

구강 외 노출시간에 따른 흰쥐 치아 치주인대세포 활성도의 MTT 검색법을 이용한 평가

전인수¹ · 김의성¹ · 김 진^{1,2} · 이승종^{1,2*}

¹연세대학교 치과대학 치과보존학교실, ²구강종양연구소, ³구강과학연구소

ABSTRACT

EVALUATION OF PERIODONTAL LIGAMENT CELL VIABILITY IN RAT TEETH ACCORDING TO VARIOUS EXTRA-ORAL DRY STORAGE TIMES USING MTT ASSAY

In-Soo Jeon¹, Eui-Seong Kim¹, Jin Kim^{1,2}, Seung-Jong Lee^{1,2*}

¹Department of Conservative Dentistry, ²Oral Cancer Research Institute,

³Oral Science Research Center, College of Dentistry, Yonsei University, Seoul, Korea

The purpose of this study was to verify the usefulness of MTT analysis as a tool of measurement of the periodontal ligament cell viability from the extracted rat molar.

A total of 80 Sprague-Dawley white female rat of 4 week-old with a body weight of 100 grams were used. The maxillary left and right, first and second molars were extracted under Ketamine anesthesia. Twenty-four teeth of each group (divided as five groups depending upon the time-lapse after extraction such as immediate, 10, 20, 40 and 60 minutes) were immersed in 200 μ l of MTT solution (0.5 mg/ml) and processed for optical density measurements. Another 10 teeth of each group were treated as same as above and sectioned at 10 μ m for microscopic examination.

All measurements values were divided by the value of hematoxylin-eosin staining which represented the volume of each corresponding samples. Immediate and 10 minute groups showed highest MTT values followed by 20, 40, and 60 minutes consecutively. Statistical significance ($p < 0.05$) existed between all groups except in immediate versus 10 minute groups and 40 versus 60 minutes. Histological findings also showed similar findings with MTT results in crystal shape and crystal numbers between the experimental groups.

These data indicate that *in vivo* MTT analysis may be of value for evaluation of the periodontal ligament cell viability without time-consuming cell culturing processes. [J Kor Acad Cons Dent 31(5):398-409, 2006]

Key words: Periodontal ligament cell, Viability, MTT analysis, Preservation

- Received 2006.6.26., revised 2006.8.9., accepted 2006.9.11.

I. 서 론

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

Department of Conservative Dentistry,
College of Dentistry, Yonsei University
134 Shinchon-Dong, Seodaemun-Ku, Seoul, 120-752, Korea
Tel: 82-2-2228-8700 Fax: 82-2-313-7575,
E-mail: sjlee@yumc.yonsei.ac.kr

치아 재식술은 외상을 받아 완전 탈구된 경우나 해부학적 인 복잡성으로 통법의 치근단 수술이 불가능한 경우에 이용 되는 술식이고 치아 이식술은 공여치아가 존재하는 경우에 이를 치아 결손부위에 이식함으로써 결손부위를 회복 하는

※ 본 연구는 2006년도 보건 의료기술지원사업(A040063)일부지원에 의해 이루어졌음.

데 시행되는 치료법이다¹⁾. 이러한 술식들이 성공하기 위해서는 치아 발거나 탈구시 치주조직의 손상 정도와 발거된 치아의 치근면상에 존재하는 치주인대세포의 건전성 및 활성도가 치료의 성패를 좌우하는 중요한 요인으로 작용하게 된다²⁾.

이러한 치주인대세포의 활성도를 실험적으로 평가하기 위해 여러 가지 방법이 제시되었다. Patil 등은³⁾ 탈구된 치아의 치주인대 세포 활성도를 평가하는데 fluorescein diacetate를 이용하여 염색한 후 광학 현미경과 혈구 계산판(hemocytometer)으로 직접 세어 활성도를 측정하였다. Hupp 등은⁴⁾ 탈구된 치아의 잠재적인 치유 능력을 보다 명확히 밝혀내기 위해 세포의 표식자로서 radioactive DNA precursor인 H^3 thymidine을 치주인대세포에 부착시킨 후 치아를 탈회시켜 시편을 관찰하여 활성도를 평가하였다. Lekic 등도⁵⁾ 교정치료 목적으로 발치된 소구치의 치근면에서 치주인대세포를 채취하여 배양시켜 하나의 세포에서 형성된 군집(colony)을 methylene blue 등으로 염색하여 그 군집의 숫자를 세어 활성도를 평가하였다. 그리고 Ashkenazi 등은⁶⁾ trypsin과 collagenase를 이용하여 치근 표면으로 부터 직접 치주인대세포를 채취하고 배양시켜 이를 다양한 저장 용액에 보관한 후 neutral red나 trypan blue 등으로 염색하여 치주인대 세포 활성도를 평가하였다.

