

자가 산부식 프라이머의 세포독성에 관한 실험적 연구

이창훈^a · 김인령^b · 김규천^c · 김성식^d · 손우성^e

자가 산부식 프라이머는 세포독성이 있는 것으로 알려져 있어 교정치료를 하는 동안 치주조직에 손상을 일으킬 수 있다. 본 연구의 목적은 자가 산부식 프라이머가 치주조직에 미치는 영향을 평가해 보고 이를 전통적인 접착법에 사용되는 프라이머와 비교하기 위하여 시행되었다. 시편은 임상에서 브라켓 접착 시 사용하는 Transbond XT Adhesive (3M Unitek, Monrovia, CA, USA)를 각각 Transbond XT Primer (3M Unitek, Monrovia, CA, USA), Clearfil SE bond (Kuraray, Osaka, Japan), Transbond Plus Self Etching Primer, Adper Prompt L-Pop (3M Unitek, Monrovia, CA, USA)과 혼합한 후 광중합하여 제작하였고, Transbond XT Adhesive를 중합한 대조군과 비교하였다. 이를 배양된 HGF-1 (Human Gingiva Fibroblast), HaCaT (Human Keratinocyte cell line), RHEK (immortalized Human Epidermal Keratinocyte)에 노출시킨 후 세포의 형태 변화를 관찰하였고, MTT assay를 시행하여 세포독성을 비교, 평가하였다. 실험결과 72시간 후 HGF-1, HaCaT, RHEK를 이용한 실험에서 모든 프라이머의 세포독성이 높게 나타나 세포 돌기의 위축, 세포 형태의 변화, 세포 수의 감소, 세포의 괴사가 관찰되었다. MTT assay 실험 시 HGF-1을 이용한 실험에서 Clearfil SE Bond, Transbond XT Primer, Transbond Plus SEP, Adper Prompt L-Pop의 순으로 세포독성이 높게 나타났고, HaCaT를 이용한 실험에서 Clearfil SE Bond, Adper Prompt L-Pop, Transbond Plus SEP, Transbond XT Primer의 순으로 세포독성이 높게 나타났으며, RHEK를 이용한 실험에서 Clearfil SE Bond, Transbond XT Primer, Adper Prompt L-Pop, Transbond Plus SEP 순으로 세포독성이 높게 나타났다. 자가 산부식 프라이머는 전통적으로 사용되는 프라이머와 마찬가지로 세포독성이 유의하게 높으므로 구강내 사용시 주의가 필요하다. (대치교정지 2006;36(6):422-33)

주요 단어: 세포독성, 자가 산부식 프라이머

서론

산부식을 이용한 접착 기술의 개발로 교정 장치의 직접 접착이 가능해진¹ 이후에 시술 과정을 단순화하기 위한 연구가 계속되어 왔다. 초기에 범랑질 산부식 후 수세의 과정을 거쳤던 시술 과정이 최근에

는 산부식과 산수세의 과정이 필요 없는 자가 산부식 프라이머(self-etching primer)가 개발되면서 교정 장치를 치아에 직접 접착하는 과정이 간편하게 되었다.

자가 산부식 프라이머를 이용한 교정 장치의 직접 접착법은 산부식 및 산수세의 과정이 없기 때문에 시술 시간이 단축될 뿐만 아니라 이로 인해 타액이나 혈액에 의한 오염 가능성이 줄어 접착 시에 장점이 있다. 또한 산으로 범랑질 부식 후 수세하던 시스템에 비해 타액 및 수분 오염에 덜 민감하여 오염된 치아에서도 기존의 접착 방법과 유사한 접착강도를 보였다.^{2,3} 뿐만 아니라 범랑질 부식을 위해 30 ~ 40%의 인산을 사용하던 것과 비교해 볼 때 10%의 인산, 2.5% 질산과 같이 낮은 농도의 산 부식제를 사용함에도 불구하고 종전과 유사한 부식 효과를 얻을 수 있고 전통적인 산부식과 산수세에 의한 접착법과 유사한 접착강도를 얻을 수 있다.^{4,10} 특히 매복치를

^a전공의, 부산대학교 치과대학 교정학교실.

^b조교, ^c조교수, 부산대학교 치과대학 구강해부학교실, 구강생물공학연구소.

^d조교수, ^e교수, 부산대학교 치과대학 교정학교실, 구강생물공학연구소.

교신저자: 손우성.

부산광역시 서구 아미동 1가 10번지.

부산대학교 치과대학 교정학교실.

051-240-7447; e-mail, wsson@pusan.ac.kr.

원고접수일: 2006년 1월 13일 / 원고최종수정일: 2006년 6월 5일 / 원

고채택일: 2006년 6월 7일.

*본 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

Table 1. Materials used in this study

Name	Type	Manufacturer
Transbond XT Adhesive	Composite Resin	3M Unitek, Monrovia, CA, USA
Transbond XT Primer	Primer	3M Unitek, Monrovia, CA, USA
Transbond Plus SEP	Self-etching Primer	3M Unitek, Monrovia, CA, USA
Adper Prompt L-Pop	Self-etching Primer	3M Unitek, Monrovia, CA, USA
Clearfil SE Bond	Self-etching Primer	Kuraray, Osaka, Japan

외과적으로 노출시켜 장치를 직접 부착할 때 자가 산부식 프라이머를 사용하면 타액 및 혈액에 의한 오염 가능성을 줄일 수 있고, 수분에도 덜 민감하여 시술 시간을 단축시킬 수 있으면서도 기존의 시스템과 유사한 접착강도를 얻을 수 있어 효과적이다.

그러나, 자가 산부식 프라이머는 산 수세의 과정이 없어 중합 후 중합물 내에 산이 내제되어 있을 가능성이 크다.^{11,12} 이는 매복치에 교정 장치를 부착하고 이를 봉합한 후에 주위 조직에 지속적으로 세포독성을 미칠 것으로 예상된다.

이에 본 연구에서는 전통적인 접착법과 자가 산부식 프라이머를 이용한 접착법에서 형성된 중합물의 세포독성을 비교, 측정하여 자가 산부식 프라이머를 임상에서 사용할 때 치주 조직에 대한 해로운 영향은 없는지 생물학적 친화성을 평가하고자 하였다.

