

급속냉동된 쥐 치아의 *in vivo* MTT 검색법을 이용한 치주인대세포 활성화 평가

김재욱 · 김의성 · 김 진 · 이승종*

연세대학교 치과대학 치과보존학교실

ABSTRACT

EVALUATION OF PERIODONTAL LIGAMENT CELL VIABILITY IN RAT TEETH AFTER FROZEN PRESERVATION USING *IN-VIVO* MTT ASSAY

Jae-Wook Kim, Eui-Sung Kim, Jin Kim, Seung-Jong Lee*

Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Yonsei University, Seoul, Korea

The purpose of this study was to examine the viability of PDL cells in rat molars by using *in vivo* MTT assay, which was used to compare fast cryopreservation group by liquid nitrogen (-196°C) with 4°C cold preservation group.

A total of 74 Sprague-Dawley white female rats of 4 week-old with a body weight of 100 grams were used. The maxillary left and right, first and second molars were extracted as atraumatically as possible under ketamine anesthesia.

Ten teeth of each group were divided as six experimental groups depending upon the preservation. Cryopreservation groups were Group 1 (5% DMSO 6% HES in F medium), Group 2 (10% DMSO in F medium), Group 3 (5% DMSO 6% HES in Viaspan[®]), Group 4 (10% DMSO in Viaspan[®]) which were cryopreserved for 1 week and cold preservation groups were Group 5 (F medium), Group 6 (Viaspan[®]) at 4°C for 1 week. Immediate extraction group was used as a control. After preservation and thawing, the *in vivo* MTT assay was processed. Two way ANOVA and Duncan's Multiple Range Test was performed at the 95 % level of confidence. Another 2 teeth of each group were treated as the same manner and frozen sections $10\ \mu\text{m}$ thick for microscopic observation.

The value of optical density obtained after *in vivo* MTT analysis was divided by the value of eosin staining for tissue volume standardization. Group 1, 2 had significantly higher optical density than Group 3 and 4 which had the lowest OD value. Group 6 had higher OD value than in Group 5 ($P < 0.05$). Histological findings of periodontal ligament cell, after being stained with MTT solution were consistent with the *in vivo* MTT assay results.

In this study, the groups which were frozen with DMSO as a cryoprotectant and the groups with F medium showed the best results. [J Kor Acad Cons Dent 31(3):192-202, 2006]

Key words: Periodontal ligament cell, Vitality, In-vivo MTT assay, Cryopreservation, Cold preservation, Optical density

- Received 2006.1.19., revised 2006.3.20., accepted 2006.3.21.

* Corresponding Author: **Seung-Jong Lee**

Department of Conservative Dentistry,
College of Dentistry, Yonsei University
134 Shinchon-Dong, Seodaemun-Ku, Seoul, Korea, 120-752
Tel: 82-2-361-8700 Fax: 82-2-313-7575,
E-mail: sjlee@yumc.yonsei.ac.kr

※ 본 연구는 2005년도 연세대학교 치과대학 교내 연구비의 지원에 의해 이루어짐.

I. 서 론

발거된 치아의 치근면에 살아있는 치주인대세포를 유지하는 것은 치아 이식의 성공에 있어서 가장 중요한 요소이다¹⁾. 따라서 발거된 치아를 보존용액에 보존하여 치주인대세포 활성도를 오래 유지하고자 하는 여러 가지 방법들이 사용되어 왔다. Schwartz 등은²⁻⁴⁾ 원숭이의 치아를 1주간 냉동보존 후 재식하는 방법을 보고하였으며 최초로 사람의 상악 소구치를 냉동상태로 18개월 동안 보관한 후에 재식하고 4년 후에도 임상적 방사선학적으로 정상 치주인대 (PDL)로 치유되었음을 보고하였다. 냉동보존시에는 빙정 (氷晶) 생성시에 발생하는 손상과 이차적인 용질 (solute)의 농축으로 인한 삼투압증가로 인한 손상을 방지하는 동해 방지제 (cryoprotectant)가 필수적이다⁵⁾. Dimethylsulfoxide (DMSO)는 세포 투과성이 좋아 glycerol과 함께 침투성 동해방지제 (cryoprotectant)로 널리 사용되고 있다. 그러나 DMSO에 장시간 노출되었을 때나 높은 온도나 고농도에 노출되었을 때 세포에 미치는 부작용도 고려되어야 한다⁶⁾. Hydroxyethyl starch (HES)는 비침투성 동해방지제로서 세포막 주위에서 냉동중의 세포의 탈수를 막아주는 역할을 하게 되는데 이를 통해 침투성 동해방지제와 함께 사용되어 DMSO의 농도를 낮추는데 사용된다⁷⁾.

치아의 냉동보존의 유용성은 여러 가지를 들 수 있는데, 교정 치료 중 발거된 치아를 미래의 자신의 치아 결손 부위에 이식하고자 예비로 보관하거나⁸⁾ 발거된 치아를 즉시 이식하기에는 수용부위의 공간적인 문제가 있을 경우 교정치료를 통해 문제를 해결하는 동안 치아의 장기 보존이 필요한 경우⁹⁾, 그리고 나아가 교정적으로 발거되어 버려지는 치아나 지치 등을 보관하여 타가치아이식 등을 위한 치아은행을 만들기 위해 필수적이다⁸⁾.

따라서 보다 효율적인 치아의 보관방법을 개발하기 위해서는 냉동 후 해동된 치아나 냉장보관된 치아의 치주인대세포의 활성도를 효과적으로 평가하는 것이 필요하다. 이전의 연구에서 여러 가지 치주인대 활성도의 평가방법이 이용되었다. Hupp 등은¹⁰⁾ 탈구된 치아의 잠재적인 치유능력을 보다 명확히 밝혀내기 위해 발거된 치아를 다양한 저장용액과 시간에 따라 보관한 후 세포의 표식자로 radioactive DNA precursor인 ³H thymidine을 함유한 배지에 37℃에서 24 시간 동안 치주인대 세포를 배양하여 부착시킨 후 이들 치아를 탈회시켜 시편을 관찰함으로써 치주인대세포의 활성도를 평가하였다. Lekic 등은¹¹⁾ 교정치료 목적으로 발거된 소구치를 다양한 건조시간과 저장 용액에 보관한 후 치근막에서 치주인대세포를 채취하여 배양시켜서 하나의 세포에서 형성된 군집 (colony)을 methylene blue 등으로 염색

하고 그 군집의 숫자를 세어 치주인대세포의 활성도를 평가하였다. Ashkenazi 등은¹²⁾ trypsin과 collagenase를 이용하여 치근 표면으로부터 직접 치주인대세포를 채취하고 배양시켜 이를 다양한 저장 용액에 보관한 후 neutral red나 trypan blue 등으로 염색하여 치주인대 세포 활성도를 평가하였다.