그러나 이러한 모든 방법은 세포의 채취 과정에서 치근면의 모든 세포가 채취된다는 뚜렷한 증거가 없으며 또한 세포가 비록 살아 있다 하더라도 그 수의 약 70%만이 세포 분열능력이 있어 실제 살아있는 치주 조직의 치유능력과 차이가 있을 수 있다⁴⁾. 또한 이러한 방법들은 치근면에서 채취된 세포를 배양한 것이므로 원래 채취된 세포와는 다른 많은 변수가 작용할 수 있다.

Tetrazolium-based colorimetric (MTT) 검색법은 많은 시료를 간단히 빠르고 객관성 높게 판독할 수 있어 배양된 세포에서 세포 독성에 관한 연구에 주로 사용된 이 방법은 대사 과정이 온전한 세포의 미토콘드리아 내에 탈수소효소가 노란색 수용성 tetrazoliumsalt[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT)를 비수용성의 자주색 MTT formazan결정으로 환원시키는 원리를 이용한 것으로 적절한 과장에서 microplate reader로 흡광도를 측정함으로써 대사적으로 왕성한 세포의 농도를 반영하게 되며 주로 in-vitro 실험에 사용되어져 왔는데 만일 in-vivo 실험에서 치주인대의 활성도를 측정하는데 이용할 수 있다면 기존의 세포배양을 통한 실험보다는 훨씬 더 정확한 결과를 기대할 수 있을 것이다⁷⁾.

Kim 등은⁸⁾ 다양한 보관용액에서 시간 변화에 따른 치근면의 치주인대세포 활성도 평가에서 MTT 측정치 결과와 조직학적 관찰 결과가 상당히 일치됨을 발견하고 MTT 검

색법이 치주인대세포 활성도 평가에 유용한 한 방법이 될 수 있음을 보고하였다.

이에 본 연구는 지금까지의 실험 결과를 토대로 MTT 검색법을 이용하여 흰쥐 상악 대구치를 발거 후 짧은 시간(즉시, 10분, 20분, 40분, 60분)동안 실온에 노출시킨 다음 치아를 MTT용액에 저장 후 치근면의 치주인대 세포 활성도를 microplate reader (BIO-RAD, AC, USA)로 흡광도(Optical Density)를 측정함과 동시에 이를 냉동 절단법을 이용한 조직학적인 관찰 결과를 토대로 치주인대세포의 활성도 평가에 이용되는 MTT검색법의 유용성을 검증하고자 하였다.

Ⅱ. 실험재료 및 방법

1. 실험동물의 전 처치

생후 4주된 건강하고 평균 체중 100 gm 내외의 암컷 Sprague-Dawley계 흰쥐 80마리를 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 (0.1 ml/100 g) 마취 하에 접근이 가장 용이한 좌, 우측 상악 제 1, 2 대구치를 모두 발거하였다. 이들 치아를 MTT 검색법과 냉동 절단법을 이용한 조직학적 관찰에 모두 사용하였다. 날카로운 탐침으로 peritomy를 시행한 후 일관성 있는 결과를 얻기 위해 치아 주위 조직에 최소한의 외상을 가하면서 발거를 시행했으며 이때 발치와 주변의 출혈은 면봉으로 조절하고 발치 후에는 파절된 부위가 없는지 현미경 하에서 모든 치근의 건전성을 확인하였다.

2. 실험군 분류

구강 외 노출시간에 따라 5개 군으로 분류되었다.

즉시 처치군 (대조군): 치아 발거 후 즉시 MTT용액에 보관하였다.

1군 (10분 건조군): 치아 발거 후 실온에서 10분간 건조(bench dry)시킨 후 MTT용액에 보관하였다.

2군 (20분 건조군): 치아 발거 후 실온에서 20분간 건조(bench dry)시킨 후 MTT용액에 보관하였다.

