

압력 저속 냉동 방법의 쥐 치아 치주인대세포 보존 효율 평가

이영은¹ · 김의성¹ · 김진² · 한승훈³ · 이승종^{1*}

¹연세대학교 치과대학 보존학 교실, ²연세대학교 구강병리학 교실 및 구강중앙 연구소, ³강북삼성병원 보존과

ABSTRACT

THE EFFICACY OF PROGRAMMED CRYO-PRESERVATION UNDER PRESSURE IN RAT PERIODONTAL LIGAMENT CELLS

Young-Eun Lee¹, Eui-Seong Kim¹, Jin Kim², Seung-Hoon Han³, Seung-Jong Lee^{1*}

¹Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Yonsei University

²Department of Oral Pathology, Oral Cancer Research Center, Yonsei University

³Department of Conservative Dentistry, Kangbuk Samsung Hospital

The purpose of this study was to evaluate the viability of periodontal ligament cells in rat teeth using slow cryo-preservation method under pressure by means of MTT assay and WST-1 assay. Eighteen teeth of Sprague-Dawley white female rats of 4 week-old were used for each group.

Both sides of the first and second maxillary molars were extracted as atraumatically as possible under Tiletamine anesthesia. The experimental groups were group 1 (Immediate control), group 2 (Cold preservation at 4°C for 1 week), group 3 (Slow freezing), group 4 (Slow freezing under pressure of 3 MPa). F-medium and 10% DMSO were used as preservation medium and cryo-protectant. For cryo-preservation groups, thawing was performed in 37°C water bath, then MTT assay and WST-1 assay were processed. One way ANOVA and Tukey method were performed at the 95% level of confidence. The values of optical density obtained by MTT assay and WST-1 were divided by the values of eosin staining for tissue volume standardization.

In both MTT and WST-1 assay, group 4 showed significantly higher viability of periodontal ligament cells than group 2 and 3 ($p < 0.05$), but showed lower viability than immediate control group.

By the results of this study, slow cryo-preservation method under pressure suggests the possibility for long term cryo-preservation of the teeth.¹⁾ [J Kor Acad Cons Dent 34(4):356-363, 2009]

Key words: periodontal ligament cell, MTT, WST-1, viability, pressure, cryo-preservation

-Received 2009.4.23., revised 2009.6.16., accepted 2009.6.22-

I. 서 론

치아의 재식이나 이식은 환자의 나이, 치근 발육 정도, 치아의 형태, 수용부 와동의 감염여부, 수술 중 외상, 고정외 형태 등에 의해 예후에 영향을 받게 되며 이중 재식/이식치

의 치근면에 있는 건전하고 생활력 있는 치주인대세포의 존재가 치아 이식 성공률을 결정짓는 가장 중요한 요소로¹⁻⁶⁾ 재식되어 왔으며 재식/이식치아의 치주인대세포의 활성도를 유지하기 위해 많은 시도가 있어 왔다⁷⁻¹¹⁾.

일반적으로 세포의 활성도를 장기간 유지하는 방법으로 저온보존법과 냉동보존법이 있다. 저온보존법은 얼음이 어는 온도 전까지 온도를 낮춰 세포 대사를 감소시켜 보관하는 방법으로 심장, 간, 췌장, 신장 등 전체 기관의 단기간 보존에 사용된다¹²⁾. 냉동보존법은 세포를 장기간 보관할 때 많이 사용되고 냉동과 해동 과정에서 얼음 결정과 증가된 용질의 축적으로 인한 삼투압의 증가로 인한 세포 손상이 올

*Corresponding Author: **Seung-Jong Lee**
Department of Conservative Dentistry,
College of Dentistry, Yonsei University,
250 Seongsan-ro Seodaemin-Ku, Seoul, 120-752, Korea
Tel: 82-2-2228-3148 Fax: 82-2-313-7575
E-mail sjlee@yuhs.ac

*본 연구는 연세대학교 치과대학 2008년도 교수연구비에 의하여 이루어졌음(6-2008-0221).

수 있다¹²⁾. 이러한 세포 손상을 줄이기 위해 많은 방법들을 시험해 왔으며 대표적으로 동해방지제의 사용과 다양한 냉동 방법의 개발을 들 수 있다.

최근 일본에서는 미소자장을 이용한 프로그램 냉동고 (Cell Alive System)를 이용하여 세포 핵내, 세포내, 세포 외 물분자를 자기장에 의해 진동시켜 결정화를 억제해 과냉각 상태를 유지하다가 세포, 냉동 보존액 전체를 동시에 냉동하게 하는 시도가 있었다^{7,8)}. 이 특수한 자장 냉동고를 사용하여 Kawata⁷⁾는 쥐 치아를 15mA 자기장으로 -0.5℃/min 속도로 -30℃까지 3일간 냉동 보관했을 때 급속 냉동을 하는 것보다 좋은 결과를 얻었다고 보고하였으며 Kaku 등⁸⁾은 사람의 치주인대세포를 75mA 자기장으로 -0.5℃/min 속도로 -30℃까지 3일간 냉동 보관했을 때 세포활성도가 제일 높았다고 보고하였다. Ahn 등⁹⁾도 쥐 치아를 -0.3℃/min 속도로 -20℃까지 21.7mA, 60Hz, 1G의 자기장을 이용하여 프로그램 냉동을 시도하였으나 급속, 저속 냉동한 군 사이에 유의한 차이는 없다고 보고하였다.