위와 같이 치주인대 세포를 채취하여 배양을 통한 방법은 비교적 쉽고 간편하기는 하나 세포의 채취 과정에서 치근면의 모든 세포가 채취된다는 뚜렷한 증거가 없으며 비록 세포가 살아 있다 하더라도 그 수의 약 70%만이 세포 분열 능력이 있어 실제 살아있는 치주 조직의 치유능력과는 차이가 있을 수 있다¹³⁾. 또한 이런 방법들은 치근면에서 채취된 세포를 배양한 것이므로 원래 채취된 세포와는 다른 많은 변수가 있을 수 있다. Ashkenazi 등은^{12,14)} 배양시킨 세포를 이용하여 치주인대세포의 활성도, 분열능력, 집락형성능력 같은 살아있는 세포의 생물학적 상태를 정성적으로 규명하려 하였으나 임상적 결과와는 많은 차이가 있음을 보고하였다.

MTT (Tetrazolium-based colorimetric assay) 검색법은 많은 시료를 신속, 정확, 객관성 있게 판독할 수 있어 배양된 세포를 이용한 세포 독성에 관한 연구에서 주로 사용되어 왔다¹⁵⁾. 이 방법은 대사 과정이 온전한 세포의 미토콘드리아 내에 탈수소효소가 노란색 수용성 tetrazolium salt [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 자주색을 띄는 비수용성의 MTT formazan 결정으로 환원시키는 원리를 이용한 것이며, formazan crystal은 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 용해시켜 570 nm의 파장에서 흡광도를 ELISA reader로 측정한다. 이 흡광도는 MTT가 살아있는 세포에 의해 환원된 양을 나타내며 각 well에 존재하는 생존 세포 수와 비례한다.

MTT 검색법은 검색의 속도나 수량화 (quantification) 하거나 많은 샘플을 검사하는데 있어 장점이 있으며, 다른 기존의 방법과 비교할 때 MTT 검색법은 우수한 재현성을 보였으며 clonogenic assay에 비해 약 90%의 예견율을 보였다¹⁶⁾. *In vitro*에서의 MTT 검색법은 많이 사용되어온 방법이지만 *in vivo*에서의 직접 측정은 보고가 거의 없었다. Colangelo 등은^{17,18)} MTT 검색법에서 환원된 Formazan 결정을 편광현미경하에서 밝은 결정이 보이는 것을 이용하여 noncolorimetric pixel analysis를 통하여 분석하였다. 이에 본 연구는 냉장보관과 냉동보관을 통해 치아를 보관하였을 때 *in vivo* MTT 검색법을 이용하여 치주인대세포의 활성도를 측정하고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험동물의 전 처치

생후 4주된 건강하고 평균 체중 100 gm 내외의 암컷 Sprague-Dawley계 흰쥐 74마리를 이용하였다. 발치를 용이하게 하기 위해 0.4% β -aminopropionitrile (β -APN, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 함유한 Purina분말과 물을 사료로서 발치 전 3일간 공급하였다.

Ketamine (유한케타민, Yuhan co., Seoul, Korea 0.1 ml/100 g) 마취 하에 접근이 가장 용이한 좌, 우측 상악 제 1, 2 대구치 (M1, M2)를 모두 발거하여 이들 치아를 MTT 검색법과 냉동 절단법을 이용한 조직학적 관찰에 모두 사용하였다.

2. 연구방법

실험에 사용한 보존용액으로 F medium은 Dulbeco'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 (100 units/ μ l), streptomycin (100 μ l/ml), fungizone (0.3 μ g/ml) (Gibco-BRL)을 첨가하여 제조하였다.

냉동시 세포질내 동해방지제로는 DMSO (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO, USA), 세포질의 동해방지제로 HES (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO, USA)를 사용하였다.

가) 실험군 분류

대조군으로는 즉시 발치군을 사용하였다.

각 군당 10마리의 쥐에서 40개의 치아를 발거하여 MTT 검색법에 사용하였으며 formazan 결정을 관찰하기 위해 냉동 절단에 4마리의 쥐에서 14개 치아를 사용하였다.

나) 냉동군

1군: F medium에 5% DMSO 및 6% HES함유군

F medium에 DMSO를 5%, HES를 6%되게 혼합한 후 4℃로 보관하였다. 발거된 치아는 PBS에 세척한 후 2 ml 냉동튜브에 혼합 용액 1 ml와 함께 담고 4℃에서 10분간 보관한 뒤 -196℃의 액체질소 냉동고에 넣어 1주일간 냉동상태로 보관하였다.

2군: F medium에 10% DMSO 함유군

F medium에 DMSO를 10% 첨가한 보관 용액을 4℃상에서 보관한 후 발거된 치아를 PBS로 세척하고 F medium에 2.5%, 5%, 7.5% DMSO를 첨가한 용액에 단계적으로 5분간씩 넣은 후 2 ml 냉동튜브에 F medium에 10% DMSO 혼합 용액 1 ml와 함께 넣고 5분 후에 -196℃의 액체질소 냉동고에 넣어 1주일간 냉동상태로 보관하였다.

3군: Viaspan®에 5% DMSO 및 6% HES 함유군

Viaspan®에 DMSO를 5% 및 HES를 6% 첨가한 보관 용액을 4℃상에서 보관한 후 발거된 치아를 PBS로 세척하고 2 ml 냉동튜브에 혼합 용액 1 ml와 함께 넣고 10분 후에 -196℃의 액체질소 냉동고에 넣어 1주일간 냉동상태로 보관하였다.

4군: Viaspan®에 10% DMSO 함유군

Viaspan®에 DMSO를 10% 첨가한 보관 용액을 4℃상에서 보관한 후 발거된 치아를 PBS로 세척하고 Viaspan®에 2.5%, 5%, 7.5% DMSO를 첨가한 용액에 단계적으로 5분간씩 넣은 후 냉동튜브에 Viaspan®에 DMSO를 10% 첨가한 혼합 용액 1 ml와 함께 넣고 5분 후에 -196℃의 액체질소 냉동고에 넣어 1주일간 냉동상태로 보관하였다.

냉동군의 해빙방법

급속 냉동한 치아를 -196℃의 액체질소 냉동고에서 꺼내어 37℃ 수욕조에 넣어 해빙하였다. 배지가 액체 상태로 되었을 때 수욕조에서 치아를 꺼내어 F medium과 Viaspan®의 10% DMSO 함유군 (2군, 4군)은 해빙 후 치아를 4℃ 상에서 7.5%, 5%, 2.5%, 0% DMSO가 함유된 각각의 F

Table 1. Experimental groups

Groups		Media	DMSO	HES
Group 1	Cryopreservation	F medium	5%	6%
Group 2			10%	-
Group 3		Viaspan®	5%	6%
Group 4			10%	-
Group 5	Cold preservation	F medium	-	-
Group 6		Viaspan®	-	-

medium, Viaspan®용액에 5분간씩 순차적으로 넣어 DMSO를 제거한 후 MTT 검색에 사용하였다.