3군 (40분 건조군): 치아 발거 후 실온에서 40분간 건조(bench dry)시킨 후 MTT용액에 보관하였다.

4군 (60분 건조군): 치아 발거 후 실온에서 60분간 건조(bench dry)시킨 후 MTT용액에 보관하였다.

3. MTT 검색

96-well plate에 MTT 용액 (0.05 mg/ml, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 200 μ l 를 넣고 각 군당 제1, 2대구치 각각 12개 치아를 MTT 용액이 있는 각 well에 담았다. 이때 혈액 내의 혈구세포 개재 가능성을 최소화하기 위하여 식염수로 치근면을 깨끗이 세척 하였다. 그 후 알루미늄 foil로 96-well plate를 싸서 3시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양하여 MTT가 환원되도록 했다. 배양 후 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 150 μ l를 첨가하여 형성된 MTT formazan 결정이 녹도록 15분간 가볍게 진탕 한 후 각 well에서 치아를 제거한 후 microplate reader (BIO-RAD, AC, USA) 로 570 nm 파장에서 흡광도 (Optical Density)를 측정하였다.

4. 냉동 절단법을 이용한 조직학적 관찰

각 군당 상악 제 1, 2 대구치 각각 10개 치아를 발거한 후 MTT 검색에서와 같이 치아를 MTT용액이 있는 각 well에 담근 후 알루미늄 foil로 96-well plate를 싸서 3시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양해서 MTT가 환원되도록 했다. 그 후 각 well에서 치아를 제거한 후 Tissue-Tek O.C.T (Optimal Cutting Temperature) Compound[®] (Co. Sakura made in USA)로 포매한 후 -20 $^{\circ}$ C에서 냉동 시킨 다음 formazan결정의 광학 현미경 관찰을 위해 즉시 10 μ m 두께로 냉동절단 (LEICA[®] CM3050 S Germany) 하여 표본을 제작하였으며 일부는 현미경 관찰시 주위조직과의 형태를 보여주기 위한 대조염색으로 Nuclear Fast Red 시액을 이용하여 염색하였다. 현미경상에서 보이는 치근면상의 특징적인 MTT formazan 결정의 형태 및 분포 차이를 광학현미경 하에서 (\times 50, 100, 200, 400, 1000) 관찰한 후 현미경과 연결시킨 디지털 카메라 (LEICA[®] DC 300F)로 대표적 부위를 촬영하였다.

5. 치아 치근면에 붙어있는 치주조직의 양 측정 및 현미경 관찰

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 다시 위치시키고 Hematoxylin 350 μ l을 넣고 10분간 염색한 후 흐르는 물에 1분 정도 수세한 후 다시 eosin용액 350 μ l을 넣고 10분간 염색한 다음 95% ethanol에 30초간 탈수시킨다. 그 후 염색된 치아를 새로운 well에 다시 놓고 치아의 탈회 없이 염색된 치주조직 부위를 깨끗이 탈

색시키기 위해 치아에 1% acid alcohol 350 μ l를 넣고 1시간 동안 담가두었다. 그 후 치아를 각각의 96-well plate에서 꺼낸 다음 탈색되어 염색된 well내의 용액을 microplate reader (BIO-RAD, AC, USA)로 450 nm 파장에서 흡광도를 측정함으로써 간접적으로 치아에 붙어있는 치주조직의 양을 정량적으로 측정하였다.

또한 현미경 관찰을 위해 동일한 염색 방법인 Hematoxylin-eosin으로 10분 동안 염색한 후 Tissue-Tek O.C.T Compound[®]로 포매한 후 -20 $^{\circ}$ C에서 냉동 절단하여 10 μ m 두께로 시편을 만들어 염색된 치주조직을 광학 현미경으로 관찰하였다.

6. 실험자료 분석

MTT 및 Hematoxylin-Eosin 검색법 에서 얻은 흡광도 (OD)는 one-way ANOVA로 분석하였으며, 군 간의 비교는 Tukey's Studentized Range(HSD) Test 방법을 사용하였다. 그리고 각 군 간의 통계분석법은 95% 신뢰 수준이다.