연구방법

연구재료

교정용 브라켓을 치아에 접착하기 위해 사용되는 접착제 중에서 현재 임상에서 많이 사용하는 광중합형 레진 Transbond XT adhesive와 Transbond XT Primer, 자가 산부식 프라이머인 Transbond Plus SEP, Adper Prompt L-Pop, Clearfil SE Bond를 사용하였다 (Table 1).

세포배양

Human Gingival Fibroblast (HGF-1), HaCaT (Human Keratinocyte line), RHEK-1 (immortalized Human Epidermal Keratinocyte)을 배양하여 실험에 사용하였

다. 세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA) 배지에 10%의 fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA), 100 units/ml penicillin과 100 µg/ml streptomycin (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 세포는 일주일에 2 ~ 3회 refeeding하고 세포가 90%의 합류를 이루면 Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS, Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA)로 세척한 후 0.25% trypsin / 0.1% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 계대배양하여 실험에 사용하였다. 계대배양 시 각각의 passage number를 기록하였고 passage number가 4 ~ 7까지의 세포를 이용하였다.

실험방법

시편 준비

프라이머 자체는 중합 후 고체로 유지되지 않는 점에 고안하여, 소독된 유리판 위에 수중 프라이머를 도포하고 그 상방에 컴포지트 레진을 적용한 후 Flipo (Lokki, Label France, Vienne, France)로 3초간 광중합하여 실제 치아에 접착할 때와 동일한 시편을 제작하였다. 시편의 크기를 균일화하기 위해 내경 4 mm, 두께 1.2 mm의 형판에서 시편을 제작하였다. MTT assay를 위해 시편을 Kawata 등¹³이 이용한 방법을 변형하여 소독하였다. 먼저 시편을 증류수, 70% alcohol에 차례로 초음파 세척 후 Dulbecco's phosphate buffered saline 용액 및 세포배양액에 각 2회 세척 후 실험에 사용하였다. 컴포지트 레진만을 광중합한 시편을 사용한 세포군을 대조군으로 하고, 컴포지트 레진과 사용된 프라이머의 종류에 따라 각각 4개의 실험군으로 분류하였다 (Table 2).

Table 2. Classification of groups

Group	Composite resin	Primer
Control	Transbond XT Adhesive	none
Group 1	Transbond XT Adhesive	Transbond XT Primer
Group 2	Transbond XT Adhesive	Clearfil SE bond
Group 3	Transbond XT Adhesive	Transbond Plus Self Etching Primer
Group 4	Transbond XT Adhesive	Adper Prompt L-Pop

세포형태 관찰

시간 경과에 따른 세포 성장에 대한 시편의 영향을 알아보기 위해 대조군 및 실험군의 배양시간에 따른 세포의 형태를 광학 현미경($\times 40$, Olympus IMP2-120, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하여 시편을 사용하지 않고 배양한 세포와 비교하였다.

MTT assay

HGF-1은 5×10^3 개, HaCaT는 2×10^4 개, RHEK는 1×10^4 개가 되도록 96-well plate에 분주하고, 24시간 배양하였다. 시편을 각각 처리한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 각각 24시간, 48시간, 72시간 배양하였다. 배양 후 성장 배지에서 1 mg/ml의 MTT solution (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)을 적용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 4시간 동안 반응시킨 후 상층을 제거하고 Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Cat. D-5879, MO, USA)를 200 ml씩 첨가하여 실온에서 생성된 formazan 결정을 녹였다. Multi-well reader (Quant, Bio-Tek, Highland Park, USA)를 이용하여 492 nm에서 흡광도 (OD: optical density)를 24시간, 48시간, 72시간 별로 각각 3회 반복 측정하였고, 시편을 사용하지 않고 배양한 세포군의 흡광도를 100%로 하여 상대흡광도를 계산하였다.

통계처리

대조군과 실험군 간의 통계학적 유의성은 일원분산분석(One-way ANOVA)을 통해 시행하였고, 사후검정으로 D를 이용하였다.

연구성적

세포 형태 관찰

시편을 처리한 실험군과 대조군에서 실험 시작 72시간 후 배양 기간에 따른 세포 형태의 변화를 관찰하였다.

Human Gingival Fibroblast (HGF-1)

시편 적용 72시간 후 HGF-1의 세포 형태를 관찰한 결과, 시편 없이 세포를 배양한 경우에 세포의 형태학적 변화는 없었다. Transbond XT adhesive만 적용한 대조군에서 몇몇 세포의 세포 돌기의 위축이 관찰되었다. 수중 프라이머와 컴포지트 레진을 시편으로 사용한 4개의 실험군에서 모두 광범위하게 세포 돌기가 위축되고 괴사가 일어났으며 세포의 크기가 줄어들고 세포의 경계가 불명확하게 보였으며 세포의 형태 또한 불규칙하게 나타났다. 시간이 지나면서 극히 일부의 세포만이 정상적인 형태로 성장하였다 (Fig 1).

Human Keratinocyte Cell Line (HaCaT)

시편 적용 72시간 후 HaCaT 세포의 형태를 관찰한 결과, 시편 없이 세포를 배양한 경우에 세포가 정상적으로 성장하여 세포의 형태가 명확하고 세포돌기의 위축이 없었다. Transbond XT adhesive만 적용한 대조군에서 세포는 불규칙한 형태를 보였으나 세포의 괴사는 드물게 관찰되었다. 각종 프라이머와 컴포지트 레진을 시편으로 사용한 4개의 실험군에서 모두 세포 돌기가 위축되고 괴사가 일어났으며 세포의 크기가 줄어들고 세포의 경계가 불명확하게 보였으며 세포의 형태 또한 불규칙하게 나타났다.

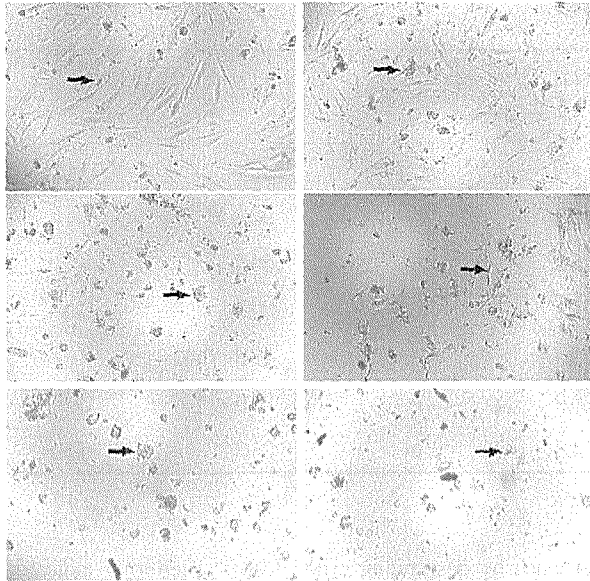


Fig 1. Morphology of HGF-1 after 72 hours ($\times 40$, Olympus IMP2-120). **A**, Baseline, arrow indicates normal cellular morphology; **B**, control group, arrow indicates similar aspects compared with the Baseline; **C**, group 1; **D**, group 2; **E**, group 3; **F**, group 4, arrows indicate severe morphological changes such as atrophy and necrosis.