F medium과 Viaspan®의 5% DMSO, 6% HES 함유군은 해빙 후 치아를 DMSO가 없는 각각의 F medium, Viaspan®용액에 4℃에서 10분간 넣어 DMSO를 제거한 후 MTT 검색에 사용하였다.

다) 냉장군

5군: F medium, 6군: Viaspan®

발거된 치아를 보관 용액이 담긴 96 well plate에 넣고 후 4℃상에서 1주일간 보관한 후 실험에 사용하였다.

라) 대조군

치아 발거 후 즉시 MTT 검색에 사용하였다.

3. MTT 검색

각 실험군의 처리가 끝난 뒤에 96-well plate에 노란색의 MTT 용액 (0.05 mg/ml, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 200 μ l를 넣고 각 군당 제1, 2대구치 각각 40개 치아를 MTT 용액이 있는 각 well에 담았다. 이때 혈액 내의 혈구세포 개재 가능성을 최소화하기 위하여 식염수로 치근면을 깨끗이 세척하였다.

그 후 알루미늄 foil로 96-well plate를 싸서 3시간 동안 37℃ 회전 진탕기 상에서 배양하여 MTT가 환원 되도록 하였다. 배양 후 DMSO 150 μ l를 첨가하여 15분간 회전 진탕하여 형성된 MTT formazan 결정을 녹여내고 각 well에서 치아를 제거 한 후 Dynatech MRX ELISA microplate reader (Dynatech laboratories, Chantilly, VA, USA)에 넣고 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

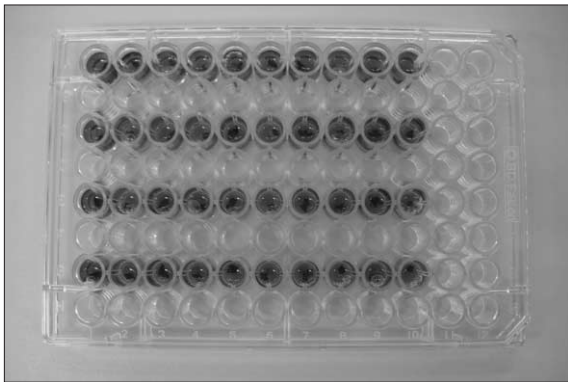


Figure 1. 96 well plate after *in vivo* MTT assay.

4. 치아 치근면에 붙어있는 치주조직의 양 측정

실험에 사용된 치아의 치근면에 붙어있는 치주조직의 양을 정량적으로 측정하기 위해 MTT 검색 실험 후 각 군의 well에서 제거된 치아를 각 군별로 96-well plate에 치아를 넣고 eosin (1% eosin Y Muto pure chemical co. Ltd, Tokyo, Japan) 350 μ l를 첨가하여 12시간 정도 염색한 후에 치아를 제거하여 다른 well에 넣은 뒤 치아의 탈회 없이 염색된 치주조직 부위를 깨끗이 탈색시키기 위해 치아에 1% acid alcohol 350 μ l (70% ethyl alcohol, 1% HCl)를 넣고 1시간 동안 담가두어 탈색시켰다. 그 후 치아를 각각의 96-well plate에서 꺼낸 다음 탈색된 well내의 용액을 ELISA microplate reader에 넣고 530 nm파장에서 흡광도를 측정하였다.

5. 냉동 절단법을 이용한 조직학적 검사

각 군당 상악 제 1, 2 대구치 각각 2개 치아를 발거한 후 MTT 검색에서와 같이 치아를 MTT 용액이 있는 각 well에 담근 후 알루미늄 foil로 96-well plate를 싸서 3시간 동안 37℃에서 배양해서 MTT가 환원되도록 했다. 음성 대조군으로 MTT염색을 하지 않은 치근을 사용하였다. 4% paraformaldehyde로 조직을 고정한 후 0.5M EDTA에 1주일간 4℃에서 탈회시켰다. 냉동절단을 위해 Tissue-Tek O.C.T (Optimal Cutting Temperature) Compound® (Sakura co. Torrance, CA, USA)로 포매한 후 -20℃에서 냉동시킨 다음 광학 현미경 관찰을 위해 즉시 10 μ m 두께로 냉동절단기 (LEICA® CM3050 S, Germany)로 절단하여 표본을 제작하였으며 음성대조군을 제외한 나머지 군의 치아 시편에 현미경 관찰시 주위조직과의 뚜렷한 차이를 보여주기 위한 대조염색으로 Nuclear Fast Red (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 7분간 염색하였다. 현미경상에서 보이는 치근면상의 특징적인 MTT formazan 결정의 형태 및 분포 차이를 광학현미경과 편광현미경하에서 40, 100, 200, 400배율로 관찰한 후 Olympus Vanox AH2 현미경 (Olympus optical co., Tokyo, Japan)과 연결시킨 디지털 카메라 (Leica DC 300F, Leica Microsystems ltd., Heerbrugg, Switzerland)로 대표적인 부위를 촬영하였다.

6. 실험자료 분석

MTT 및 Eosin 검색법에서 얻은 흡광도 (OD)는 실험군과 M1, M2와 차이를 two-way ANOVA로 분석하였으며, M1, M2는 각각 one-way ANOVA로 군간의 유의차를 구했으며 군의 순위 비교는 Duncan's Multiple Range Test

를 사용하였다. 그리고 각 군 간의 통계분석법은 95% 신뢰 수준이다.

Ⅲ. 결 과

1. MTT 검색에 의한 흡광도 측정

Figure 2에 M1과 M2의 전체 치아의 MTT흡광도 결과를 합쳐서 비교하였으며 M1과 M2의 결과와 마찬가지로 MTT 흡광도는 냉동군에서 F medium을 배지로 사용한 군 (1, 2군)에서는 DMSO의 농도의 차이에 따른 유의차는 없었다. Viaspan®에 냉장보관한 군 (3, 4군)에서는 F medium 배지 군보다 낮은 흡광도를 보였으며 통계적인 유의차가 있었다. 냉장보관한 군에서는 Viaspan®에 냉장보관한 군 (6군)에서 F medium에 냉장보관한 군 (5군)보다 유의차 있게 높은 흡광도가 측정되었다 ($p < 0.05$) (Figure 2).

2. 치근면 치주조직의 정량적 측정을 위한 Eosin 염색의 흡광도 측정

제1대구치와 제2대구치에서 각각 군 간의 Eosin 흡광도에서 통계적인 유의차가 없었다. Eosin염색의 측정값이 치근면의 세포의 양을 의미하므로 치근의 단위면적으로 환산된 MTT/Eosin의 비는 전체치아의 비교에서 MTT 흡광도의 결과와 마찬가지로 1군과 2군에서는 유의차가 없었으며 3, 4군에서 유의차 있게 낮은 MTT/Eosin 비를 나타내었다. 그리고 Viaspan®에 냉장보관한 군 (6군)에서 F medium에 냉장보관한 군 (5군)보다 유의차 있게 높은 MTT/Eosin비가 나왔다 (Figure 2).