III. 실험결과

1. MTT 검색에 의한 흡광도 측정

MTT 검색에 의한 흡광도 (OD)값은 대조군 (2.694)과 1군 (2.872) 사이를 제외하곤 시간이 흐를수록 감소된 값을 보였는데 건조 시간이 20분 (2.210) 경과 후부터 감소 폭이 증가 하다가 특히, 3군 (1.310)과 4군 (0.970)에서는 급격한 감소를 보였다. MTT 검색에 의한 흡광도 (OD)값이 대조군 (2.694)과 1군 (2.872) 사이에는 통계학적인 유의차가 없었다 ($p < 0.05$). 그러나, 대조군 (2.694) 및 1군 (2.872)은 2군 (2.210), 3군 (1.310) 및 4군 (0.970)과 비교시 통계학적인 유의차를 보였다 ($p < 0.05$). 또한 2군 (2.210)도 3군 (1.310) 및 4군 (0.970)과의 비교에서 각각 통계학적인 유의차를 보였다 ($p < 0.05$). 하지만 3군 (1.310)과 4군 (0.970) 사이에는 통계학적인 유의차를 보이지 않았다 ($p < 0.05$, Figure 1 - 3).

2. 치근면 치주조직의 정량적 측정을 위한 Hematoxylin-Eosin 염색의 흡광도 측정

실험에 사용된 상악 제 1 대구치의 Hematoxylin-Eosin 염색에 의한 흡광도 (OD)의 평균 측정값은 1.067이었고 상악 제 2 대구치는 0.790이었다. 치근의 수나 지름에 있어 상대적으로 큰 상악 제 1 대구치가 제 2 대구치에 비해 더 큰 흡광도 (OD) 값을 보였다. 그러나 동일 치아 부위의 각

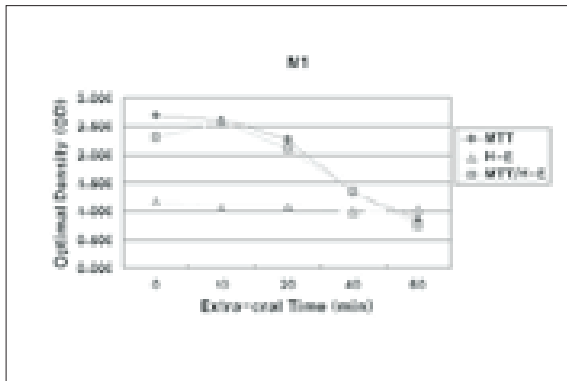


Figure 1. Optical density of MTT and H-E staining following different extra-oral time (min) in Maxillary 1st molar.

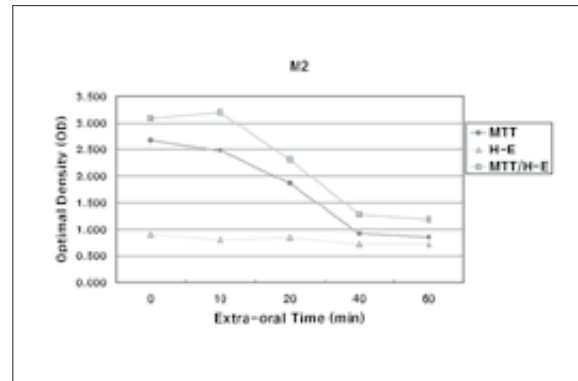
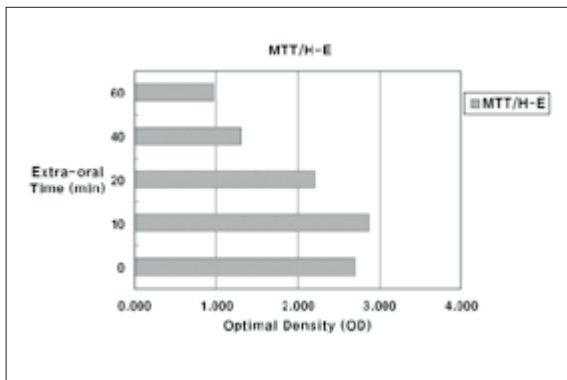


Figure 2. Optical density of MTT and H-E staining following different extra-oral time (min) in Maxillary 2nd molar.



1, 2 & 3: 1, 2 & 3: Tukey's Studentized Range (HSD) Test : Alpha 0.05

Figure 3. Statistical significance from Optical density of MTT and H-E staining following different extra-oral time (min) in Maxillary 1st plus 2nd molar.