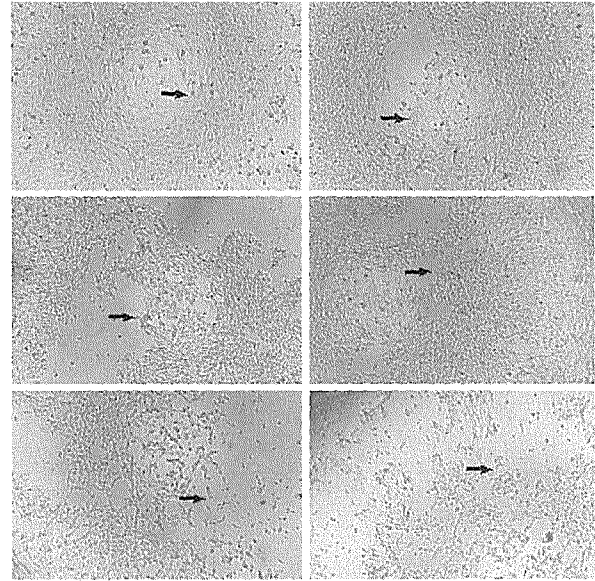


Fig 2. Morphology of HaCaT after 72 hours ($\times 40$, Olympus IMP2-120). **A**, Baseline, arrow indicates normal cellular morphology; **B**, control group, arrow indicates mild morphologic changes compared with the Baseline; **C**, group 1; **D**, group 2; **E**, group 3; **F**, group 4, arrows indicate severe morphological changes such as atrophy and necrosis.

시간이 지나면서 극히 일부의 세포만이 정상적인 형태로 성장하였다 (Fig 2).

Immortalized Human Epidermal Keratinocyte (RHEK)

시편 적용 72시간 후 RHEK 세포의 형태를 관찰한 결과, 시편 없이 세포를 배양한 경우에 세포가 정상적으로 성장하여 세포의 형태가 명확하고 세포돌기의 위축이 없었다. Transbond XT adhesive만 적용한 대조군에서 세포는 불규칙한 형태를 보이고 세포의 위축이 관찰되었다. 각종 프라이머와 컴포지트 레진을 시편으로 사용한 4개의 실험군에서 모두 세포 돌기가 위축되고 피사가 일어났으며 세포의 크기가 줄어들고 세포의 경계가 불명확하게 보였으며 세포의 형태 또한 불규칙하게 나타났다. 특히 실험군 3과 실험군 4에서는 세포의 형태가 위축되고 피사된 것을 관찰 할 수 있었다 (Fig 3).

MTT assay

Transbond XT adhesive를 중합하여 사용한 대조군과, 각각 Transbond XT Primer, Clearfil SE, Transbond

Plus SEP, Adper Prompt L-Pop을 도포한 후 Transbond XT adhesive를 적용하여 중합한 시편을 사용한 실험군의 흡광도를 측정하였다. 이를 시편을 사용하지 않고 배양한 세포군에 대한 백분율로 얻은 상대 흡광도를 계산하였다.

Human Gingival Fibroblast (HGF-1)

HGF-1을 배양하여 각 시편을 세포에 적용하고 MTT assay를 이용하여 흡광도를 측정한 후, 시편을 사용하지 않고 배양한 세포군에 대해 상대흡광도를 계산하였다 (Table 3, Fig 4).

HGF-1에 시편을 넣고 24시간 배양한 결과, 대조군과 모든 실험군에서 시편을 사용하지 않은 세포군에 비해 상대흡광도에서 낮은 값을 보였으며 유의한 차이를 보였다. 대조군과 비교하여 실험군 2는 유의한 차이가 존재하지 않아 유사한 상대흡광도를 나타냈다. 상대흡광도는 실험군 2, 실험군 3, 실험군 1, 실험군 4의 순으로 작았다.

HGF-1에 시편을 넣고 48시간 배양한 결과, 시편을 사용하지 않고 배양한 세포군과 비교해 모든 군에서

Table 3. Relative absorbance (%) of HGF-1 with MTT assay*

Group	Relative absorbance (%)					
	24 hours		48 hours		72 hours	
	Mean	D-M†	Mean	D-M†	Mean	D-M†
Baseline	100.0	a	115.3	a	96.8	a
Control	86.2	b	76.3	b	54.4	b
Group 1	56.9	d	41.1	d	30.9	d
Group 2	87.8	b	72.5	c	42.9	c
Group 3	69.7	c	35.9	e	30.0	d
Group 4	47.2	e	34.8	e	25.3	d

*Relative absorbance (%) = $\frac{OD_{492} \text{ of control} - OD_{492} \text{ of sample}}{OD_{492} \text{ of control}} \times 100$.

† Duncan's multiple range test, group differences in relative absorbance by descending order. Identical lettering indicates values that are not significantly different at $p > 0.05$.

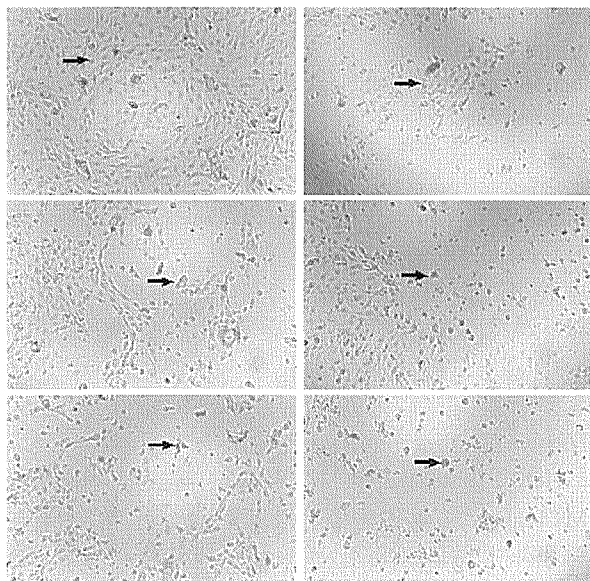


Fig 3. Morphology of RHEK after 72 hours (× 40, Olympus IMP2-120). **A**, Baseline, arrow indicates normal cellular morphology; **B**, Control group, arrow indicates mild morphologic changes compared with the Baseline; **C**, group 1; **D**, group 2; **E**, group 3; **F**, group 4, arrows indicates severe morphological changes such as atrophy and necrosis.