3. 냉동 절단에 의한 조직학적 관찰

Figure 3에서 즉시군의 광학 현미경사진에서 formazan crystal의 모습을 관찰할 수 있으며 치수 일부에서도 for-

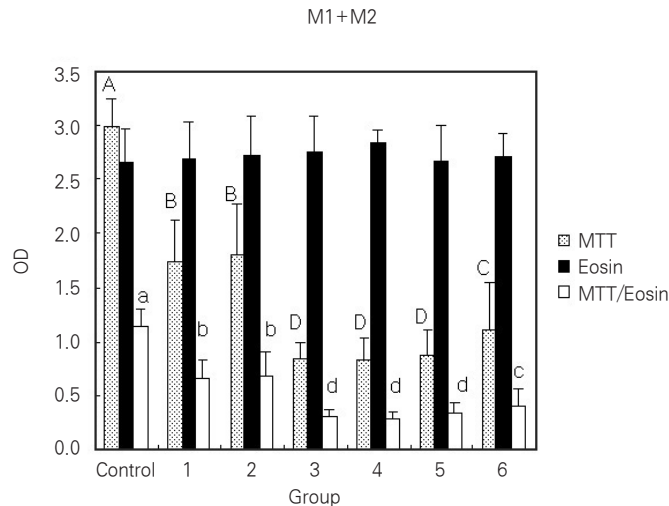


Figure 2. Optical density of MTT, Eosin stain and MTT/Eosin following different experimental groups in Mx 1st and Mx 2nd molar.

A, B, C, D, a, b, c, d mean grouping by Duncan's Multiple Range Test

Means with the same letter are not significantly different. $P < 0.05$

Control: immediate extraction.

Group 1: cryopreservation with 5% DMSO and 6% HES in F medium for 1 week.

Group 2: cryopreservation with 10% DMSO in F medium for 1 week.

Group 3: cryopreservation with 5% DMSO and 6% HES in Viaspan® for 1 week.

Group 4: cryopreservation with 10% DMSO in Viaspan® for 1 week.

Group 5: cold preservation in F medium at 4°C for 1 week.

Group 6: cold preservation in Viaspan® at 4°C for 1 week.

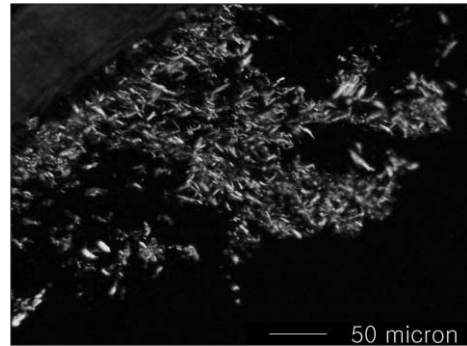
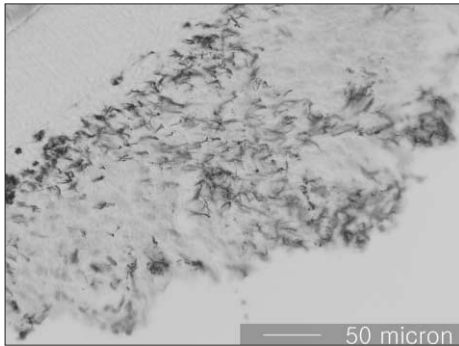
mazan crystal이 관찰된다. 편광현미경하에서의 MTT formazan 결정은 밝은 자주색의 결정으로 나타나며 이는 광학 현미경하에서의 모습과 일치하였다.

F medium 냉동군에서는 치근단에 가까운 치수내에서는 MTT formazan 결정을 쉽게 관찰할 수 있으나 치근면에서는 즉시군에 비해 현저하게 적은 결정을 관찰할 수 있었다

(Figure 4, 5).

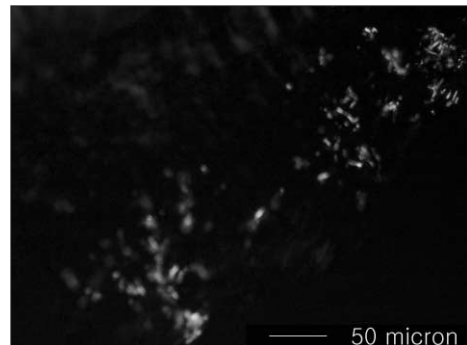
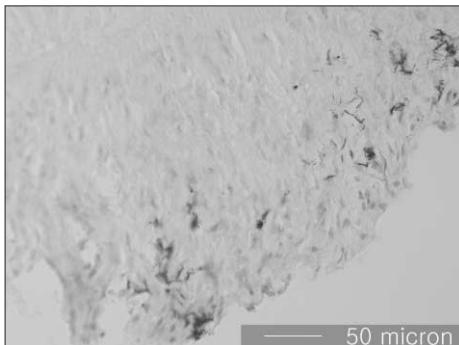
Viaspan® 냉동군의 치근에서도 즉시군에 비해 현저하게 적은 결정을 관찰할 수 있었다 (Figure 6, 7).

4℃ 냉장 보관군에서는 치근면에서의 MTT formazan 결정은 현저하게 적게 나타났으며 Viaspan® 군에서 치수내에는 많은 결정을 관찰할 수 있었다 (Figure 8, 9).



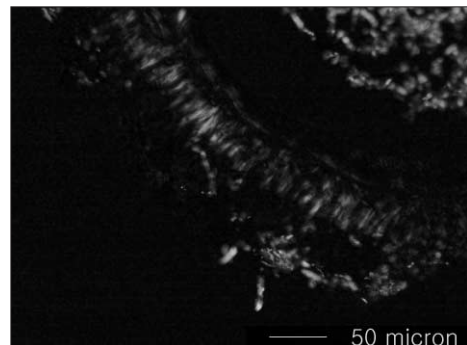
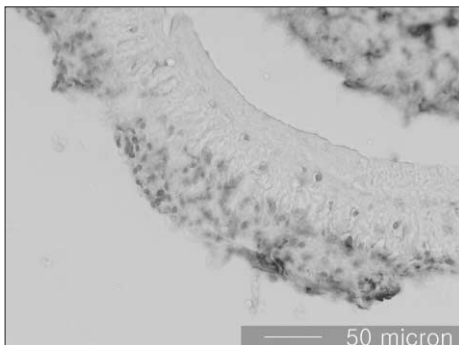
×200

Figure 3. Immediate control with MTT stain, optical and polarized microscopic view.



×200

Figure 4. Cryopreservation with 5% DMSO and 6% HES in F medium group with MTT stain, optical and polarized microscopic view.



×200

Figure 5. Cryopreservation with 10% DMSO in F medium group with MTT stain, optical and polarized microscopic view.