냉동 보존을 위한 다른 접근법으로 고압 하에서 냉동시킴으로서 세포의 손상을 줄이고자 하는 방법을 생각할 수 있는데 210MPa 고압 하에서는 물의 상변이 온도가 0℃에서 -21℃로 내려가므로 낮은 온도에서도 얼지 않은 상태로 보관할 수 있어¹³⁾ 식품공학 분야에서 이를 이용한 연구가 진행되어 왔다. 대기압 상태에서 냉동했을 때는 크기가 크고 불규칙한 다양한 직경의 결정들이 형성되는데 비해 고압 냉동학(Pressure Shift Freezing, Pressure Assist Freezing)에서는 압력을 주었을 때는 0℃ 아래에서 과냉각 상태로 존재하다가 압력이 해소되면서 조직에 최소한의 손상을 주면서 결정이 작고 균일하게 형성^{13,14)} 되어 식품의 맛과 질을 향상시킬 수 있다고 하였다. Zhu 등¹⁴⁾도 젤라틴 젤과 같은 식품을 고압을 이용하여 냉동하면 세포의 손상을 줄여 식품의 맛과 질이 향상된다고 보고하였다.

그러나, 이런 고압 장치는 보통 장치와 비교하여 크기가 크고 무거우며 제작비가 다른 실험용 기기에 비해 고가라는 단점이 있다. 이에 본 연구에서는 3MPa의 압력을 주면서 냉동시킬 수 있는 기기를 제작하여 실험에 사용하기로 하였다.

이에 본 연구의 목적은 흰 쥐의 상악 대구치를 발거한 후 치주인대세포를 압력을 이용한 저속 냉동 보관법으로 냉동 보관시 치주인대세포의 활성도를 저속 냉동법, 냉장 보관법과 비교하여 평가하는 것이다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험 대상 및 전 처치

생후 4주된 암컷 Sprague-Dawley계 흰쥐 20마리를 사용하였고 발치를 용이하게 하기 위해 0.4% β-aminopro-

prionitrile(β-APN, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 발치 전 3일간 공급하였다. 마취는 Tiletamine(Zoletil50, Virbac, Carros, France) 1cc를 이용하여 피하 주사하였다. 마취가 유도된 후 날카로운 탐침으로 peritomy를 시행한 후 조직 검사를 이용하여 치관을 잡고 최소한의 외상을 가하면서 접근이 가장 용이한 좌우측 상악 제 1, 2 대구치를 발거하였다. 이때 발치와 주변의 출혈은 면봉으로 조절하고 발치 후에는 치근의 파절 여부를 현미경을 사용하여 확인하였다.

2. 실험 방법

실험에 사용한 보관 용액인 F medium은 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, Gibco-BRL, NY, USA)과 Ham's nutrient mixtures F12(Gibco-BRL, NY, USA)를 3:1의 비로 섞고 10% fetal bovine serum(FBS)와 항생제 penicillin (100units/μl), streptomycin(100μl/ml), fungizone(0.3μg/ml)을 첨가하여 제조하였다. 동해방지제로는 10% DMSO (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였다.

가. 실험군 분류

· 1군: 즉시 발치군

치아를 발거하자마자 PBS에 세척한 후 실험에 이용하였다.

· 2군: 냉장군

치아를 발거하고 PBS 세척한 후 2ml 냉동튜브에 F medium 1ml와 함께 담아 4℃ 냉장고에 일주일간 보관하였다.

· 3군: 저속 냉동군

발거된 치아를 2.5%, 5%, 7.5% DMSO에 5분씩 단계적으로 담근 뒤 F medium과 10% DMSO 혼합용액 1ml가 담긴 2ml 냉동튜브에 넣고 5분 후 속도조절 냉동기에 넣어 4℃ 냉장온도에서 -35℃까지 -0.5℃/min로 서서히 냉동시킨 뒤 -196℃ 액화질소 냉동고에 넣어 일주일간 보관하였다.

· 4군: 압력 저속 냉동군

발거된 치아를 2.5%, 5%, 7.5% DMSO에 5분씩 단계적으로 담근 뒤 F medium과 10% DMSO 혼합용액 2ml를 2ml 냉동튜브에 넣고 5분 기다리는 동안 압력통 (Geumsung Science, Seoul, Korea) 안에 냉동튜브를 4개 넣고 스페너로 잠근 뒤 속도조절 냉동기(Low Temp Freezer Drying Chamber KS5045, Geumsung Science, Seoul, Korea)에 넣고 압력통에 압력을 3MPa(30기압)로 가하고 4℃에서 -35℃까지 -0.5℃/min로 서서히 냉동시킨 뒤 -196℃ 액화질소 냉동고에 넣어 일주일간 보관하였다.