상대흡광도에 낮은 값을 보였으며 유의한 차이가 나

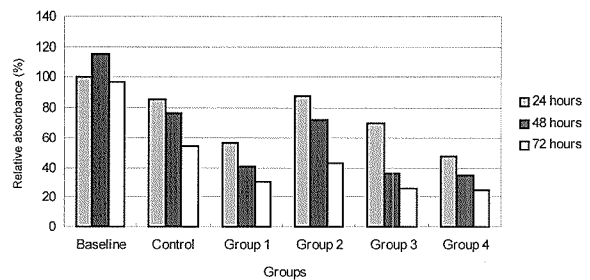


Fig 4. Relative absorbance (%) of HGF-1 exposed to the experimental materials with MTT assay.

타났다. 대조군과 비교해 실험군 2, 실험군 1, 실험군 3, 실험군 4의 순으로 상대흡광도가 작았다. 실험군 3과 실험군 4는 통계학적으로 유의한 차이가 없었다.

HGF-1에 시편을 넣고 72시간 배양한 결과, 시편을 사용하지 않고 배양한 세포군과 비교해 모든 군에서 유의하게 낮은 흡광도를 보였다. 대조군과 비교해 실험군 2, 실험군 1, 실험군 3, 실험군 4의 순으로 상대흡광도가 작았으며, 실험군 1, 실험군 3, 실험군 4는 통계학적으로 유의한 차이가 없었다.

Human Keratinocyte Cell Line (HaCaT)

HaCaT를 배양하여 각 시편을 세포에 적용하고

Table 4. Relative absorbance (%) of HaCaT with MTT assay*

Group	Relative absorbance (%)					
	24 hours		48 hours		72 hours	
	Mean	D-M [†]	Mean	D-M [†]	Mean	D-M [†]
Baseline	100.0	b	127.3	a	102.5	a
Control	111.8	a	49.3	c	41.7	b
Group 1	80.7	c	15.0	e	9.2	d
Group 2	66.1	e	55.4	b	29.1	c
Group 3	52.6	f	21.6	d	10.2	d
Group 4	71.1	d	12.9	e	10.9	d

*Relative absorbance (%) = $\frac{OD_{492} \text{ of control} - OD_{492} \text{ of sample}}{OD_{492} \text{ of control}} \times 100$.

† Duncan's multiple range test, group differences in relative absorbance by descending order. Identical lettering indicates values that are not significantly different at $p > 0.05$.

MTT assay를 이용하여 흡광도를 측정한 후, 시편을 사용하지 않고 배양한 세포군에 대해 상대흡광도를 계산하였다 (Table 4, Fig 5).

HaCaT에 시편을 넣고 24시간 배양한 결과, 대조군과 모든 실험군에서 시편을 사용하지 않고 배양한 세포군과 비교해 유의하게 낮은 상대흡광도를 보였다. 대조군의 상대흡광도가 시편을 사용하지 않고 배양한 세포군에 비해 증가하였다. 대조군에 대해 실험군 1, 실험군 4, 실험군 2, 실험군 3의 순으로 상대흡광도가 작았고, 각 군 간에 통계학적으로 유의한 차이가 존재하였다 ($p < 0.05$).

HaCaT에 시편을 넣고 48시간 배양한 결과, 시편을 사용하지 않고 배양한 세포군과 비교해 모든 군에서 유의하게 낮은 흡광도를 보였다. 시편을 넣고 24시간 배양했을 때 보다 실험군 2를 제외한 모든 군에서 흡광도가 급격히 감소했다. 실험군 2, 대조군, 실험군 3, 실험군 1, 실험군 4의 순으로 상대흡광도가 작았다. 실험군 1과 실험군 4는 통계학적으로 유의한 차이가 없었지만 나머지 군 간에 통계학적으로 유의한 차이가 있었다 ($p < 0.05$).

HaCaT에 시편을 넣고 72시간 배양한 결과, 시편을 사용하지 않고 배양한 세포군과 비교해 모든 군에서 유의하게 낮은 흡광도를 보였다. 대조군과 비교해 실험군 2, 실험군 4, 실험군 3, 실험군 1의 순으로 상대흡광도가 작았지만 실험군 1과 실험군 3, 실험군 4는 통계학적으로 유의한 차이가 없었다.

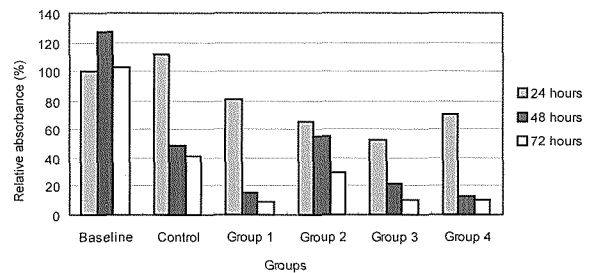


Fig 5. Relative absorbance (%) of HaCaT exposed to the experimental materials with MTT assay.

실험군 4는 통계학적으로 유의한 차이가 없었다.

Immortalized Human Epidermal Keratinocyte (RHEK)

RHEK를 배양하여 각 시편을 세포에 적용하고 MTT assay를 이용하여 흡광도를 측정한 후, 시편을 사용하지 않고 배양한 세포군에 대해 상대흡광도를 계산하였다 (Table 5, Fig 6).

RHEK에 시편을 넣고 24시간 배양한 결과, 실험군 2, 실험군 3, 대조군, 실험군 1, 실험군 4의 순으로 상대흡광도가 작았다. 대조군과 실험군 2, 실험군 3은 유의한 차이가 없었고, 시편을 사용하지 않고 배양한 세포군과 실험군 1은 통계학적으로 유의한 차이가 없었다.