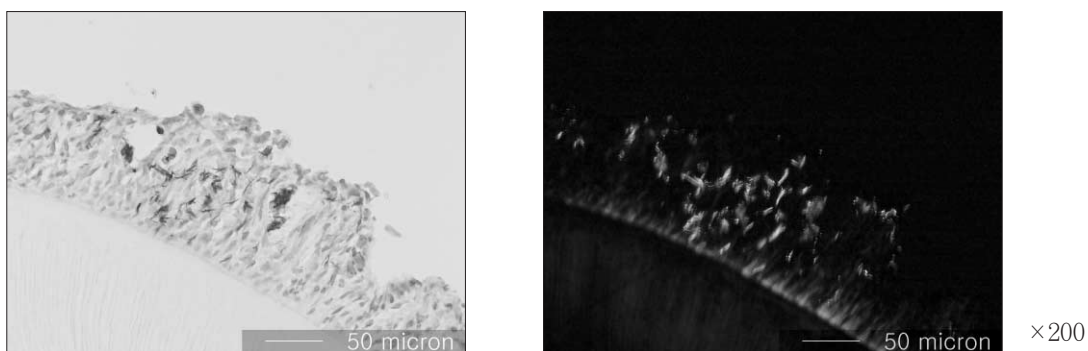


Figure 6. Cryopreservation with 5% DMSO and 6% HES in Viaspan® group with MTT stain, optical and polarized microscopic view.

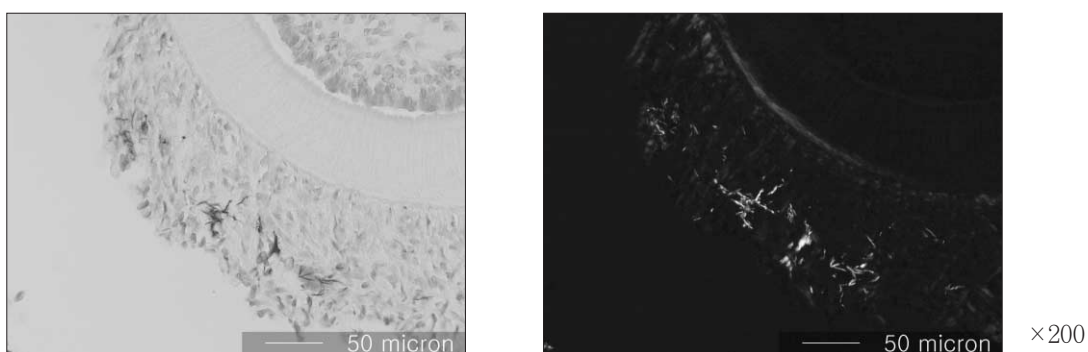


Figure 7. Cryopreservation with 10% DMSO in Viaspan® group with MTT stain, optical and polarized microscopic view.

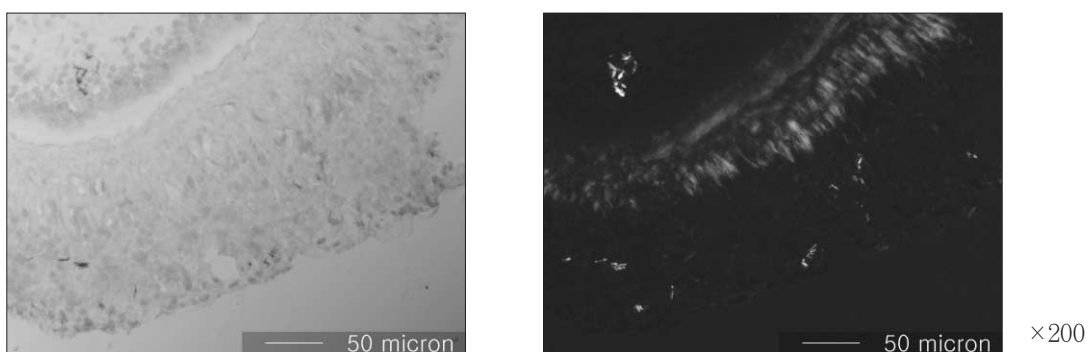


Figure 8. Cold preservation in F medium at 4℃ group with MTT stain, optical and polarized microscopic view.

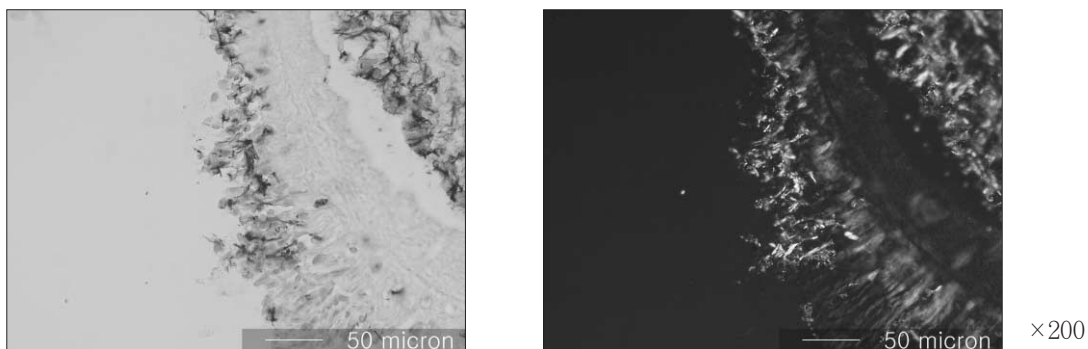


Figure 9. Cold preservation in Viaspan® at 4℃ group with MTT stain, optical and polarized microscopic view.

IV. 고 찰

치아 재식이나 이식 등이 성공하기 위해서는 공여치의 치근면 손상이 적으며 재식 될 때까지의 치주인대세포의 활성도를 유지하여야 한다. 치근면의 손상은 발치시의 술자의 능력과 기구 조작에 따라 달라질 수 있으며 치주인대세포의 활성도를 유지하는 것은 보관법에 따라 달라질 수 있다.

치아의 보관 용액으로는 타액, 식염수, 우유¹⁹⁾, HBSS²⁰⁾를 들 수 있다. 그리고 Kim은²¹⁾ Viaspan®에 냉장보관시에 1주일 보관 시에도 높은 치주인대 활성도를 보였다고 보고하였다. 그러나 장기 보관에는 cold ischemia에 의해 세포가 괴사 또는 사멸할 위험이 있다.

따라서 장기 보관에는 냉동보관을 고려해야 한다. 냉동 보관 시에는 냉동 속도가 중요한데 저속 냉동 시에는 세포내 액이 빠져나감으로써 세포의 수축이 생기며 급속 냉동 시에는 얼음 결정이 세포내에서 형성되어 해동시에 세포가 사멸할 수 있다^{22,23)}. 따라서 적절한 냉동 속도와 동해방지제의 사용이 필요하다.

