동일한 조건하에서 저온살균된 우유군, 멸균된 생리적 식염수군, 비자극성 타액군, 건조된 상태로 방치한 균을 실험군으로 하여 25°C 실온에서 세포 배양 30, 60, 90, 120, 180분 후에 각 군에 대해 MTT assay를 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 각 조사시점에서 실험군간의 비교에서는 모두 유의성있는 차이를 보였으며 저온살균된 우유군에서 치주인대세포의 생존율이 가장 높았고, 멸균된 생리적 식염수군, 비자극성 타액군, 건조된 상태로 방치한 군 순으로 점차 감소하였다($P < 0.05$).
2. 각 실험군내에서 조사시점간의 비교에서는 치주인대세포의 생존율이 시간이 경과함에 따라 유의성있게 감소하였으나($p < 0.05$) 저온살균된 우유군에서 90 - 120분 경과 사이, 멸균된 생리적 식염수군에서 60 - 90분과 120 - 180분 경과 사이에서는 유의성있는 차이는 없었다($P > 0.05$).

이상의 결론을 종합해 볼 때 외상으로 인한 치아탈구 발생시 저장용액으로 HBSS가 추천되고 있으나 사고 현장에서 쉽게 구할 수 있고 치주인대세포의 생활력 보존에도 유리한 저온살균된 우유에 탈구된 치아를 담가오도록 추천할 수 있겠다.

참 고 문 헌

1. Andreasen JO, Andreasen FM : Textbook and color atlas of traumatic injuries to the teeth. Ed. 3. Munksgaard, Mosby Co., 383-426, 1994.
2. 대한소아치과학회 : 소아치과학, 2판, 서울, 이화출판사, 253-287, 1990.
3. Blomlöf L, Andersson L, Lindskog S, et al. : Periodontal healing of replanted monkey

- teeth prevented from drying. *Acta Odontol Scand* 41:117-123, 1983.
4. Courts FJ, Muller WA, Tabeling JH : Milk as an interim storage medium for avulsed teeth. *Pediatr Dent* 5:183-186, 1983.
 5. Andreasen JO : Effect of extraalveolar 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.
 6. Schwartz O, Andreason JO : Cryopreservation of mature teeth before replantation in monkeys. *Int J Oral Surg* 12:425-436, 1983.
 7. Oswald KJ, Harrington GW, Hassel MJ : A postreplantation evaluation of air dried and saliva stored avulsed teeth *J Endod* 6:546-551, 1980.
 8. Blomlöf L, Otteskog P : Viability of human periodontal ligament cells after storage in milk or saliva. *Scand J Dent Res* 88:436-440, 1980.
 9. Huang SC, Remeikis NA, Daniel JC, et al. : Effects of longterm exposure of human periodontal ligament cells to milk and other solutions. *J Endodon* 22:30-33, 1996.
 10. Lekic P, Kenny D, Moe HK, et al. : Relationship of clonogenic capacity to plating efficiency and vital dye staining of human periodontal ligament cells: implications for tooth replantation. *J Periodont Res* 31:294-300, 1996.
 11. Kaqueler JC, Massler M : Healing following tooth replantation. *ASDC J Dent Child* 304-413, 1969.
 12. Lindskog S, Blomlöf L, Hammarström L : Mitosis and microorganism in the periodontal membrane after storage in milk or saliva. *Scand J Dent Res* 91:465-472, 1983.
 13. Lindskog S, Blomlöf L : Influence of osmolarity and composition of some storage media on human periodontal ligament cells. *Acta Odontol Scand* 40:435-441, 1982.
 14. Blomlöf L, Otteskog P, Hammarström L : Effects of storage in media with different ion strength and osmolarities on human periodontal ligament cells. *Scand J Dent Res* 89:180-187, 1981.
 15. Oslon BD, Mailhot JM, Anderson RW, et al. : Comparison of various transport media on human periodontal ligament cell viability. *J Endodon* 23:676-679, 1997.
 16. Patil S, Dumsha TC, Sydiskis RJ : Determining periodontal ligament cell viability from exarticulated teeth stored in saline or milk using fluorescein diacetate. *Int Endod J* 27:1-5, 1994.
 17. Rosenfab N, Kupietzky A, Shey Z : Milk and egg albumen are superior to human saliva in preserving human skin fibroblasts. *Pediatr Dent* 19:166-167, 1997.
 18. Ala am T, Gorgul G, Omurlu H, et al. : Lactate dehydrogenase activity in periodontal ligament cells stored in different transport media. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 82:321-323, 1996.
 19. Carmichael J : Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assesment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47:936-942, 1987.
 20. Mosmann T : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 65:55-63, 1983.
 21. Blomlöf L, Lindskog S, Andersson L, et al. : Storage of experimentally avulsed teeth in milk prior to replantation. *J Dent Res* 62:912-916, 1983.
 22. Lindskog S, Blomlöf L : Repair of periodontal tissue in vivo and in vitro. *J Clin Periodontol* 10:185-205, 1983.