Table 5. Relative absorbance (%) of RHEK with MTT assay*

Group	Relative absorbance (%)					
	24 hours		48 hours		72 hours	
	Mean	D-M†	Mean	D-M†	Mean	D-M†
Baseline	100.0	b	116.1	a	144.8	a
Control	106.5	a	51.2	b	27.0	b
Group 1	96.3	b	21.5	d	16.8	c
Group 2	110.6	a	45.8	c	21.8	c
Group 3	108.7	a	15.8	e	13.8	d
Group 4	72.8	c	15.0	e	14.3	d

*Relative absorbance (%) = $\frac{OD_{492} \text{ of control} - OD_{492} \text{ of sample}}{OD_{492} \text{ of control}} \times 100$.

† Duncan's multiple range test, group differences in relative absorbance by descending order. Identical lettering indicates values that are not significantly different at $p > 0.05$.

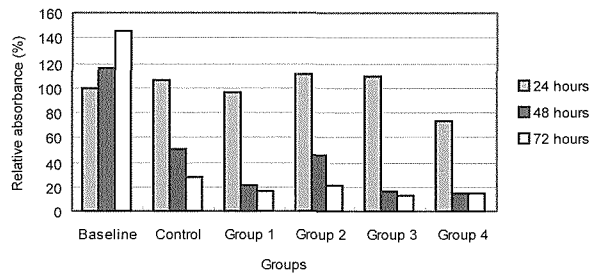


Fig 6. Relative absorbance (%) of RHEK exposed to the experimental materials with MTT assay.

가 없었다.

RHEK에 시편을 넣고 48시간 배양한 결과, 모든 군에서 24시간 배양 시에 비해 흡광도가 크게 감소하였다. 대조군과 비교해 실험군 2, 실험군 1, 실험군 3, 실험군 4의 순으로 상대흡광도가 작았다. 실험군 3과 실험군 4는 통계학적으로 유의한 차이가 없었다.

RHEK에 시편을 넣고 72시간 배양한 결과, 시편을 사용하지 않고 배양한 세포군과 비교해 모든 군에서 유의한 상대흡광도 차이가 있었다. 대조군과 비교해 실험군 2, 실험군 1, 실험군 4, 실험군 3의 순으로 상대흡광도가 작았다. 실험군1과 실험군2, 실험군3과

실험군4는 각각 통계학적으로 유의한 차이가 없었다.

RHEK는 HGF-1, HaCaT에 비해서 24시간 이후에 상대흡광도가 크게 감소한 것으로 나타났다.

고찰

치과 재료의 독성이나 과민반응을 평가하는 방법은 제1단계 초기검사, 제2단계 동물실험 및 제3단계 임상 전단계 검사로 구성된다. 이 중 세포독성 실험은 초기검사에 속하는 것으로 실험 방법이 비교적 간단하고 재현성이 높으며, 정확한 결과를 얻을 수 있고, 또한 표준화에 의해 다량의 시편을 평가할 수 있는 경제적인 실험방법이다.^{14,15} 이러한 세포독성 실험은 세포 수를 산정하여 세포의 성장을 측정하는 방법, 세포의 형태 변화를 관찰하는 방법,¹⁶ 방사선동위원소를 이용하는 방법,^{17,18} 발색반응을 이용하여 흡광도를 측정하여 생존도를 측정하는 방법,¹⁹ 효소기능 측정법,^{20,21} 세포내 대사량 측정법²² 등 여러 가지가 있다.

MTT assay^{14,23}는 효소활성 시험 중 하나로 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)를 이용한다. 생존 세포의 미토콘드리아의 탈수소효소(dehydrogenase)가 노란색의 MTT를

물에 녹지 않는 푸른색의 MTT-formazan 결정으로 전환시키는 능력을 측정하며 이 때 생성된 formazan 결정의 광학적 밀도를 측정함으로써 세포 독성을 평가할 수 있다. 만약 세포독성에 의하여 탈수소효소의 활성이 저하되면 formazan이 형성되지 않는다. 광학적 밀도는 광원으로부터 나오는 빛을 단색화 장치 또는 필터에 의하여 좁은 파장범위의 빛만을 선택하여 액층을 통과시킨 다음 광전측광으로 흡광도를 측정하여 목적성분의 농도를 정량한다. 상대흡광도는 기준이 되는 세포군에 대한 실험군의 상대적인 흡광도를 백분율로 비교한 것으로, 이 실험에서는 시편을 사용하지 않은 세포군에 대한 대조군 및 각 실험군의 상대적인 흡광도를 상대흡광도로 표현하여 세포독성을 비교하였다.

세포 독성을 평가하는 방법은 세 가지 단계로 이루어진다. 먼저, 세포를 배양하고, 세포와 실험을 할 시편을 접촉시킨 뒤, 시험 결과와 측정계수를 기록하는 순서로 실험이 이루어진다²⁴. 세포 독성을 평가하기 위해서는 원래의 세포와 배양된 세포를 이용한다. 두 가지 모두 고체상태의 치과재료에 실험에 민감하게 반응한다는 보고가 있다.²⁵ 이 실험에서 사용한 HGF-1, HaCaT, RHEK의 세포를 배양한 것은 인간의 세포를 기초로 하여 실제 임상에서와 유사한 결과를 얻기 위해서였다.

HGF-1에 각 시편을 넣고 MTT assay로 실험하여 상대흡광도를 Duncan's multiple range test로 분석한 결과 Transbond XT adhesive를 시편으로 사용한 대조군이 시편을 사용하지 않고 배양한 세포군과 비교해 유의한 차이가 있어 세포독성이 있었으며, Transbond XT adhesive에 Transbond XT Primer, Transbond Plus SEP, Adper Prompt L-Pop, Clearfil SE Bond를 혼합하여 사용한 경우에도 유의한 세포독성이 있었다. 세포독성은 Transbond XT Adhesive에 Clearfil SE bond, Transbond Plus SEP, Transbond XT Primer, Adper Prompt L-Pop을 혼합하여 사용한 순으로 세포독성이 컸다. Adper Prompt L-Pop을 Transbond XT adhesive와 같이 사용한 경우 가장 낮은 흡광도를 보여 24시간 경과 후 가장 높은 세포독성을 나타내었다. Transbond XT adhesive와 Clearfil SE bond를 혼합하여 사용한 경우, Transbond XT adhesive만을 시편으로 사용한 대조군과 유의한 차이가 없었고, 실험에 사용된 모든 프라이머 가운데 가장 세포독성이 낮은 것으로 나타났다. HGF-1에 시편을 넣고 48시간을 배양한 결과, Clearfil SE bond를