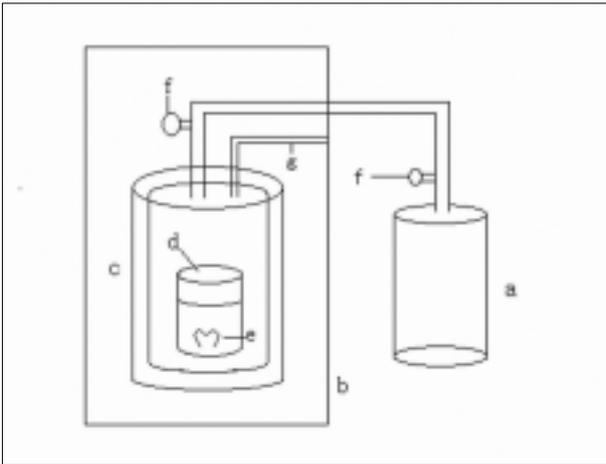


Figure 1. Schematic diagram of program freezer with pressure vessel.

- a. Oxygen container : 3MPa of pressure
- b. Program freezer
- c. Pressure bottle
- d. 2ml Cryotube: 1ml F medium + 10% DMSO
- e. Tooth treated 10% DMSO
- f. Pressure valve
- g. Thermometer

나. 냉동군의 해빙 방법

저속 냉동군의 냉동한 치아를 냉동튜브 채로 액화질소 냉동고에서 꺼내어 37℃ 수욕조에 넣어 해빙하였다. 압력 냉동군은 압력통을 액화질소 냉동고에서 꺼내어 압력을 해소하고 안에 든 냉동튜브를 꺼내 37℃ 수욕조에 넣어 해빙하였다. 해빙 후 치아를 7.5%, 5%, 2.5%, 0% DMSO가 첨가된 용액에 5분씩 담귀 DMSO를 제거한 후 MTT 검색, WST-1 검색에 사용하였다.

2-1. MTT 검색 (3,4[4,5-dimethylthiazol-2-y]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

각 실험군의 처리가 끝난 뒤에 96-well plate에 MTT 용액(0.05mg/ml, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 200μl를 넣고 각 군별 치아를 MTT 용액이 있는 well에 담았다. 알루미늄 호일로 96-well plate를 싸서 3시간 동안 37℃ 회전진탕기에 배양하였다. 3시간 후 DMSO 150μl를 넣은 well에 치아를 옮기고 15분간 회전진탕하여 형성된 MTT formazan 결정을 녹여 내었다. 15분 후 치아를 제거하고 Dynatech MRX ELISA microplate reader (Dynatech laboratories, Chantilly, VA, USA)에 넣고 570nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

2-2. WST-1 검색 (4-(3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzene disulfonate)

각 실험군의 처리가 끝난 뒤에 96-well plate에 WST-1 용액(20μl, Cell Proliferation Reagent WST-1; Roche Applied Science, Mannheim, Germany) 200μl를 넣고 각 군별 치아를 WST-1 용액이 있는 well에 담았다. 알루미늄 호일로 96-well plate를 싸서 4시간 동안 37℃ 회전진탕기에 배양하였다. 치아를 제거하고 Dynatech MRX ELISA microplate reader (Dynatech laboratories, Chantilly, VA, USA)에 넣고 450nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

3. 치아 치근면에 붙어있는 치주조직의 양 측정

실험에 사용된 치아의 치근면에 붙어있는 치주조직의 양을 정량적으로 측정하기 위해 MTT 검색과 WST-1 검색 실험이 끝난 치아를 각 군별로 Eosin(Accustain, sigma-aldrich chemie, Gmbh, Germany) 350μl이 담긴 96-well plate에 넣어 염색을 하였다. 12시간 후 치아를 꺼내 1% acid alcohol (70% ethyl alcohol, 1% HCL) 350μl이 담긴 다른 well에 넣어 30분간 담가두어서 치근면에 염색된 치주조직을 탈색시켰다. 치아를 꺼낸 뒤 Dynatech MRX ELISA microplate reader (Dynatech laboratories, Chantilly, VA, USA)에 넣고 530nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

4. 통계처리

대조군과 각 실험군에서 MTT 검색, WST-1 검색에서 얻은 흡광도를 Eosin 염색에서 얻은 흡광도로 나눈 수치의 차이를 SPSS 12.0(SPSS, Chicago, Illinois, USA)을 이용한 ANOVA를 사용하여 분석하였으며 사후 검정으로는 Tukey의 방법을 썼다. 유의성은 p < 0.05으로 결정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. MTT 검색

치근면의 면적으로 나누어진 값인 MTT/Eosin 비율은 냉장군, 저속 냉동군, 압력 저속 냉동군은 즉시 발치군보다 통계적으로 유의하게 낮은 세포 활성을 보였으며(p<0.05) 압력 저속 냉동군은 냉장군과 저속 냉동군보다 유의성 있게 높은 세포활성도를 보였다(p<0.05). 그러나, 냉장군은 압력 저속 냉동군, 저속 냉동군, 즉시 발치군과 통계학적으로 유의한 차이를 보이며 가장 낮은 세포 활성을 보였다(p<0.05).