23. Selvig KA, Bjorvam K, Chaffey N : Effects of stannous fluoride and tetracycline on repair after delayed replantation of root-planted teeth in dog. *Acta Odontol Scand* 48:107-112, 1990.
24. Trope M, Yesilsoy C : Effect of different treatment protocol on periodontal repair and root resorption of replanted dog teeth. *J Endod* 18:492-496, 1992.
25. 김 광철, 이 공호 : 완전탈구된 치아의 보관방법에 따른 재식후 치주인대회복과 섬유아세포의 변화에 관한 연구, *대한소아치과학회지*, 16:36-55, 1989.
26. Blomlöf L : Storage of Human periodontal ligament cells in a combination of different media. *J Dent Res* 60:1904-1906, 1981.
27. Modeer T, Dahllöf T, Otteskog P : Effect of drying on human periodontal ligament repair in vitro. *J Int Assoc Dent Child* 15:15-20, 1984.
28. Söder PÖ, Otteskog P, Andreasen JO, et al. : Effect of drying on viability of periodontal membrane. *Scand J Dent Res* 85:164-168, 1977.
29. Hupp JP, Mesaros SV, Aukhil I, et al. : Periodontal ligament vitality and histologic healing of teeth stored for extended periods before transplantation. *Endod Dent Traumatol* 14:79-83, 1998.
30. Belford DA, Rogers ML, Regester GO : Milk derived growth factors as serum supplements for the growth of fibroblasts and epithelial cells. *In vitro Cell Dev Biol Animal* 31:752-760, 1995.
31. Trope M : Clinical management of the avulsed tooth. *Dent Clin North Am* 39:93-112, 1995.
32. Trope M : Protocol for treating the avulsed tooth. *CAD Journal* 24:43-49, 1996.
33. Vistica DT : Tetrazolium based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res* 51:2515-2520, 1991.
34. Waymouth C : Osmolality of mammalian blood and media for culture of mammalian cells. *In Vitro* 6:109-127, 1970.
35. Andreasen JO : Time related study of periodontal healing and root resorption activity after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Swed Den. J* 4:101-110, 1980.
36. Berridge M, Tan AS : Characterization of cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT): subcellular localization, substrate dependence and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 303:474-482, 1993.
37. Blomlöf L, Otteskog P : Composition of human periodontal ligament cells in tissue culture. *Scand J Dent Res* 89:43-47, 1981.
38. Hammarstrom L, Pierce A : Tooth avulsion and replantation : A review. *Endod Dent Traumatol* 2:1-8, 1986.
39. Krasner P, Person P : Preserving avulsed teeth for replantation. *JADA* 123:80-88, 1992.
40. Krasner P, Rankow J : New philosophy for the treatment of avulsed teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 79:616-623, 1995.
41. Mackie I, Worthington HV : An investigation of replantation of traumatically avulsed permanent incisor teeth. *Brit Dent J* 172:17-20, 1992.

국문초록

수종의 저장용액에서 치주인대세포의 생존율 비교

최원경 · 최형준 · 최병재 · 이종갑

연세대학교 치과대학 소아치과학교실

치아탈구 발생시 사고 현장에서 쉽게 구할 수 있는 저장용액을 이용하여 치주인대세포의 생존율을 비교해보자 치주인대세포를 10% FBS함유 α -MEM에서 배양한 후 α -MEM에서 저장한 군을 대조군으로 하고 동일한 조건하에서 저온살균된 우유군, 멸균된 생리적 식염수군, 비자극성 타액군, 건조된 상태로 방치한 군을 실험군으로 하여 25°C 실온에서 세포 배양 30, 60, 90, 120, 180분 후에 각 군에 대해 MTT assay를 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 각 조사시점에서 실험군간의 비교에서는 모두 유의성있는 차이를 보였으며 저온살균된 우유군에서 치주인대세포의 생존율이 가장 높았고, 멸균된 생리적 식염수군, 비자극성 타액군, 건조된 상태로 방치한 군 순으로 점차 감소하였다($P < 0.05$).
2. 각 실험군내에서 조사시점간의 비교에서는 치주인대세포의 생존율이 시간이 경과함에 따라 유의성있게 감소하였으나($p < 0.05$), 저온살균된 우유군에서 90 - 120분 경과 사이, 멸균된 생리적 식염수군에서 60 - 90분과 120 - 180분 경과 사이에서는 유의성있는 차이는 없었다($P > 0.05$).

이상의 결론을 종합해볼 때 외상으로 인한 치아탈구 발생시 저장용액으로 HBSS가 추천되고 있으나 사고 현장에서 쉽게 구할 수 있고 치주인대세포의 생활력 보존에도 유리한 저온살균된 우유에 탈구된 치아를 담가오도록 추천할 수 있겠다.

주요어 : 저장용액, 치주인대세포 생존력, MTT assay