혼합한 군에서 세포독성이 가장 작았다. Transbond XT adhesive와 각각 Transbond Plus SEP, Adper Prompt L-Pop을 혼합한 실험군에서 통계학적으로 유의한 차이가 나타나지 않았고 상대흡광도가 가장 낮아 세포독성이 가장 큰 것으로 나타났다. HGF-1에 시편을 넣고 72시간 배양한 결과, 시편을 사용하지 않은 세포군과 비교해 모든 군에서 유의한 흡광도 차이가 있어 세포독성이 있는 것으로 나타났다. Clearfil SE Bond를 사용한 실험군 2는 세포독성이 가장 작았다. 실험군 1, 실험군 3, 실험군 4는 유의한 차이가 없어 유사한 세포독성을 나타냈다.

HaCaT에 각 시편을 넣고 MTT assay로 실험하여 상대흡광도를 Duncan's multiple range test로 분석한 결과, Transbond XT adhesive와 각각 Transbond XT Primer, Transbond Plus SEP, Adper Prompt L-Pop, Clearfil SE bond를 혼합하여 사용한 경우에 유의한 세포독성이 있었다. 세포독성은 Transbond XT adhesive에 Transbond XT Primer, Adper Prompt L-Pop, Clearfil SE bond, Transbond Plus SEP를 혼합하여 사용한 순으로 세포독성이 컸다. 시편을 사용하지 않은 세포군과 비교하여 Transbond Plus SEP를 Transbond XT adhesive와 같이 사용한 경우 가장 낮은 흡광도를 보여 24시간 경과 후 가장 높은 세포독성을 나타내었다. HaCaT에 시편을 넣고 48시간 배양한 결과, 실험군 2를 제외한 모든 군에서 세포독성이 급격히 증가했다. Transbond XT adhesive와 Clearfil SE Bond를 사용한 실험군 2에서 세포독성이 가장 작게 나타났다. Transbond XT adhesive와 각각 Transbond XT Primer, Adper Prompt L-Pop을 사용한 실험군은 통계학적으로 유의한 차이가 없고 가장 세포독성이 큰 것으로 나타났다. HaCaT에 시편을 넣고 72시간 배양한 결과, 시편을 사용하지 않은 세포군과 비교해 모든 군에서 유의한 흡광도 차이가 있어 세포독성이 있는 것으로 나타났다. Transbond XT adhesive와 Clearfil SE Bond를 중합한 시편을 사용한 실험군 2에서 상대흡광도가 상대적으로 높아 가장 낮은 세포독성을 보였다. 실험군 1, 실험군 3, 실험군 4는 통계학적으로 유의한 차이가 없어 가장 세포독성이 큰 것으로 나타났다.

RHEK에 각 시편을 넣고 MTT assay로 실험하여 상대흡광도를 Duncan's multiple range test로 분석한 결과 24시간 후 Transbond XT adhesive와 Adper Prompt L-Pop을 혼합한 군에서 세포독성이 가장 높았다. RHEK에 시편을 넣고 48시간 배양한 결과, 시

편을 사용하지 않은 세포군을 제외한 모든 군에서 24시간 배양 시에 비해 흡광도가 크게 감소하였다. Transbond XT adhesive와 Transbond Plus SEP, Adper Prompt L-Pop을 각각 혼합한 군에서 통계학적으로 유의한 차이가 없어, 다른 군에 비해 세포독성이 컸다. RHEK에 시편을 넣고 72시간 배양한 결과, 시편을 사용하지 않은 세포군과 비교해 모든 군이 유의한 흡광도 차이가 있어 세포독성이 있는 것으로 나타났다. Transbond XT Primer와 Clearfil SE bond, Transbond Plus SEP, Adper Prompt L-Pop이 각각 세포독성이 유사하였다. RHEK는 HGF-1, HaCaT에 비해서 24시간 이후에 세포에 미치는 독성이 크게 증가한 것으로 나타났다.

이번 실험에서는 실제 임상에서 브라켓을 접착하는 것과 유사하게 시편을 제작하기 위하여 수종의 프라이머를 도포하고 그 상층에 컴포지트 레진을 접착제로 사용하여 광중합하였다. 이미 수종의 접착제의 세포독성이 보고된 바 있으나,²⁴⁻²⁷ 자가 산부식 프라이머의 세포독성을 평가한 연구는 없었으며 수종의 프라이머와 접착제를 함께 중합할 때 세포독성을 측정할 실험은 없었다. 이에 이 실험에서는 전통적인 접착제와 자가 산부식 접착제의 생체 친화성을 평가하기 위해 시편을 넣지 않은 세포군에 대한 세포독성을 비교하였다. 대조군은 실험군에서 프라이머와 함께 중합된 컴포지트 레진만을 시편으로 하였고, 실험군 1에서는 전통적인 방법으로 치면을 산부식하고 산 수세하여 프라이밍하는 방법을 재현하기 위해 Transbond XT Primer를 Transbond XT adhesive와 중합하여 사용하였다. 임상에서 전통적인 접착시 사용되는 37% 인산은 법랑질을 부식한 후 수세 과정에서 수세되기 때문에 본 실험에서는 실험군 1에서 산부식 및 산 수세의 과정은 생략하고 프라이머만을 적용하였다. 나머지 실험군 2, 실험군 3, 실험군 4에서는 최근 사용이 늘고 있는 세 가지 자가 산부식 프라이머 Clearfil SE Bond, Transbond Plus SEP, Adper prompt L-Pop을 사용하였다. Clearfil SE bond는 최근에 개발된 자가 산부식 프라이머로 여러 실험에서 매우 우수한 효과를 인정받고 있다. 그 예로 인산을 이용한 접착제와 Clearfil SE bond의 법랑질에 대한 인장강도를 평가한 결과 Clearfil SE bond는 인산을 이용한 접착제처럼 법랑질에 대해 효과적이다. Clearfil SE bond는 two-bottle system으로 프라이머의 pH는 1.9이고 접착제의 pH는 2.8이며 법랑질에 대한 결합강도는 24.0 MPa이며 상아질에 대한 결합