군 (대조군, 1 - 4군)간에 평균 흡광도 (OD) 값은 약간의 차이는 있었으나, 통계학적인 유의차는 보이지 않았다 ($p < 0.05$).

3. MTT Crystal의 조직학적 관찰

가. 즉시 처치군의 serial section된 치아에서 치근단에서 치경부로의 MTT 염색의 변화 양상

: 치근단에서 치경부로 갈수록 치주인대 부위의 MTT 염색의 정도는 거의 변화가 없었으나, 치수내에서는 조금 다른 양상을 보였다. 치근단 부위에서는 치주인대 부위 조직에서와 거의 비슷한 정도의 MTT 염색 정

도를 보였으나 치경부로 갈수록 MTT 염색이 약해지는 모습을 보였다 (Figure 4).

나. 60분 건조군의 serial section된 치아에서 치근단에서 치경부로의 MTT 염색의 변화 양상

: MTT 염색에 의한 crystal은 치주인대조직 내에서는 극히 일부에서만 관찰되었고 치수 내에서도 별 차이 없이 비슷한 양상을 보였다 (Figure 5).

다. 시간경과 (0, 10, 20, 40, 60분)에 따라 환원된 MTT crystal 결정체 수 및 모양 비교

: 시간경과에 따라 crystal의 모양과 분포 및 수에서 확연히 구별되는 특징적인 양상을 보여주었다. 즉시 (Figure 6) 및 10분 건조 군 (Figure 7)에서는 가시 모양의 crystal이 전 치주인대부위 조직과 치수내에 밀도 높게 골고루 폭넓게 퍼져 있었으며 치수내가 상대적으로 약간 더 높은 밀도의 분포 양상을 보였다. 그리고 20분 이상 건조 군 (Figure 8 - 10)에서 부터는 치주인대 부위의 crystal 결정체 수는 급격히 감소하는 양상을 보였고 치수 내도 약간의 차이는 있으나 치주인대 부위와 비슷한 양상을 보였다. 또한 crystal 결정체 모양도 시간이 경과될수록 crystal이 극히 한정된 몇 군데 부위에 cluster처럼 뭉쳐져 있는 양상을 보였다. 즉시 처치 군에서 MTT 염색에 의한 crystal 결정체를 저배율 ($\times 100$)에서 고배율 ($\times 1000$)로 연속 관찰시 특징적으로 많은 가시 같은 형태의 crystal이 나선 형태로 전 치주인대부위 조직과 치수 내에서 골고루 산재해 있는 모습을 관찰할 수 있었다. 전체적인 crystal의 분포를 살펴보면 치주인대 내에서 치근면에 인접한 부위와 치조골에 인접한 부위가 중간부위