동해방지제 (cryoprotectant)로는 대표적으로 DMSO를 사용하며 이는 세포질내로 침투하여 냉동 과정 중에 전해질의 농도를 감소하고 삼투압에 의한 세포수축을 감소시켜 세포를 보호하는 역할을 한다²⁴⁾. HES는 세포질의 동해방지제 (extracellular cryoprotectant)로서 DMSO와 함께 사용하여 DMSO의 잠재적인 유해 가능성을 줄일 수 있다. Clapisson 등은²⁵⁾ peripheral blood stem cell (PBSC)의 냉동보존을 위해 3% HES와 5% DMSO를 사용하여 -80℃에서 냉각 후 액체질소에 넣는 방법이 10% DMSO를 이용하여 속도조절냉동기 (rate controlled freezer)를 이용한 것보다 우수한 결과를 보고하였다. Kawasaki 등은²⁶⁾ 5% DMSO와 6% HES에서 rate controlled freezer를 이용하여 쥐 치아를 냉동 보존 하여 복부 피하 결합 조직 내에 이식한 결과 즉시군과 같이 치주조직이 재생됨을 관찰하였다.

HES는 평균분자량이 450,000 g/mol인 합성 전분으로써 세포질의 동해방지제 사용시에 DMSO가 고농도나 장기간의 노출시에 세포독성의 가능성이 있으므로 DMSO의 농도를 낮추기 위해 함께 사용된다²⁷⁾. HES는 세포막을 통과하는 대신에 세포 주위에 점성의 유리질막 (viscous, glassy shell)을 형성함으로써 냉동 과정 중의 물의 이동을 저해시켜 세포 탈수를 막아 세포 손상을 최소화한다²⁸⁾. 본 실험에서는 F medium을 배지로 한 냉동군에서 5% DMSO, 6% HES군과 10% DMSO군에서 통계적인 유의차는 없었다. 그 이유는 HES는 세포 주변에서 막을 형성하여 수분의 이동을 막아주는데 치주인대는 *in vivo*에서 최외각 세포만이 HES의 보호를 받을 뿐 치주인대내의 세포에는 영향을 미칠 수 없었기 때문이라고 생각된다. Viaspan®을 이용하여 냉동 보존한 실험에서는 낮은 치주인대 활성을

나타내었다. 이유는 그것이 장기의 냉장 보관용으로 개발된 용액이기 때문이며 또 한 가지의 가능성으로 생각되는 것은 F medium에 첨가된 FBS을 들 수 있다. 이는 세포의 배양에 있어서 필수적인 것으로 세포 배양에서의 혈청의 역할은 첫째, 세포의 성장과 기능에 관여하는 호르몬을 제공하고, 둘째, 세포의 유착과 확산 인자를 제공하며, 셋째, 호르몬, 중금속, 지질 등의 운반 단백질을 제공하는 역할을 한다. 따라서 Viaspan®을 배지로 한 냉동군에서는 FBS가 없으므로 냉동시에 F medium을 배지로 한 냉동군과 세포 활성도의 차이가 생긴 원인 중의 하나라고 생각된다.

Viaspan®으로 냉동 보존을 하는 경우 Martin 등은²⁹⁾ 쥐 간 조직의 절편을 냉동 보존에 있어서 UW, 50% FCS, 10% DMSO 사용하였으며 그 결과 fresh상태와 냉동 보존한 군에서 MTT 환원의 결과가 유의차가 없었다. 그러나 Lakey 등은³⁰⁾ 개의 이자섬 (pancreatic islets)을 냉동 보존 하면서 FBS없이 UW를 사용하였는데 2M DMSO를 첨가한 군에서는 대조군과 같이 높은 활성도를 나타내었다. 그러나 Lakey의 실험에서는 서서히 냉동시키는 속도 조절 냉동을 하였다. Chesne 등은³¹⁾ 간 세포를 신장 보관용액으로 사용되는 Hepes, PBS and Euro-Collins와 두 가지 culture medium을 FBS없이 속도 조절 냉동 프로그램을 이용하여 냉동하였을 때 장기 보관용액이 culture medium보다 낮은 LDH (lactate dehydrogenase) activity를 보였다. 따라서 본 실험에서는 Viaspan® 냉동군이 낮은 치주인대 활성도를 나타낸 이유로 생각되는 것이 FBS첨가 없이 급속 냉동한 결과이며, F medium을 배지로 사용한 군에서 급속 냉동 시에도 높은 활성도를 나타내는 것은 FBS가 첨가되었기 때문이라고 생각된다.

Mazur는²³⁾ 냉동 속도에 의한 세포의 손상을 "two factor hypothesis"로 설명하였다. 즉 냉동 속도가 지나치게 빠르면 세포내 수분이 빠져나가기 전에 과냉각되면서 형성된 얼음 결정체에 의해 세포가 손상 받게 된다. 만일 냉동 속도가 지나치게 느리면 세포로부터 수분 손실이 많아져서 세포는 위축되고 세포내 용질의 농도가 높아짐에 따라 세포 자체가 쉽게 동결되지 않게 된다. 이렇게 고농도 용질에 노출됨으로써 세포 손상이 일어나게 되는데 이를 용질 효과 (solution effect)라고 한다. 그러므로 이론적으로 가장 좋은 냉동 보존 효과를 얻기 위해서는 세포내 얼음 결정체의 형성을 피할 수 있는 정도로 느리게, 또한 용질 효과를 최소화할 수 있는 정도의 빠른 속도로 냉동하여야 한다. 그러나 이 속도는 세포막을 통한 수분의 이동 능력에 따라 결정된다.

본 실험에서는 치아를 직접 -196℃의 액체 질소통에 넣는 급속 냉동법을 이용하여 냉동 보관하였는데 이때 세포 내에서의 얼음 결정을 방지하지는 못할 것이며 이것이 치주인대 세포에 어느 정도 영향을 미쳤을 것이다.

Viaspan®은 Wisconsin 대학에서 Belzer 등에 의하여

개발되었으며 그 구성성분으로는 Pentafraction 50 g/L, Adenosine 1.34 g/L, Allopurinol 136 mg/L, Glutathione 992 mg/L, Lactobionic acid 35.83 g/L, Raffinose5H₂O 17.83 g/L 등으로 이루어져 있으며 320 mOsm/kg-1 정도의 삼투압과 7.4 정도의 pH를 유지한다. 현재 간장이나 췌장 등 소화기관의 장기 이식시 보관 용액으로 널리 사용되고 있다. Kim은²¹⁾ 쥐 치아를 Viaspan®에서 1주간 냉장 보관한 후 *in vivo* MTT검색법을 이용하여 세포 활성도를 측정하였는데 Viaspan® 냉장군에서 다른 치아 보관용액에 비해 현저하게 높은 결과를 보였다. 냉장 상태에서 보관 기간이 길어질 경우 cold ischemia에 의해서 세포가 괴사되거나 사멸 되는 것으로 알려져 있다³²⁾. 이는 ATP의 부족과 반응성 산소계 (reactive oxygen species: H₂O₂, O₂⁻, OH⁻)의 증가와 arachidonic acid 등으로 인해 lipid peroxidation로 세포막이 변질되기 때문이다³³⁾. 그러나 Viaspan®의 구성 성분 중의 하나인 glutathione은 항산화제로 자유라디칼 (free radical)의 생성을 억제하거나 생성된 free radical을 없애는 기능을 한다. 본 실험에서는 1주일간의 냉장 보관에서는 Viaspan® 냉장군에서 F medium 냉장군에 비해 유의차 있게 높은 세포 활성도를 보였으나 5%, 10% DMSO F medium 냉동군 (Group 1, 2) 보다 낮아 장기 보관하는 데 적합하지 못하다고 생각된다 (Figure 2) ($P < 0.05$).

