

치주염에 이환되어 발거된 치아의 치주인대가 없는 치근 표면에 EDTA처리를 한 후 3차원적으로 배양한 사람치주인대섬유모세포의 부착에 관한 주사전자현미경적 연구

조아영¹, 김병옥^{1,4}, 박주철^{2,4}, 김홍중^{3,4}, 장현선^{1,4,*}

1. 조선대학교 치과대학 치주과학 교실
2. 조선대학교 치과대학 구강조직학 교실
3. 조선대학교 치과대학 구강해부학 교실
4. 조선대학교 치과대학 구강생물학연구소

I. 서론

치주질환 치료의 궁극적인 목표는 치주질환으로 인해 파괴, 소실된 조직의 원상회복을 이루는 것이다. Melcher¹⁾는 형태-특이세포 재거주설에서 치근면에 이주하는 세포가 새로이 형성될 부착의 성질을 결정한다고 보고함으로써, 치주조직의 재생을 위해서는 다양한 분화 능력이 있는 치주인대세포들의 증식을 촉진시키고, 그 이외의 결합조직과 상피조직 세포의 증식은 제한시킴으로서 조직재생을 이룰 수 있음을 보고하였다. Karring 등²⁾은 치주인대에서 유래하는 세포만이 새로운 결합조직을 형성할 잠재력을 가지고 있다고 보고하였으며, Buser 등^{3,4)}은 신부착 형성을 위한 전구세포가 치주인대에 존재한다고 보고하였다. Gottlow 등⁵⁾은 치주인대세포는 섬유모세포와 골모세포, 백악모세포로 분화, 증식이 가능함으로써 치주조직재생의 중추적 역할을 담당한다고 하였다. 이에 치주인대세포의 존재는 치주조직 재생의 필수조건으로 볼 수 있다.

치주질환에 이환된 치근면은 치주병소의 내독소에

의해 오염되어 구조적, 화학적 변화가 일어난다^{6,7)}. 또한 이러한 감염은 치근표면에 치은과 치주조직 세포의 재부착을 방해하며, 치주창상 치유시 인접조직 세포의 증식도 억제한다. 치주질환에 이환된 치근면에 기구조작(치석제거술 및 치근면활택술)을 시행하는 경우 오염물질만 제거되는 것이 아니라 세포의 부착과 이주를 억제하는 도말층이 형성된다^{8,9,10)}. 따라서 결합조직 세포가 치근면으로 이동해서 부착할 수 있도록 치근면을 개선하기 해서는 적절한 치근면 처치가 필요하다. 치근면 처리제 도포시 기구조작으로 인해 생긴 도말층이 제거되고¹¹⁾, 치근면의 교원기질을 노출시킬 수 있다고 보고되어왔다^{7,12)}. Register 등¹³⁾은 염산처리한 치근면에서 신부착이 일어난다고 했고 여러 종류의 산 중 pH 1의 구연산이 가장 적절하다고 보고하였다. Terranova 등¹⁴⁾의 연구에서는 Tetracycline-HCl(TC-HCl)이 fibronectin의 결합을 증진시켜 섬유모세포의 부착과 성장을 촉진시켰으며, 섬유모세포의 부착은 구연산 처리를 한 부위보다 3배 더 높았고, 상피세포의 부착과 성장이 억제되었다고 보고하였다. 최근 Blomlof

* 교신저자 : 장현선 광주광역시 동구 서석동 421번지 조선대학교 치과대학 치주과학교실, 501-759 (전자우편: periojang@chosun.ac.kr)

* 이 논문은 2006년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음

등⁷⁾은 중성 pH를 띄는 EDTA용액 사용시 낮은 pH를 띄는 산용액(구연산, TC-HCl)을 사용할 때보다 상아질 표면에 노출된 콜라겐 섬유를 보다 많이 보존할 수 있으며, 낮은 pH사용시 나타나는 노출된 상아질에 근접한 치주인대의 괴사를 방지할 수 있다고 보고하였다.