강도는 21.3 MPa로 보고되고 있다. 이러한 수치는 인산을 이용한 접착시스템의 결과와 유사한 매우 높은 강도이다.⁹ Prompt L-Pop은 물을 기본(water-based)으로 하는 접착제로서 접착기전은 phosphoric ester가 법랑질 면을 용해하고 접착제의 팽창합 시 레진 기질내로 단량체의 공중합이 일어나 치면에 접착한다. Transbond Plus SEP의 성분은 인산과 methacrylate group이 치면을 부식과 동시에 프라이밍하는 분자로 합쳐질 때 형성되는 methacrylated phosphoric acid ester로 구성되어 있다. 전통적인 인산에 의한 산부식은 법랑질에서 칼슘을 선택적으로 용해하고 수세 시에 칼슘을 씻어내는 방식이다. 이와 유사하게 Transbond Plus SEP의 methacrylated phosphoric acid ester의 성분인 phosphate group이 hydroxyapatite로부터 칼슘을 용해시키고 이를 제거한다. 그 후 칼슘을 수세 하는 대신에, phosphate group과 복합체를 형성하고 프라이머가 공중합 될 때 네트워크를 형성한다. 산은 칼슘과 반응에 의해서 중성화된다.³

실험 결과에서 세포만을 배양한 세포군과 비교할 때 Transbond XT adhesive, Transbond XT adhesive와 각각 Transbond XT Primer, Clearfil SE Bond, Transbond Plus SEP, Adper Prompt L-Pop을 적용한 군에서 모두 세포독성이 유의하게 나타났다. Clearfil SE Bond를 사용한 시편이 HGF-1, HaCaT, RHEK에서 세포독성이 비교적 낮게 나타났다. HGF-1을 배양하여 사용한 실험에서 시편을 사용하지 않은 세포군을 제외한 모든 군에서 시간이 지남에 따라 상대흡광도가 낮아졌다. Baseline에서 48시간 배양 후 상대흡광도가 증가한 이유는 배지에서 세포의 증식이 이루어졌기 때문이다. 이는 정도는 다르지만 HaCaT, RHEK를 배양한 실험에서도 나타나는데, 상대흡광도의 증가 비율에 차이가 나는 이유는 세포의 크기와 분열 속도의 차이에 기인한 것이다.

본 실험 결과를 평가해 볼 때 자가 산부식 프라이머의 세포독성은 전통적인 접착법에 사용되는 프라이머의 세포독성과 유의한 차이가 없었으며, 따라서 본 실험은 중합 시 중합물 내에 포함된 산의 성분이 중합과 동시에 phosphate group과 복합체를 형성하고 프라이머가 공중합 될 때 네트워크를 형성하여 산은 칼슘과 반응하여 중성화된다는³ 이론을 뒷받침한다.

세포독성의 명확한 평가를 위해서는 프라이머와 자가 산부식 프라이머의 독성에 주도적인 역할을 하는 구체적인 성분에 대한 평가가 필요하다고 판단된다. 생체 친화성에 대한 결과가 실험 방법마다 다양

하게 나타나므로 실험 방법의 표준화가 필요하며, 본 연구는 임상 실험으로 검증되지는 않은 초기 검사에 속하는 실험으로 앞으로 동물 실험 및 임상 실험을 통해서 세포독성에 대한 보다 정확한 평가가 필요할 것이다.

결론

본 연구에서는 현재 임상에서 사용되는 전통적인 접착법에 사용되는 Transbond XT Primer와 자가 산부식 프라이머인 Clearfil SE Bond, Transbond Plus SEP, Adper Prompt L-Pop의 생체 친화성을 알아보기 위해 각각의 Primer와 Transbond XT Adhesive를 중합하여 세포에 노출시켰을 때의 세포 형태관찰, MTT assay를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 세포 형태 관찰 시 HGF-1, HaCaT, RHEK를 이용한 실험에서 모든 프라이머에서 세포 돌기의 위축, 세포 형태의 변화, 세포 수의 감소, 세포의 괴사가 관찰되었다.
2. HGF-1을 이용한 MTT assay 결과, 24시간 경과 후 Adper Prompt L-Pop, Transbond XT Primer, Transbond Plus SEP, Clearfil SE Bond의 순으로 세포독성이 낮았다. 48시간 경과 후 Adper Prompt L-Pop, Transbond Plus SEP, Transbond XT Primer, Clearfil SE Bond의 순으로 세포독성이 낮았다. 72시간 경과 후 Adper Prompt L-Pop, Transbond Plus SEP, Transbond XT Primer, Clearfil SE Bond의 순으로 세포독성이 낮았다.
3. HaCaT를 이용한 MTT assay 결과, 24시간 경과 후 Transbond Plus SEP, Clearfil SE Bond, Adper Prompt L-Pop, Transbond XT Primer의 순으로 세포독성이 낮았다. 48시간 경과 후 Adper Prompt L-Pop, Transbond Plus SEP, Transbond XT Primer, Clearfil SE Bond의 순으로 세포독성이 낮았다. 72시간 경과 후 Transbond XT Primer, Transbond Plus SEP, Adper Prompt L-Pop, Clearfil SE Bond의 순으로 세포독성이 낮았다.
4. RHEK를 이용한 MTT assay 결과, 24시간 경과 후 Adper Prompt L-Pop, Transbond XT Primer, Transbond Plus SEP, Clearfil SE Bond의 순으로 세포독성이 낮았다. 48시간 경과 후 Adper Prompt L-Pop, Transbond Plus SEP, Transbond XT Primer, Clearfil SE Bond의 순으로 세포독성이 낮았다. 72

시간 경과 후 Transbond Plus SEP, Adper Prompt L-Pop, Transbond XT Primer, Clearfil SE Bond의 순으로 세포독성이 낮았다.