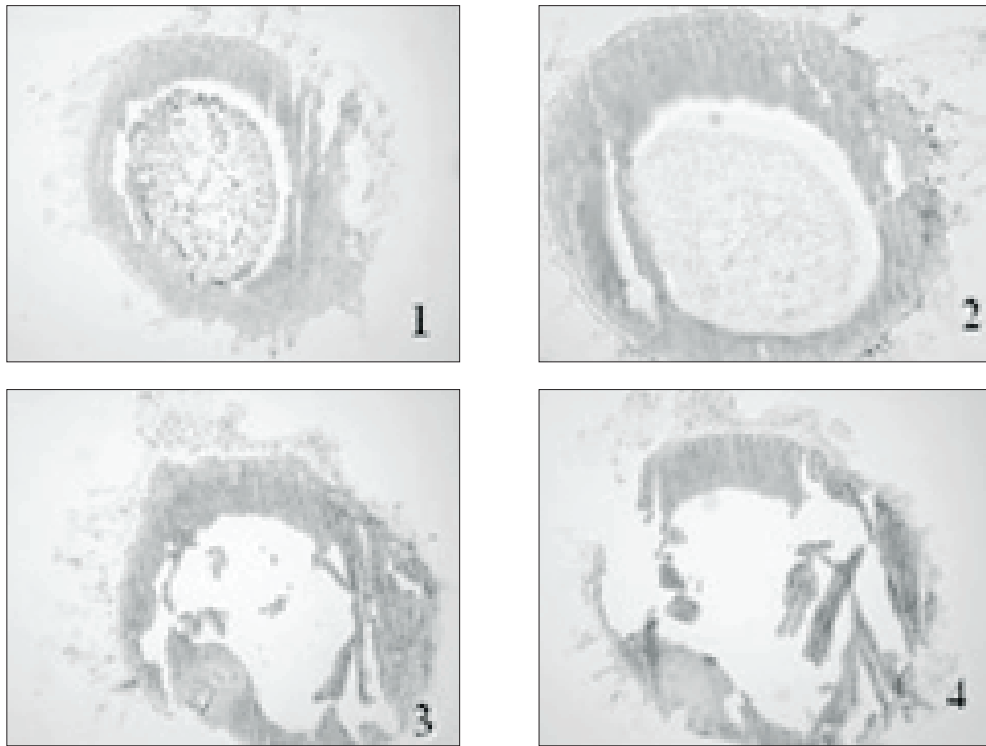


Figure 4. Serial section view from apex to cervical portion in the immediate group ($\times 100$).

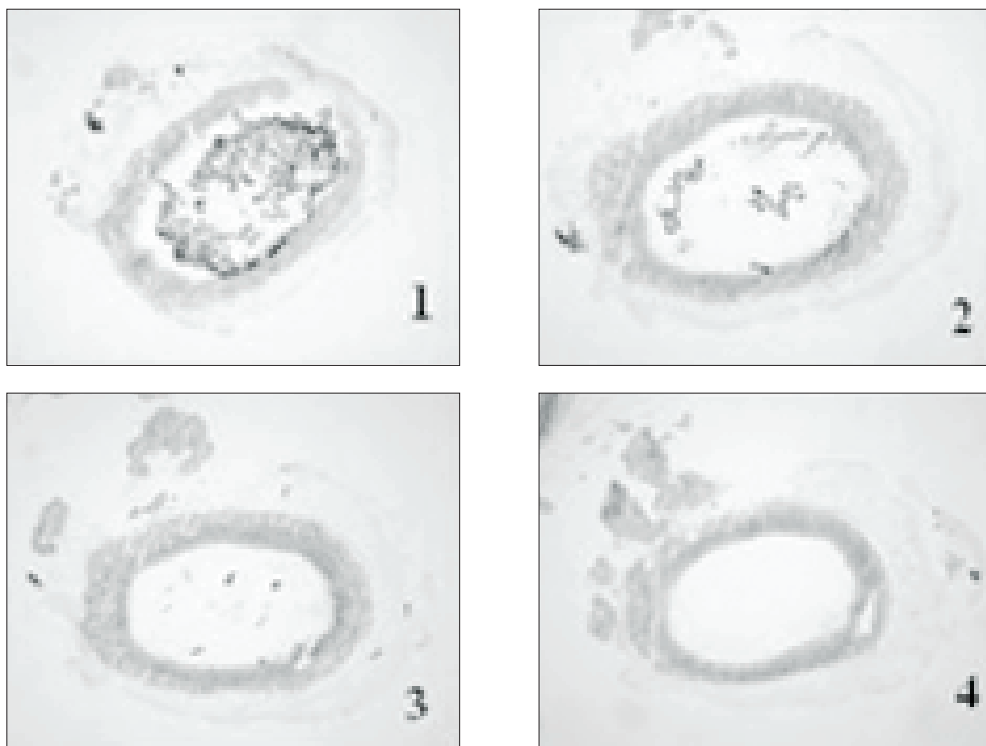


Figure 5. Serial section view from apex to cervical portion in the 60 minute time - lapse group ($\times 100$).

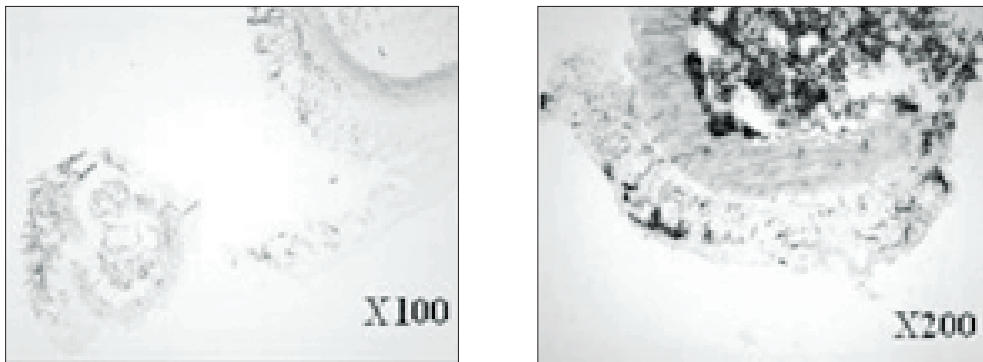


Figure 6. Representative view after MTT staining in the immediate group.