최근 Zaman 등¹⁵⁾은 치주염에 이환된 치근을 200 μ m 두께로 절단하여 백악질과 상아질 부위로 나누어 실험한 결과 EDTA 처리시 사람치주인대섬유모세포 부착을 향상시킬 수 있다고 보고하였다. Chandra 등¹⁶⁾은 치주질환에 이환된 치아의 치관부를 제거한 후 치근을 수직으로 이등분하여 사용한 결과 EDTA 처리시 사람치주인대섬유모세포의 부착이 가능함을 보고하였다. 그러나 지금까지의 연구는 대부분 치근의 절단편을 이용하여 치근표면에 사람치주인대섬유모세포의 2차원적 부착에 관한 것이었다. 치주염에 이환되어 발거된 치아를 EDTA로 처리한 후 전체 치근 표면에 3차원적으로 배양한 사람치주인대섬유모세포의 부착에 관한 연구는 미비하였다.

이 연구에서는 치주염에 이환되어 발거된 치아를 EDTA로 표면처리한 후 주사전자현미경적 관찰을 통해 사람치주인대섬유모세포의 부착이 치근 표면 전체에 일어날 수 있는지 보고, 이를 통해 사람치주인대섬유모세포의 3차원적 부착 가능성을 평가하여, 향후 치주질환에 이환되어 치주인대를 상실한 치아의 재식립시 응용가능성을 알아 보고자 한다.

II. 연구재료 및 방법

1. 사람치주인대섬유모세포의 배양

조선대학교 치과대학 부속 치과병원에 내원한 치주조직이 건강한 환자로 교정을 위하여 발거된 소구치의 치주인대를 환자의 동의하에 채취하여 실험에 이용하였다. 소구치에서 얻은 조직들을 무균 작업대에서 항생제가 함유된 Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)으로 수회 세척한 후 해부 현미경하에서 1-2

mm의 크기로 절단하였다. 절단된 조직 단편들을 60 mm 세포 배양접시(Flacon, Roskilde, Denmark)에 위치시킨 후 조직의 이동을 방지하기 위하여 슬라이드 글라스를 조직 위에 올려놓고 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM, Gibco BRL)을 이용하여 5% CO₂, 37°C, 100% 습도 조건에서 배양하였다. 배지는 이틀에 한번씩 교체하고 세포가 증식함에 따라 계대 배양하여 5세대의 세포를 실험에 이용하였다. 60 mm 세포 배양접시에 배양한 5세대의 사람치주인대섬유모세포를 0.25% trypsin/EDTA로 떼어낸 후 1500rpm으로 5분 동안 원심분리시켜 pellet화 하였다.

2. 치아 표면 처리 및 배양

치주질환을 원인으로 발거된 단근치 8개를 실험에 사용하였다. 우식이나 수복치료 되지 않은 단근치주질환에만 이환된 치아만을 사용하였다. 치아의 치근부를 평활한 면이 얻어질때까지 Gracey curette를 사용하여 치근활택술을 시행하였다. 치아들은 멸균을 위해 PBS용액으로 수회세척하여 50 μ g/ml gentamycin sulphate 용액에 24시간동안 보관한 후 대조군 4개의 치아에는 표면처리를 하지 않고 생리식염수로 세척하였고, 실험군 4개의 치아에는 24% EDTA로 2분간 표면처리하였다. 치아 하나씩 petri dish 중앙에 위치시킨 후 대조군과 실험군 각각의 3개 치아에는 사람치주인대섬유모세포를 치근전체에 배양하였고, 각 군의 1개의 치아에는 치근표면 비교를 위해 사람치주인대섬유모세포를 배양하지 않았다. 4주 동안 배양한 후 2.5% glutaraldehyde 고정액에 담가 3일 동안 전고정시켰다.

3. 주사전자현미경적 관찰

고정이 끝난 치아를 고정액에 포함되었던 완충액(0.1M phosphate buffer solution)으로 세척하여 고정액을 씻어낸 후 50%, 70%, 90%, 95%, 100%

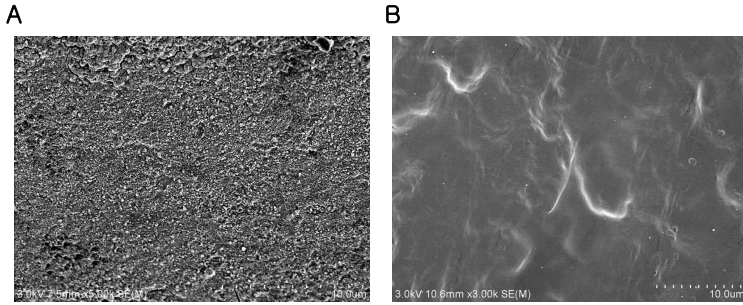


Figure. 1. Scanning electron microscopy (SEM) A. The untreated (saline-treated) root surface has an amorphous appearance($\times 3000$). B. The treated (24% EDTA, 2min) root surface has a "mat-like" flat appearance ($\times 3000$).