Table 1. The averages and standard deviations of optical density of MTT.

| Groups | MTT ¹ | Eosin ² | MTT/Eosin ³ |
|------------------------------|------------------|--------------------|------------------------|
| Immediate control | 3.01±0.25 | 0.49±0.11 | 6.45±1.46 ^a |
| Cold preservation | 0.81±0.26 | 0.42±0.11 | 2.08±0.94 ^b |
| Slow freezing | 1.62±0.24 | 0.47±0.13 | 3.62±0.88 ^c |
| Slow freezing under pressure | 1.94±0.44 | 0.44±0.14 | 4.71±1.24 ^d |

There were significant differences between groups with different subscripts(p<0.05).

The values of MTT¹ are proportional to the vitality of the cells. The values of Eosin² are proportional to the area of the periodontal ligament cells. So, the values of MTT/Eosin³ mean the vitality of the periodontal ligament cells per unit area.

Table 2. The averages and standard deviations of optical density of WST-1.

| Groups | WST-1 ¹ | Eosin ² | WST-1/Eosin ³ |
|------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|
| Immediate control | 2.31±0.33 | 0.49±0.13 | 4.96±1.23 ^a |
| Cold preservation | 0.58±0.19 | 0.39±0.12 | 1.50±0.32 ^b |
| Slow freezing | 1.11±0.32 | 0.5±0.20 | 2.46±1.00 ^c |
| Slow freezing under pressure | 1.34±0.21 | 0.41±0.10 | 3.41±0.81 ^d |

There were significant differences between groups with different subscripts(p<0.05).

The values of WST-1¹ are proportional to the vitality of the cells. The values of Eosin² are proportional to the area of the periodontal ligament cells. So the values of WST-1/Eosin³ mean the vitality of the periodontal ligament cells per unit area.

2. WST-1 검색

치근면의 면적으로 나누어진 값인 WST-1/Eosin 비율은 냉장군, 저속 냉동군, 압력 저속 냉동군은 즉시 발치군보다 통계적으로 유의하게 낮은 세포활성을 보였으며(p<0.05) 압력 저속 냉동군은 냉장군과 저속 냉동군보다 유의성 있게 높은 세포활성도를 보였다(p<0.05). 냉장군은 압력 저속 냉동군, 저속 냉동군, 즉시 발치군과 통계학적으로 유의성 있게 가장 낮은 세포 활성을 보였다(p<0.05).

IV. 고 찰

냉동보존은 치아가 상실된 부위에 자가치아이식으로 수복을 계획했으나 수여부위가 너무 작아 교정치료를 해야 하는 경우나 교정 치료 중에 발치된 치아를 보관하여 미래에 자가치아이식이나 타가치아이식을 위해 치아은행을 만드는데 있어서 새로운 가능성을 열어주었다²⁾.

그러나, 세포를 냉동 보존하는 과정에서 세포가 손상 받을 수 있는데 프로그램 냉동 속도 조절기를 이용한 저속 냉동은 냉동으로 인한 손상을 줄일 수 있다¹⁵⁾. Andreasen과 Schwartz¹⁶⁾는 -35℃까지 -0.5℃/min 속도로 저속 냉동, -100℃까지 -6℃/min 속도로 냉동한 뒤 -196℃까지 급속 냉동할 것을 권하였고, Kawata⁷⁾와 Kaku 등⁸⁾은 쥐 치아를 자기장으로 -0.5℃/min 속도로 -30℃까지 3일간 냉동 보

관했을 때 좋은 결과를 얻었다고 하였으므로 본 실험에서도 프로그램 냉동속도 조절기를 사용하여 -35℃까지는 -0.5℃/min 속도로 저속 냉동하였다. -35℃ 이하 온도에서는 세포 내부에 얼음결정이 생기지 않고¹⁷⁾ 세포 외부의 냉동환경에 반응해서 세포가 수축하기 때문에 -196℃까지 빠르게 냉동할 수 있다^{17,18)}고 보고되고 있으므로 -35℃ 이하부터 -196℃까지는 액체 질소통을 사용하여 급속 냉동을 시행하였다.