Shimono는³⁴⁾ 발치시에 남아있는 치근막의 양을 조사하였는데 치근 표면 길이에 대해 치근막이 부착된 길이는 최소 31.5%, 최대 96.5%, 평균 $55.43 \pm 22.60\%$ 이었으며 부착되어 있는 양은 $6.19 \pm 12.87 \text{ mm}^2/\text{mm}$ 이며 부위에 따라 상당한 차이가 있음을 보고하였다. Jeon은³⁵⁾ Hematoxylin Eosin 검색을 이용하여 치주인대세포의 양을 정량적으로 분석할 때 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그러나 Hematoxylin 과 Eosin은 각각 염기성과 산성 염색 염료로서 흡광도도 590 nm, 530 nm³⁶⁾로 서로 다르므로 두 가지 염색을 한 가지 파장으로 분석하는 것보다는 단일 염색, 단일 파장으로 분석하는 것이 타당하다. 따라서 본 실험에서는 Eosin 염색을 통해 발거된 치아의 치주인대 양을 정량적으로 표현 하였다.

냉동절편을 이용한 광학현미경과 편광현미경의 관찰에 있어서 formazan결정이 편광현미경에서 밝은 자주색의 결정으로 나타난다. 이를 이용하여 Colangelo 등은¹⁷⁾ pixel image analysis를 시행한바있다. 그러므로 본 실험에서도 냉동절편에서의 formazan 결정의 정량적인 분석이 컴퓨터 이미지 분석을 이용해 가능할 수도 있다.

최근에 Kawata는^{37,38)} 미소자장을 이용하여 치아를 냉동시키는 법을 개발하였으며 앞으로 치아의 냉동보존은 건전한 치주인대를 유지하며 자연치와 같은 저작기능을 회복하는데 더 많은 기여를 할 것으로 기대되어진다.

V. 결 론

냉장보관과 냉동보관을 통해 치아를 보관한 후 *in vivo* MTT 검색법을 이용하여 치주인대세포의 활성도를 측정하여 다음의 결과를 얻었다. 급속냉동시에는 F medium을 배지로 사용한 5% DMSO 6% HES 함유군과 10% DMSO 함유군에서 Viaspan®냉동군 비해 높은 MTT 흡광도 수치를 나타내었다 ($p < 0.05$).

F medium, Viaspan® 냉장군은 DMSO를 첨가한 F medium 냉동군보다 낮은 MTT 흡광도 수치를 나타냈다 ($P < 0.05$).

제1, 2 대구치 치근면 치주조직의 정량적 측정을 위해 Eosin 염색을 시행하였을 때 제1대구치 ($P = 0.1701$)와 제2대구치 ($P = 0.3404$)에서 각각 군 간의 Eosin 흡광도에서 통계적인 유의차가 없었으며 MTT/ Eosin 흡광도비에서도 MTT흡광도 수치와 같은 양상을 나타내었다.

냉동 절편의 조직현미경적 관찰에서 formazan crystal은 광학현미경하에서 파란색으로, 편광현미경에서는 밝은 오렌지색으로 나타났으며 전체적인 양상은 MTT흡광도 수치와 비례 하였다.

본 연구의 범위 안에서, 치아를 1 주일 이상 장기 보관 할 때 4℃ 냉장보관 보다는 냉동보관이 좋은 것으로 판단되었고 Viaspan®배지보다는 F medium 배지를 사용하는 것이 좋을 것으로 사료된다. 차후 냉동의 조건을 더욱 면밀하게 부여할 수 있는 programmed freezing에 대한 프로토콜의 개발이 필요할 것으로 사료된다. 또한, 조직현미경 하에서 치주인대의 세포활성도 평가를 위해 formazan crystal을 현미경 하에서 객관적으로 정량화 할 수 있는 방법의 개발이 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Andreasen JO, Kristerson L. The effect of limited drying or removal of the periodontal ligament. Periodontal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Acta Odontol Scand* 39(1):1-13, 1981.
2. Schwartz O, Andreasen JO. Cryopreservation of mature teeth before replantation in monkeys (I). Effect of different cryoprotective agents and freezing devices. *Int J Oral Surg* 12(6):425-436, 1983.
3. 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.
4. Schwartz O. Cryopreservation as long-term storage of teeth for transplantation or replantation. *Int J Oral Maxillofac Surg* 15(1):30-32, 1986.
5. Pegg DE. The history and principles of cryopreservation. *Semin Reprod Med* 20(1):5-13, 2002.
6. Neulieb RL, Neulieb MK. The diverse actions of