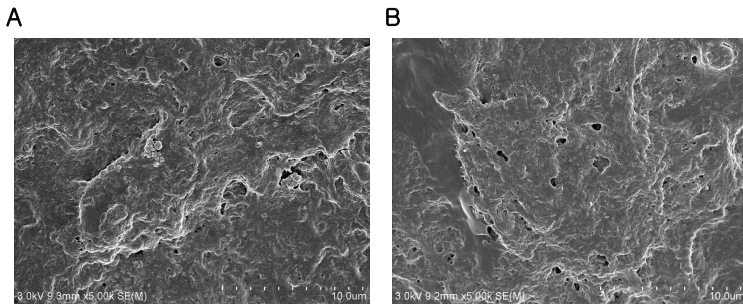


Figure. 2. Scanning electron microscopy(SEM) of human periodontal ligament fibroblast of control group cultured on untreated(saline- treated) root surface for 4 weeks. A. The discoid cell was appeared rough surface with ruffles ($\times 5000$). B. The cell surface has a few perforation(arrow) ($\times 5000$).

(I), 100%(II)순으로 점차 농도를 높게 한 에틸알코올에 각각 10분씩 통과시켜 탈수시켰다. OsO₄로 후고정하고, 백금으로 코팅한 후 주사전자현미경(HITACHI S-4800)으로 관찰하였다.

III. 연구 결과

1. 치근 표면의 주사전자현미경적 소견

생리식염수로 세척한 치근 표면은 도말층으로 보이는 불규칙하고 무정형한 양상으로 관찰되었다. 반면, 24% EDTA로 처리한 치근표면은 매트 모양의 평활한 외형을 나타내었다(Figure. 1).

2. 생리식염수만 처리한 대조군에서 치근 표면에 부착된 사람치주인대섬유모세포의 주사전자현미경적 소견

치근표면 관찰시 드물게 분포된 세포를 볼 수 있었다. 세포 표면 관찰시 평활하지 않고 주름과 천공 등이 관찰되었다. 또한 lamellopodia같은 세포질의 확장이 거의 보이지 않았다. (Figure. 2).

3. 24% EDTA로 표면처리한 실험군에서 치근 표면에 부착된 사람치주인대섬유모세포의 주사전자현미경적 소견

치근 표면에 부착된 사람치주인대섬유모세포의 외형은 생리식염수로만 처리한 대조군보다 양호한 소견을 나타내었다. 세포들은 주로 치근표면에 편평하고 넓게 퍼져있는 양상을 띄며 대부분 뚜렷하게 관찰되었다. 세포표면은 평활하였으며 lamellopodia로 평활하게 이어져 있었고, 기질 형성으로 세포가 다층으로 관찰되었다. 세포 관찰시 둥글게 거상되어 달걀 후라이 같은 외형을 보이는 세포들도 관찰할 수 있었으며, 이들 세포에는 보통 2~3개의 lamellopodia가 존재하였다(Figure. 3).

VI. 고안

치주질환에 이환된 치근면은 치주병소의 내독소에 의해 세포 부착과 이주가 억제되는 표면 변화가 일어난다. 이러한 표면을 개선시키기 위해 기계적 처리 및 화학적 처리가 필요하다. 치근면 처리제는 치근표면을 탈회시키고, 도말층을 제거하며¹¹⁾, 상아세관을 개방시켜 교원기질을 노출시킬 수 있다^{7,12)}. 이