세포를 해동하는 과정에서도 세포가 손상을 받을 수 있는데 냉동속도가 빠르면 세포 내 크기가 매우 작은 얼음 결정체가 형성되고^{19,20)} 이때 느린 속도로 해동하면 세포 내 작은 결정이 응집하여 큰 결정을 형성하는 재결정화 현상이 일어나 세포가 손상을 받게 된다^{21,22)}. 반면 Gao와 Critser²³⁾는 급속 해동을 하면 재결정화 현상을 막을 수 있으므로 많은 세포를 살릴 수 있다고 보고하여 본 실험에서는 급속 해동을 시행하였다.

냉동 보관시 세포 손상을 줄이기 위해 동해방지제를 사용하며 Schwartz와 Andreasen^{1,2)}은 속도조절기로 저속 냉동을 했을 때 10% DMSO를 사용한 경우 정상 치근단막 생성이 제일 좋았다고 하였고 Kim 등¹⁰⁾도 급속 냉동시 10% DMSO를 사용했을 때 치주인대 활성도가 제일 높았다고 보고하였으므로 본 실험에서는 동해방지제로 10% DMSO를 선택하여 실험하였다.

세포의 생존률을 증가시키기 위해 의학 분야에서 압력을

이용한 시도가 있었다. Inuzuka 등²⁴⁾은 쥐의 장을 5atm의 고압(Hyperbaric Oxygen Pressure) 하에서 2일간 저온 보존 후 이식했을 때 1 atm에서 저온 보존한 것보다 더 좋은 이식 결과를 보였다고 하였고, Takahashi 등^{25,26)}은 냉동에 따른 손상을 피하기 위해 30MPa까지의 고압(High Hydrostatic Pressure) 하에서 0℃에서는 1시간 동안 쥐의 간을 저온 보존하는 것이 가능하고 5MPa 고압(High Hydrostatic Pressure) 하에서는 -2℃에서 5시간 동안 쥐의 간을 냉동시키지 않고 저온 보존할 수 있다고 하였다. 이에 더 나아가 Pribenszky 등²⁷⁾은 쥐의 embryo를 30분간 실온에서 60MPa 고압(High Hydrostatic Pressure)처리한 후 냉동 보관했을 때 생존률이 증가하였고 Pribenszky와 Du 등^{28,29)}도 돼지 난자를 20, 40MPa 압력을 가한 후 냉동 보관했을 때 생존률이 증가하였다고 하였다.

고압(High Hydrostatic Pressure)은 세포막의 수동 수송과 능동 수송을 포함한 세포 내 생화학적 반응과 세포의 단백질 운반을 변화시키는 것이 증명되었는데³⁰⁻³²⁾, Kaarniranta 등³³⁾은 고압이 후전자 활성화를 유도해 HSPs 70의 생산을 유도한다고 하였고, Elo 등³⁴⁾은 고압이 HSPs 90β의 생산을 유도한다고 하였다. Du 등³⁵⁾은 고압으로 인해 생긴 HSPs가 세포의 환경에 대한 스트레스 저항성을 증가시켜 냉동과 같은 환경에서도 세포를 보호해 생존률을 증가시켰다고 보고하고 있다. 본 실험에서도 압력 저속 냉동군에서 냉장군과 저속 냉동군에 비해 높은 생존률을 보인 것은 압력 처리로 인해 생성된 HSPs이 관여하지 않았나 추측된다.

또한 냉장군은 다른 군들에 비해 유의성 있게 세포활성도가 낮았는데 이는 냉장 상태에서는 보관 기간이 길어질수록 저온허혈에 의해 세포가 괴사되거나 사멸되기 때문³⁶⁾으로 볼 수 있으며 냉장법은 장기 보관하는 데는 적합하지 못하다고 생각된다.

MTT 검색법은 세포의 활성도를 보는데 방사능 물질을 사용하지 않고 96 well plate를 사용하므로 많은 시료를 검사할 수 있고 과정이 반자동으로 이루어지므로 상당히 정확하다.

WST-1 검색법 역시 세포 증식 및 생존 능력, 약제에 대한 세포 독성을 측정하며 세포의 활성도를 보는데 방사능 물질을 사용하지 않고 96 well plate를 사용하므로 많은 시료를 검사할 수 있고 과정이 반자동으로 이루어지므로 상당히 정확하다. 그러나, 이 방법들은 DNA나 단백질을 측정하지 않고 살아있는 세포 수에 비례하는 양적인 측정만 가능하다³⁷⁾. 동일 계통의 기질인 MTT는 비수용성의 formazan 결정으로 환원되어 결정을 녹이는 단계를 한 번 더 거치게 되나 WST-1는 수용성 formazan 결정으로 환원되어 추가적인 단계 없이 측정할 수 있어 MTT보다 민감도가 뛰어나다³⁸⁾. 그러나, 비용 면에서 WST-1보다 MTT가 상대적으로

저렴하여 쉽게 이용할 수 있다.