- dimethyl sulphoxide: an indicator of membrane transport activity. *Cytobios* 63(254-255):139-165, 1990.
7. Katayama Y, Yano T, Bessho A, Deguchi S, Sunami K, Mahmut N. The effects of a simplified method for cryopreservation and thawing procedures on peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant* 19(3):283-287, 1997.
8. Schwartz O. Cryopreservation of teeth before replantation or transplantation. Atlas of replantation and transplantation of teeth, Mediglobe, p.241-256, 1992.
9. Schwartz O, Rank CP. Autotransplantation of cryopreserved tooth in connection with orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 90(1):67-72, 1986.
10. Hupp JG, Mesaros SV, Aukhil I, Trope M. Periodontal ligament vitality and histologic healing of teeth stored for extended periods before transplantation. *Endod Dent Traumatol* 14(2):79-83, 1998.
11. Lekic PC, Kenny DJ, Barrett EJ. The influence of storage conditions on the clonogenic capacity of periodontal ligament cells: implications for tooth replantation. *Int Endod J* 31(2):137-140, 1998.
12. Ashkenazi M, Sarnat H, Keila S. *In vitro* viability, mitogenicity and clonogenic capacity of periodontal ligament cells after storage in six different media. *Endod Dent Traumatol* 15(4):149-156, 1999.
13. Hupp JG, Trope M, Mesaros SV, Aukhil I. Tritiated thymidine uptake in periodontal ligament cells of dogs' teeth stored in various media for extended time periods. *Endod Dent Traumatol* 13(5):223-237, 1997.
14. Ashkenazi M, Marouni M, Sarnat H. *In vitro* viability, mitogenicity and clonogenic capacity of periodontal ligament cells after storage in four media at room temperature. *Endod Dent Traumatol* 16(2):63-70, 2000.
15. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2):55-63, 1983.
16. Shimoyama Y, Kubota T, Watanabe M, Ishibiki K, Abe O. Predictability of *in vivo* chemosensitivity by *in vitro* MTT assay with reference to the clonogenic assay. *J Surg Oncol* 41(1):12-18, 1989.
17. Colangelo D, Guo HY, Connors KM, Silvestro L, Hoffman RM. Noncolorimetric measurement of cell activity in three-dimensional histoculture using the tetrazolium dye 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide: the pixel image analysis of formazan crystals. *Anal Biochem* 205(1):8-13, 1992.
18. Colangelo D, Guo HY, Connors KM, Kubota T, Silvestro L, Hoffman RM. Correlation of drug response in human tumors histocultured *in vitro* with an image-analysis MTT end point and *in vivo* xenografted in nude mice. *Anticancer Res* 12(5):1373-1376, 1992.
19. Blomlof L, Otteskog P, Hammarstrom L. Effect of storage in media with different ion strengths and osmolalities on human periodontal ligament cells. *Scand J Dent Res* 89(2):180-187, 1981.
20. Trope M, Friedman S. Periodontal healing of replanted dog teeth stored in Viaspan, milk and Hank's balanced salt solution. *Endod Dent Traumatol* 8(5):183-188, 1992.
21. Kim ES. Evaluation of periodontal ligament cell viability in rat teeth using MTT assay. [PhD thesis]. Yonsei University, 2003.
22. Andreasen J. Atlas of replantation & transplantation of teeth. Mediglobe SA, p242-256, 1992.
23. 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.
24. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247(3 Pt 1):C125-142, 1984.
25. Clapisson G, Salinas C, Malacher P, Michallet M, Philip I, Philip T. Cryopreservation with hydroxyethylstarch (HES) + dimethylsulfoxide (DMSO) gives better results than DMSO alone. *Bull Cancer* 91(4):E97-102, 2004.
26. 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.
27. Rowley SD, Anderson GL. Effect of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells. *Bone Marrow Transplant* 11(5):389-393, 1993.
28. Takahashi T, Hirsh A, Erbe E, Williams RJ. Mechanism of cryoprotection by extracellular polymeric solutes. *Biophys J* 54(3):509-518, 1988.
29. Martin H, Bournique B, Sarsat JP, Albaladejo V, Lerche-Langrand C. Cryopreserved rat liver slices: a critical evaluation of cell viability, histological integrity, and drug-metabolizing enzymes. *Cryobiology* 41(2):135-144, 2000.
30. Lakey JR, Rajotte RV, Fedorow CA, Taylor MJ. Islet cryopreservation using intracellular preservation solutions. *Cell Transplant* 10(7):583-589, 2001.
31. Chesne C, Guillouzo A. Cryopreservation of isolated rat hepatocytes: a critical evaluation of freezing and thawing conditions. *Cryobiology* 25(4):323-330, 1988.
32. Fischer S, Maclean AA, Liu M, Cardella JA, Slutsky AS, Suga M. 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):1932-1939, 2000.
33. Meng Q. Hypothermic preservation of hepatocytes. *Biotechnol Prog* 19(4):1118-1127, 2003.
34. Shimono M, Lijima K. Pathology of Wound Healing <Clinical Aspect> Transplantation and Replantation of Teeth -Practical Use of Periodontal Ligament-. Korean Edition ed: Ishiyaku Publishers, Inc; 1995.
35. Jeon IS. Evaluation of periodontal ligament cell viability in rat teeth according to various extra-oral dry time using MTT assay and a histologic verification [PhD. thesis] Yonsei university, 2004.
36. Green FJ. Sigma-Aldrich Handbook of Stains, Dyes and Indicators: Sigma-aldrich, 1990.
37. Kawata T. Tooth transplantation by teeth bank-approach to human-. Hiroshima, Department of Orthodontics, Hiroshima University School of Dentistry, 2005.
38. Kawata T. Transplantation tooth from bank. Hiroshima, Department of Orthodontics, Hiroshima University School of Dentistry, 2005.

국문초록

금속 냉동된 쥐 치아의 *in vivo* MTT 검색법을 이용한 치주인대세포 활성화 평가

김재욱 · 김의성 · 김 진 · 이승종*

연세대학교 치과대학 치과보존학교실

본 연구의 목적은 흰쥐 상악 대구치를 발거 한 후 금속 냉동보존을 통해 치아를 보관하였을 때 *in vivo* MTT 검색법을 이용하여 치주인대세포의 활성도를 측정하고자 하였다.

실험 방법은 74마리 4주령의 암컷 Sprague-Dawley계의 흰쥐를 사용하여 각군당 10마리의 쥐에서 상악 좌우 제1, 2 대구치를 발거하여 모두 40개의 치아를 사용하였다. 대조군은 즉시 발치군이며 냉동군은 F medium에 5% Dimethylsulfoxide (DMSO) 6% Hydroxyethyl starch (HES)를 포함한 군 (1군), 10% DMSO를 포함한 군 (2군) 그리고 Viaspan®에 5% DMSO 6% HES (3군), 10% DMSO를 포함한 군 (4군)으로 나누어 1주일간 액체질소에 냉동한 뒤 해동하였다. 냉장군은 F medium (5군)와 Viaspan® (6군)에 넣어 1주간 4℃ 냉장고에서 보관하였다. 냉동 및 냉장보존한 후에는 *in vivo* MTT 검색법을 시행하였다. 개개 치아의 치근면 단위면적으로 표준화하기 위해 치근을 1% eosin Y 용액에 12시간 담근 후 1% acid alcohol로 용해시켜 530 nm에서 측정한 흡광도 값을 *in vivo* MTT 측정값으로 나누었다. 통계 분석을 위해 Two way ANOVA와 Duncan's Multiple Range Test를 95% 신뢰 구간에서 시행하였다. 그리고 각 군당 2개의 치아를 같은 방법으로 처리한 후 10 µm 두께로 냉동 절단하여 광학 현미경과 편광 현미경하에서 관찰하였다.

1, 2군은 3, 4군보다 높은 흡광도를 나타내었으며 6군은 5군보다 높은 흡광도를 나타내었다 ($p < 0.05$). 광학 현미경 관찰에서 MTT 결정은 파란색을, 편광현미경에서는 밝은 오렌지색을 나타내었고 전체적으로 *in vivo* MTT 검색법의 결과와 같은 양상을 나타내었다.

본 연구의 결과 5%, 10% DMSO를 사용한 F medium 배지로 냉동보존한 경우가 Viaspan®을 배지로 냉동하였을 때나 냉장보존 하였을 때보다 통계적으로 유의차 있게 높은 세포 활성도를 나타내었다 ($p < 0.05$).

주요어: 치주인대세포, 활성화, MTT 검색법, 냉동보존, 냉장보존, 흡광도