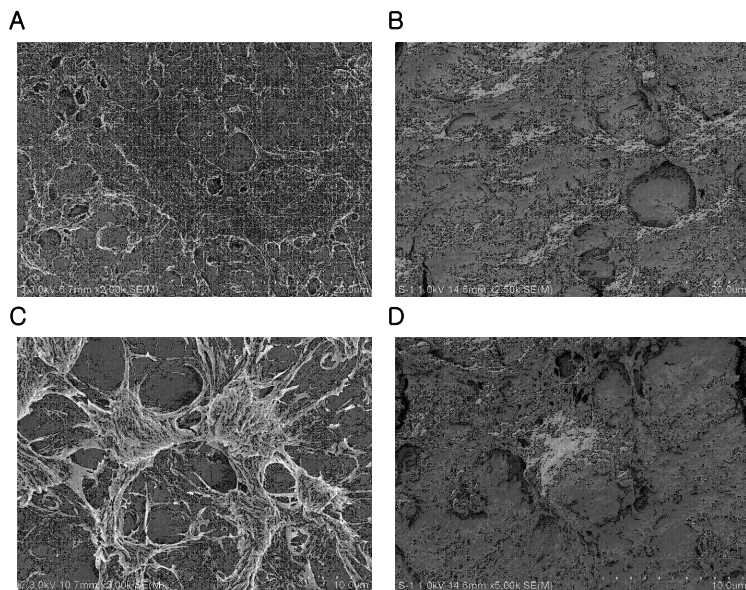


Figure. 3. Scanning electron micrography(SEM) of human periodontal ligament fibroblast of experimental group cultured on 24% EDTA treated root surface for 4 weeks. A. The round-shaped cell has smooth surface with few ruffles($\times 5000$). B. Roughly stellate-shaped cell has smooth surface with few ruffles and is attached with lamellopodia($\times 5000$). C. The stellate-shaped cell covered with ruffles and attached with lamellopodia($\times 5000$). D. The round cell has smooth surface with few ruffles($\times 5000$).

전의 여러 연구에서 치주질환에 이환된 치근면에 치근면 처리제 사용시 치주인대섬유모세포의 부착을 향상시킬 수 있다고 보고되었다. Blomlof 등⁷⁾은 낮은 pH의 산용액으로 치근면 탈회시 노출된 상아질에 근접한 치주인대의 괴사가 나타날 수 있으며, 중성 pH의 산용액 사용시 상아질 표면에 보다 많은 노출된 콜라겐 섬유를 보존할 수 있다고 하였다. 따라서 이 연구에서는 주변 조직을 손상시키지 않는 중성 pH를 띄는 EDTA를 사용하였다.

치주치료의 궁극적인 목표는 치조골, 치주인대, 백악질 등 파괴된 조직의 재생에 있다. Cherry 등¹⁷⁾은 사람치주인대섬유모세포는 섬유모세포와 골모세포, 백악모세포로 분화함으로써 치주조직의 재생에서 중추적 역할을 담당하며, 세포 부착을 평가하기 위한 가장 적합한 세포라고 보고하였다. 이 연구에서 사람치주인대섬유모세포는 계대배양 후 5세대의 세포를 사용하였으며, 치근면에 배양하기 전에 위상차현미경으로 관찰한 결과 건강한 세포로 관찰되었다.

이 연구에서는 치주질환에 이환되어 발견된 치아의 전체 치근 표면에 24% EDTA를 사용하여 치근면 처리를 한 경우와 치근면 처리를 하지 않는 경우에서 사람치주인대섬유모세포를 4주동안 배양한 후 세포의 부착 양상에 대해 주사전자현미경으로 관찰하

였다. 그 결과 모든 치아에서 세포의 부착이 관찰되었으나, EDTA를 처리한 치근면에서 좀 더 많고 양호한 세포의 부착이 관찰되었다. 부착된 세포의 외형은 대체로 납작한 원반모양을 띄거나 퍼진모양, 또는 방사상 형태 등을 나타내었고, 부착된 세포의 표면은 대부분 평활한 형태를 보였고 드물게 물결모양도 관찰되었으나, 수포나 천공 형태는 관찰되지 않았다. 또한 filopodia, lamellopodia에 의해 치근표면에 부착된 양상을 관찰할 수 있었으며 세포기질을 통해 세포간 연결을 관찰할 수 있었다. 반면, 치근면치료를 하지 않고 식염수만 처리한 대조군에서는 치근표면에 부착된 세포가 드물게 분포되어 있으며 lamellopodia와 같은 세포질의 확장은 관찰되지 않으며 표면에 수포나 천공, 주름이 관찰되어 건강하지 않은 세포의 외형을 보였다. Balto 등¹⁹⁾과 Al-Nazhan²⁰⁾은 사람치주인대섬유모세포의 정상적인 외형은 표면에 수포나 주름이 거의 없는 비교적 평활한 표면을 갖으며 lamellopodia에 의해 치근표면에 부착되어 있다고 보고하였다. Al-Nazhan 등²¹⁾은 손상된 세포의 경우 세포질의 수축에 의해 표면에 수포형태가 관찰될 수 있다고 보고하였으며, Payne 등²²⁾은 표면에 천공형태가 관찰되는 것은 세포를 고사시키는 광범위한 세포손상을 나타낸다고