Kim 등^{10,11)}, Ahn 등⁹⁾은 쥐 치아가 96 well plate에 잠길 정도로 충분히 작기 때문에 in vivo MTT 검색법을 이용하여 치주인대세포의 활성도를 배양이라는 과정 없이 직접 측정할 수 있다고 하였으므로 본 실험에서도 배양하지 않고 MTT 검색과 WST-1 검색법으로 직접 세포 활성도를 측정하였으며 쥐의 구강 내에서 발수하는 것이 불가능하고 발거 후에 발수를 하는 경우 치근의 손상이 우려되고 시간을 일정하게 조절할 수 없어 변수로 작용할 수 있으므로 발수하지 않고 그대로 사용하였다.

이렇게 발거된 상악 제 1 대구치와 제 2 대구치를 직접 MTT 검색법과 WST-1 검색법에 이용할 경우 치아의 치근면에 붙어있는 치주조직의 양이 일정치 않고 같은 치아 부위라 할지라도 치근의 길이와 지름에 있어 제각기 다르므로 치주인대세포 활성도를 비교하기 위해 Kim 등¹⁰⁾이 시도한 Eosin 검색법을 이용하였다. 이는 MTT 검색법을 응용하여 세포질의 염기성 물질과 반응한 Eosin을 1% acid alcohol로 탈색시킨 용액의 흡광도를 530nm에서 측정해서 그 농도를 구해 간접적으로 치주인대세포의 양을 알아보는 것이다. 이렇게 구한 MTT 환원 흡광도를 Eosin 흡광도로 나누어 표준화하면 치주조직의 양이 다른 제1,2 대구치를 치주인대 단위면적으로 환산해 서로간 상호 비교가 가능하다고 하였다¹⁰⁾. 그래서, 본 실험에서도 MTT 환원 흡광도와 WST-1 환원 흡광도를 단위면적당으로 환산해 비교하여 압력 저속 냉동법이 저속 냉동법과 냉장법에 비해 치주인대세포 활성도가 유의성 있게 높게 나타났다고 할 수 있었다.

본 연구에서 시행한 압력 저속 냉동보관법은 쥐 치아 치주인대세포의 높은 활성도를 보였으므로 치아를 냉동 보관하는 방법으로 이용될 수 있으며 차후 압력을 주는 시간이나 강도 등에 있어서 세밀한 프로토콜의 개발이 필요하다.

V. 결 론

본 연구는 흰쥐 상악 대구치를 발거 후 3MPa 압력 하에 저속 냉동법을 이용하여 치아냉동 시 치주인대세포의 활성도를 MTT 검색법, WST-1 검색법을 이용하여 측정하고자 한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MTT 검사 결과 압력 저속 냉동군은 즉시 발치군보다 유의성 있게 세포 활성도가 낮았으나(p<0.05), 압력을 주지 않은 저속 냉동군이나 냉장군과 비교할 때는 높은 세포 활성도를 보이며 통계적 유의성이 있었다(p<0.05).
2. WST-1 검사 결과도 MTT 검사와 마찬가지로 압력 저속 냉동군에서는 즉시 발치군보다 유의성있게 세포 활성도가 낮았으나(p<0.05), 압력을 주지 않은 저속 냉동군이나 냉장군과 비교할 때는 높은 세포 활성도를 보

이며 통계적 유의성이 있었다($p < 0.05$).

위의 결과를 통해, 3MPa(30기압) 압력을 이용한 저속 냉동 보관법은 4℃ 냉장법이나 압력을 사용하지 않은 다른 냉동 보관법에 비해 우수한 쥐 치아의 치주인대세포의 활성도를 보여 차후 치아의 재식/이식을 위한 중-장기 치아보관을 위한 방법으로서의 가능성을 제시하였다.