참고문헌

1. Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Res* 1955;34:849-53.
2. Cacciafesta V, Sfondrini MF, Scribante A, De Angelis M, Klersy C. Effect of blood contamination on shear bond strength of brackets bonded with a self-etching primer combined with a resin-modified glass ionomer. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2004;126:703-8.
3. Zeppieri IL, Chung CH, Mante FK. Effect of saliva on shear bond strength of an orthodontic adhesive used with moisture-insensitive and self-etching primers. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2003;124:414-9.
4. Arnold RW, Combe EC, Warford JH Jr. Bonding of stainless steel brackets to enamel with a new self-etching primer. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2002;122:274-6.
5. Trites B, Foley TF, Banting D. Bond strength comparison of 2 self-etching primers over a 3-month storage period. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2004;126:709-16.
6. Bishara SE, VonWald L, Laffoon JF, Warren JJ. Effect of a self-etch primer/adhesive on the shear bond strength of orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2001;119:621-4.
7. Grubisa HS, Heo G, Raboud D, Glover KE, Major PW. An evaluation and comparison of orthodontic bracket bond strengths achieved with self-etching primer. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2004;126:213-9.
8. Hannig M, Reinhardt KJ, Bott B. Self-etching primer vs phosphoric acid: an alternative concept for composite-to-enamel bonding. *Oper Dent* 1999;24:172-80.
9. Fritz UB, Diedrich P, Finger WJ. Self-etching primers-an alternative to the conventional acid etch technique? *J Orofac Orthop* 2001;62:238-45.
10. Yoshiyama M, Matsuo T, Ebisu S, Pashley D. Regional bond strengths of self-etching/self-priming adhesive systems. *J Dent* 1998;26:609-16.
11. Imazato S, Tarumi H, Ebi N, Ebisu S. Cytotoxic effects of composite restorations employing self-etching primers or experimental antibacterial primers. *J Dent* 2000;28:61-7.
12. Moszner N, Salz U, Zimmermann J. Chemical aspects of self-etching enamel-dentin adhesives: a systematic review. *Dent Mater* 2005;21:895-910.
13. Kawata Y, Shiota M, Tsutsui H, Yoshida Y, Sasaki H, Kinouchi Y. Cytotoxicity of Pd-Co dental casting ferromagnetic alloys. *J Dent Res* 1981;60:1403-9.
14. Spangberg L. Kinetic and quantitative evaluation of material cytotoxicity in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1973;35:389-401.
15. Browne RM, Tyas MJ. Biological testing of dental restorative materials in vitro-a review. *J Oral Rehabil* 1979;6:365-74.

16. Kawahara H, Imanishi Y, Oshima H. Biological evaluation on glass ionomer cement. *J Dent Res* 1979;58:1080-6.
17. Bean TA, Zhuang WC, Tong PY, Eick JD, Chappelow CC, Yourtee DM. Comparison of tetrazolium colorimetric and ⁵¹Cr release assays for cytotoxicity determination of dental biomaterials. *Dent Mater* 1995;11:327-31.
18. Yoshii E. Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res* 1997;37:517-24.
19. Cook JA, Mitchell JB. Viability measurements in mammalian cell systems. *Anal Biochem* 1989;179:1-7.
20. Tyas MJ. A method for the in vitro toxicity testing of dental restorative materials. *J Dent Res* 1977;56:1285-90.
21. Craig RG, Hanks CT. Reaction of fibroblasts to various dental casting alloys. *J Oral Pathol* 1988;17:341-7.
22. Helgeland K, Leirskar J. A further testing of the effect of dental materials on growth and adhesion of animal cells in vitro. *Scand J Dent Res* 1972;80:206-12.
23. Ko YM, Kim KN, Kim KM. *Dental materials*. Seoul: Koonja Pub; 2001. p. 67-70.
24. Tang AT, Liu Y, Bjarkman L, Ekstrand J. In vitro cytotoxicity of orthodontic bonding resins on human oral fibroblasts. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1999;116:132-8.
25. Lee WC, Park SB. In vitro cytotoxicity of four kinds orthodontic band cements. *Korea J orthod* 2004;34:351-62.
26. Szep S, Kunkel A, Ronge K, Heidemann D. Cytotoxicity of modern dentin adhesives-in vitro testing on gingival fibroblasts. *J Biomed Mater Res* 2002;63:53-60.
27. Tell RT, Sydskis RJ, Isaacs RD, Davidson WM. Long-term cytotoxicity of orthodontic direct-bonding adhesives. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1988;93:419-22.

In vitro cytotoxicity of self-etching primers

Chang-Hoon Rhee, DDS, MSD,^a In-Ryeon Kim, MS,^b Gyoo-Cheon Kim, MS, PhD,^c
Seong-Sik Kim, DDS, MSD, PhD,^d Woo-Sung Son, DDS, MSD, PhD^e

Objective: Several ions and components are released from self-etching primers in the oral cavity. This may cause injury to the periodontal tissues throughout orthodontic treatment. The purpose of this study was to assess the cytotoxicity of self-etching primers to HGF-1, HaCaT, and RHEK cells. **Method:** Transbond XT Primer (3M Unitek, Monrovia, CA, USA), and self-etching primers, Clearfil SE Bond (Kuraray, Osaka, Japan), Transbond Plus SEP (3M Unitek, Monrovia, CA, USA), and Adper Prompt L-Pop (3M Unitek, Monrovia, CA, USA), were evaluated by MTT assay, and cellular changes were also observed. **Results:** In all cells after 72 hours with all primers, severe morphological changes such as atrophy and necrosis were observed. In the MTT assay using HGF-1, Clearfil SE Bond, Transbond XT Primer, Transbond Plus SEP, and Adper Prompt L-Pop were lined up in order of ascending cytotoxicity. When using HaCaT, Clearfil SE Bond, Adper Prompt L-Pop, Transbond Plus SEP, and Transbond XT Primer were lined up in order of ascending cytotoxicity. When using RHEK, Clearfil SE Bond, Transbond XT Primer, Adper Prompt L-Pop, and Transbond Plus SEP were lined up in order of ascending cytotoxicity. **Conclusion:** The result of this study shows that care is needed because self-etching primers show cytotoxic properties similar to conventional primers. (*Korean J Orthod* 2006;36(6):422-33)

Key words: Cytotoxicity, Self-etching primer

^aResident, Department of Orthodontics, School of Dentistry, Pusan National University.

^bAssistant, ^cAssistant Professor, Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Research Institute for Oral Biotechnology, Pusan National University.

^dAssistant Professor, ^eProfessor, Department of Orthodontics, School of Dentistry, Research Institute for Oral Biotechnology, Pusan National University.

Corresponding author: Woo-Sung Son.

Department of Orthodontics, Pusan National University Hospital, 1-10 Ami-Dong, Seo-Gu, Busan 164-052, Korea.
+82 51 240 7447; e-mail, wsson@pusan.ac.kr.

Received January 13, 2006; Last Revision June 5, 2006; Accepted June 7, 2006.