보고하였다. 따라서 EDTA로 치근면처치를 하는 경우 건강한 사람치주인대섬유모세포의 부착을 향상시킬 수 있다고 생각된다. 이것은 EDTA로 처리한 치주질환에 이환된 치근면에 사람치은섬유모세포의 부착에 관한 Fardal과 Lowenburg의 실험 결과와 동일하게 나타났다. 또한, 최근 Zaman¹⁵⁾과 Chandra 등¹⁶⁾은 EDTA를 사용하여 치주질환에 이환된 치근면 처리시 사람치주인대섬유모세포의 부착을 향상시킬 수 있다고 보고하였다. 그러나 이전의 연구 방법을 살펴보면, 대부분 치근절편을 사용하거나¹⁵⁾, 치관부를 제거하고 치근을 수직으로 분리하여 실험하였다¹⁶⁾.

그러나, 이 연구에서는 치주질환에 이환되어 발거된 치주인대를 상실한 치아를 절단하지 않고 그대로 사용하여, 치근면 처리 후 세포를 배양한 결과 모든 치아면에서 사람치주인대섬유모세포의 부착을 관찰할 수 있었다. 따라서 치주인대가 전혀 없는 치근에 사람치주인대섬유모세포를 배양할 경우 실제 치근표면에 3차원적으로 세포의 부착이 일어날 수 있음을 시사하고, 이러한 결과는 치주적으로 발거된 치아의 재식시 응용할 수 있는 기반이 되리라 생각된다. 또한 이 연구에서는 주사전자현미경으로 세포를 관찰하기 위해 치아를 에탄올에 순차적으로 통과시켜 건조시키는 방법을 사용한 결과 세포 외형 관찰시 다소의 수축소견을 관찰할 수 있었다. 향후 치근표면에 부착된 사람치주인대섬유모세포의 분화, 성장가능성에 대한 연구를 위해서는 세포의 외형을 정확히 보존하여 관찰할 수 있는 임계점 건조 방법을 고려해 보아야 할 것으로 생각된다.

V. 결론

이 연구에서 저자는 치주염에 이환되어 발거된 사람치주인대섬유모세포가 상실된 치아에 EDTA로 치근면 처리 후 사람치주인대섬유모세포를 배양시 치근표면 전체에 세포가 부착함을 관찰할 수 있었다. 이에 저자는 사람치주인대섬유모세포의 부착이 실제 치근표면에 3차원적으로 일어날 수 있음을 제안할 수 있다. 앞으로 치근표면에 부착된 사람치주인대

섬유모세포의 분화, 성장가능성에 대한 연구와 임상에서 치주질환에 이환되어 치주인대를 상실한 치아의 재식립시 이용하기 위한 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

VI 참고문헌

1. Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. J Periodontol 1976;47:256-260.
2. Karring T, Isidor F, Nyman S, Lindhe J. New attachment formation on teeth with a reduced but healthy periodontal ligament J Clin Periodontol 1985;12:51-60.
3. Buser D, Warrer K, Karring T. Formation of a periodontal ligament around titanium implants. J Periodontol 1990;61:597-601.
4. Buser D, Warrer K, Karring T, Stich H. Titanium implants with a true periodontal ligament: an alternative to osseointegrated implants? Int J Oral Maxillofac Impl 1990;5:113-116.
5. Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. J Clin Periodontol 1984;11:494-503.
6. Babay N. The effect of EDTA on the attachment and growth of cultured human gingival fibroblasts in periodontitis-affected root surfaces. J Contemp Dent Pract 2001;15:13-23.
7. Blomlof J, Lindskog S. Root surface texture and early cell and tissue colonization after different etching modalities. Eur J Oral Sci 1995;103:17-24.
8. Babay N. Attachment of human gingival fibroblasts to periodontally involved root surface following scaling and/or etching procedures: A scanning electron microscopy