참고문헌

- Schwartz O, Andreasen JO. Cryopreservation of mature teeth before replantation in monkeys(I). Effect of different cryopreservation agents and freezing devices. *Int J Oral Surg* 12(6):425-436, 1983.
- Schwartz O, Andreasen JO, Greve T. Cryopreservation before replantation of mature teeth in monkeys(II). Effect of preincubation, different freezing and equilibration rates and endodontic treatment upon periodontal healing. *Int J Oral Surg* 14(4):350-361, 1985.
- Kristerson L. Autotransplantation of human premolars. A clinical and radiographic study of 100 teeth. *Int J Oral Surg* 14(2):200-213, 1985.
- Lindskog S, Blomlof L, Hammarstrom L. Repair of periodontal tissues in vivo and in vitro. *J Clin Periodontol* 10(2):188-205, 1983.
- Melcher AH. Repair of wounds in the periodontium of the rat. Influence of periodontal ligament on osteogenesis. *Arch Oral Biol* 15(12):1183-1204, 1970.
- Andreasen JO. Interrelation between alveolar bone and periodontal ligament repair after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *J Periodontol Res* 16(2):228-235, 1981.
- Kawata T. Tooth transplantation by teeth bank-approach to human-Hiroshima. Department of Orthodontics, Hiroshima University School of Dentistry. 2005.
- Kaku M, Kamata H, Kawata T. Cryopreservation of PDL cells by use of program freezer with magnetic field for tooth banking. *Dent Jpn*. 43:82-86, 2007.
- Ahn HJ, Kim ES, Kim J, Kim DW, Kim KY, Lee CY, Lee SJ. Evaluation of viability of periodontal ligament cell in rat teeth-using slow cryopreservation method with magnetic field. *J Kor Acad of Cons Dent* 33(4):332-340, 2008.
- Kim JW, Kim ES, Kim J, Lee SJ. Evaluation of periodontal ligament cell viability in rat teeth after frozen preservation using in-vivo MTT assay. *J Kor Acad of Cons Dent* 3(3):192-202, 2006.
- Kim ES, Jeon IS, Kim JW, Kim J, Juhn HS, Lee SJ. An MTT-based method for quantification of periodontal ligament cell viability. *Oral Dis* 13(5):495-499, 2007.
- Rubinsky B. Principles of low temperature cell preservation. *Heart Fail Rev* 8(3):277-284, 2003.
- Schluter O, Urrutia Benet G, Heinz V, Knorr D. Metastable states of water and ice during pressure-supported freezing of potato tissue. *Biotechnol Prog* 20(3):799-810, 2004.
- Zhu SM, Ramaswamy HS, Le Bail A. Ice crystal formation in gelatin gel during pressure shift versus conventional freezing. *J of Food Engineering* 66(1):69-76, 2005.
- Kawasaki N, Hamamoto Y, Nakajima T, Irie K, Ozawa H. Periodontal regeneration of transplanted rat molars after cryopreservation. *Arch Oral Biol* 49(1):59-69, 2004.
- Andreasen JO, Schwartz O. Atlas of replantation and transplantation of teeth. Mediglobe SA, Fribourg, Switzerland. 1992.
- Ashwood-smith MJ. Low temperature preservation of cells, tissues and organs. *Pitman Medicals* 19-45, 1980.
- Farrant J. Water transport and cell survival in cryobiological procedures. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 278(959):191-205, 1977.
- Nei T. Structure and function of frozen cells freezing patterns and post-thaw survival. *J Microsc* 112(2):197-204, 1978.
- Shimada K. Effects of cryoprotective additives on intracellular ice formation and survival in very rapidly cooled HeLa cells. *Contrib Inst Low Temp Sci Ser* 19:49-69, 1977.
- Mazur P, Leibo SP, Chu EH. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Exp Cell Res* 71(2):345-355, 1972.
- Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247:125-142, 1984.
- Gao D, Critser JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J* 41(4):187-196, 2000.
- Inuzuka K, Unno N, Yamamoto N, Sagara D, Suzuki M, Nishiyama M, Konno H. Effect of hyperbarically oxygenated-perfluorochemical with university of Wisconsin solution on preservation of rat small intestine using an original pressure-resistant portable apparatus. *Surgery* 142(1):57-66, 2007.
- Takahashi T, Kakita A, Takahashi Y, I. Sakamoto, K. Yokoyama, T. Fujii, S. Yamashina, T. Tamaki, Y. Takazawa, R. Muratsubaki. Functional integrity of the rat liver after subzero preservation under high pressure. *Transplant Proc* 32(7):1634-1636, 2000.
- Takahashi T, Kakita A, Takahashi Y, Yokoyama K, Sakamoto I, Yamashina S. Preservation of rat livers by supercooling under high pressure. *Transplant Proc* 33(1-2):916-919, 2001.
- Pribenszky C, Molnar M, Cseh S, Solti L. Improving post-thaw survival of cryopreserved mouse blastocysts by hydrostatic pressure challenge. *Anim Reprod Sci* 87(1-2):143-150, 2005.
- Pribenszky C, Du Y, Molnar M, Harnos A, Vajta G. Increased stress tolerance of matured pig oocytes after high hydrostatic pressure treatment. *Anim Reprod Sci* 106(1-2):200-207, 2008.
- Du Y, Lin L, Schmidt M, Bogh IB, Kragh PM, Sorensen CB, Li J, Purup S, Pribenszky C, Molnar M, Kuwayama M, Zhang X, Yang H, Bolund L, Vajta G. High hydrostatic pressure treatment of porcine oocytes before handmade cloning improves developmental competence and cryosurvival. *Cloning Stem Cells* 10(3):325-330, 2008.
- Abe F, Kato C, Horikoshi K. Pressure regulated metabolism in microorganisms. *Trends Microbiol* 7(11):447-453, 1999.
- Aldridge BE, Bruner LJ. Pressure effects on mechanisms of charge transport across bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta* 817(2):343-354, 1985.
- Huang SY, Pribenszky C, Kuo YH., et al. The effect of hydrostatic pressure treatment on the protein profile of boar spermatozoa before and after freezing.

- Proceedings of the 6th International Conference on Boar Semen Preservation, Alliston, Ontario, Canada, p.I.-34, 2007.
33. Kaarniranta K, Elo M, Sironen R, Lammi MJ, Goldring MB, Eriksson JE, Sistonen L, Helminen HJ. Hsp 70 accumulation in chondrocytic cells exposed to high continuous hydrostatic pressure coincides with mRNA stabilization rather than transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(5):2319-2324, 1998.
 34. Elo MA, Sironen RK, Karjalainen HM, Kaarniranta KK, Helminen HJ, Lammi MJ. Specific induction of heat shock protein 90 beta by high hydrostatic pressure. *Biorheology* 40(1-3):141-146, 2003.
 35. Du Y, Pribenszky C, Molnar M, Zhang X, Yang H, Kuwayama M, Pedersen AM, Villemoes K, Bolund L, Vajta G. High hydrostatic pressure: a new way to improve in vitro developmental competence of porcine matured oocytes after vitrification. *Reproduction* 135(1):13-17, 2008.
 36. Fisher S, Maclean AA, Liu M, Cardella JA, Slutsky AS, Suga M, Moreira JF, Keshavjee S. Dynamic changes in apoptotic and necrotic cell death correlate with severity of ischemia-reperfusion injury in lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 162(5):1932-9, 2000.
 37. Carlson MA. Technical note: assay of cell quantity in the fibroblast populated collagen matrix with a tetrazolium reagent. *Eur Cell Mater* 12:44-48, 2006.
 38. Alotto D, Ariotti S, Graziano S, Verrua R, Stella M, Magliacani G, Castagnoli C. The role of quality control in a skin bank: tissue viability determination. *Cell Tissue Bank* 3(1):3-10, 2002.

국문초록

압력 저속 냉동 방법의 쥐 치아 치주인대세포 보존 효율 평가

이영은¹ · 김의성¹ · 김 진² · 한승훈³ · 이승종^{1*}¹연세대학교 치과대학 보존학 교실, ²연세대학교 구강병리학 교실 및 구강종양연구소, ³강북삼성병원 보존과

본 연구의 목적은 흰 쥐의 상악 대구치를 발거한 후 치주인대세포를 압력을 이용한 저속 냉동 보관법으로 냉동 보관 시 치주인대세포의 활성도를 저속 냉동법, 냉장 보관법과 비교하여 평가하고자 하였다.

생후 4주된 암컷 Sprague-Dawley계 흰쥐의 상악 좌우 제 1,2 대구치를 발거하여 각 군 당 18개의 쥐 치아를 MTT, WST-1 검색에 이용하였다. 실험군은 4개군으로 대조군은 즉시 발치군이며, 4℃ 냉장고에 일주일간 보관한 냉장군, 발치 후 동해방지제 처리과정을 거쳐 4℃에서 -35℃까지 -0.5℃/min 속도로 서서히 냉동시킨 뒤 -196℃에 냉동한 저속 냉동군, 3MPa의 압력을 가하고 -0.5℃/min 속도로 4℃에서 -35℃까지 서서히 냉동시킨 뒤 -196℃에 냉동한 압력 저속 냉동군으로 나누었다. 보존액은 F medium을 사용했으며 동해방지제로 10% dimethylsulfoxide(DMSO)를 사용하였다. 일주일 후 해동하여 MTT, WST-1검색을 시행한 뒤 치근면을 단위면적으로 표준화하기 위해 MTT, WST-1 측정값을 Eosin 염색 후 530nm에서 측정한 흡광도 값으로 나누었다. 통계 분석을 위해 one way ANOVA를 시행하였으며 사후 검정으로는 Tukey 방법을 사용하였고 결과는 다음과 같다.

1. MTT 검색에 의한 흡광도를 Eosin 염색 후 측정한 흡광도로 나눈 값에서는 압력 저속 냉동군은 즉시 발치군보다 유의성 있게 세포 활성도가 낮았으나($p < 0.05$), 저속 냉동군이나 냉장군과 비교할 때는 높은 세포 활성도를 보이며 통계적 유의성이 있었다($p < 0.05$).
2. WST-1 검색에 의한 흡광도를 Eosin 염색 후 측정한 흡광도로 나눈 값에서도 MTT 검색과 마찬가지로 압력 저속 냉동군에서는 즉시 발치군보다 유의성 있게 세포 활성도가 낮았으나($p < 0.05$), 저속 냉동군이나 냉장군과 비교할 때는 높은 세포 활성도를 보이며 통계적 유의성이 있었다($p < 0.05$).

위의 결과를 통해, 3MPa(30기압) 압력을 이용한 저속 냉동 보관법은 4℃ 냉장법이나 압력을 사용하지 않은 다른 냉동 보관법에 비해 우수한 쥐 치아의 치주인대세포의 활성도를 보여 차후 치아의 재식/이식을 위한 중-장기 치아보관을 위한 방법으로서의 가능성을 제시하였다.

주요단어: 치주인대세포, MTT, WST-1, 활성도, 압력, 냉동 보존