- study. *Braz Dent J* 2001;12:17–21.
9. Barkmeister WW, Jabro MH. Scanning electron microscopic analysis of the local effects of a periodontal scaling gel on selected surfaces. *J Clin Dent* 1992;18:39–42.
 10. Blomlof J, Lindskog S. Periodontal tissue–vitality after different etching modalities. *J Clin Periodontol* 1995;22:464–468.
 11. Aleo JJ, DeRenzis FA, Faber PA, Varboncoeur AP. The presence and biologic activity of cementum–bound endotoxin. *J Periodontol* 1974;45:672–675.
 12. Polson AM, Frederick GT, Ladenheim S, Hanes PJ. The production of a root surface smear layer by instrumentation and its removal by citric acid. *J Periodontol* 1984;55:443–446.
 13. Register AA. Bone and cementum induction by dentin, demineralized in situ. *J Periodontol* 1973;44:49–54.
 14. Terranova VP, Franzetti LC, Hic S, et al. A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth. *J Periodontal Res* 1986;21:330–337.
 15. Zaman KU, Sugaya T, Hongo O, Kato H. A study of attached and oriented human periodontal ligament cells to periodontally diseased cementum and dentin after demineralizing with neutral and low pH etching solution. *J Periodontol* 2000;71:1094–1099.
 16. Chandra RV, Mahalinga K. The attachment of V79 and human periodontal ligament fibroblasts on periodontally involved root surfaces following treatment with EDTA, citric acid, tetracycline HCl: an SEM in vitro study. *J Contemp Dent Pract* 2006; 7:44–59.
 17. Hatfield CG, and Baumhammers A. Cytotoxic effects of periodontally involved surfaces of human teeth. *Arch Oral Biol* 1971;16:465–468.
 18. Proye MP, Polson AM. Effect of root surface alterations on periodontal healing. I. Surgical denudation. *J Clin Periodontol* 1982;9:428–440.
 19. Balto H, Al–Nazhan S. Attachment of human periodontal ligament fibroblasts to 3 different root–end filling materials: Scanning electron microscope observation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;95:222–227.
 20. Al–Nazhan S. SEM observations of the attachment of human periodontal ligament fibroblasts to non–demineralized dentin surface in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;97:393–417.
 21. Al –Nazhan S, Spangberg L. Morphological cell changes due to chemical toxicity of a dental material: an electron microscopic study on human periodontal ligament fibroblasts and L929 cells. *J Endod* 1990; 16:129–134.
 22. Payne JM, Cobb CM, Rapley JW, Killoy WJ, Spencer P. Migration of human gingival fibroblasts over guided tissue regeneration barrier materials. *J Periodontol* 1996;67: 236–244.

The 3-dimensional attachment of human periodontal ligament fibroblasts on periodontally involved root surface following treatment with EDTA: A SEM study in vitro

Ah-Young cho¹, Byung-Ock Kim^{1,4}, Joo-Cheol Park^{2,4},
Heung-Joong Kim^{3,4}, and Hyun-Seon Jang^{1,4,*}

1. Department of Periodontology, College of Dentistry, Chosun University
2. Department of Oral Histology, College of Dentistry, Chosun University
3. Department of Oral Anatomy, College of Dentistry, Chosun University
4. Oral Biology Research Institute, College of Dentistry, Chosun University

This study evaluated the possibility of the 3-dimensional attachment of human periodontal ligament fibroblasts to a periodontally involved root surface after an EDTA treatment in vitro. The human PDL fibroblasts were isolated from the middle third of the root of periodontally healthy teeth extracted for orthodontic reasons. The cells were cultured in a medium containing Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% fetal bovine serum at 37°C in humidified air containing 5% CO₂. Eight single-rooted teeth were obtained from patients diagnosed with periodontitis. After scaling and root planing, four teeth were etched with 24% ethylenediaminetetracetic acid (EDTA) for two minutes (Experimental group). The other four teeth were not treated with EDTA and were used as the control group. The human PDL fibroblasts were placed in the total root surface and cultured for 4 weeks. The teeth were fixed in 2.5% glutaraldehyde in PBS before preparation for the scanning electron microscopy (SEM) examination. The human PDL fibroblasts showed a healthy morphology on the root surfaces treated with EDTA (Experimental group) and a relatively unhealthy appearance on the treated root surfaces (Control group). This suggests that EDTA favorably affects the 3-dimensional attachment of human PDL fibroblasts cultured on the root surfaces, which may play an important role in periodontal healing and regeneration.