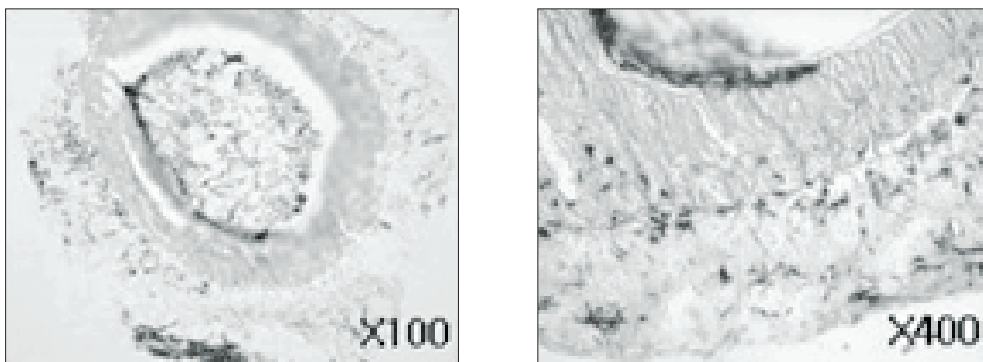


Figure 7. Representative view after MTT staining in the 10 minute time - lapse group.

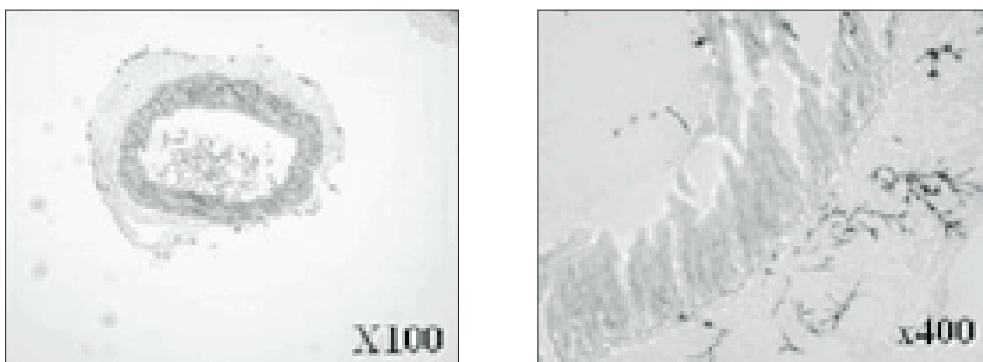


Figure 8. Representative view after MTT staining in the 20 minute time - lapse group.

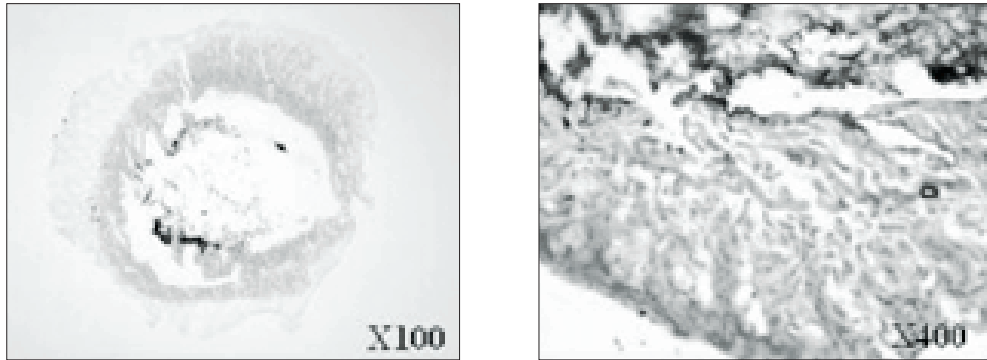


Figure 9. Representative view after MTT staining in the 40 minute time - lapse group.

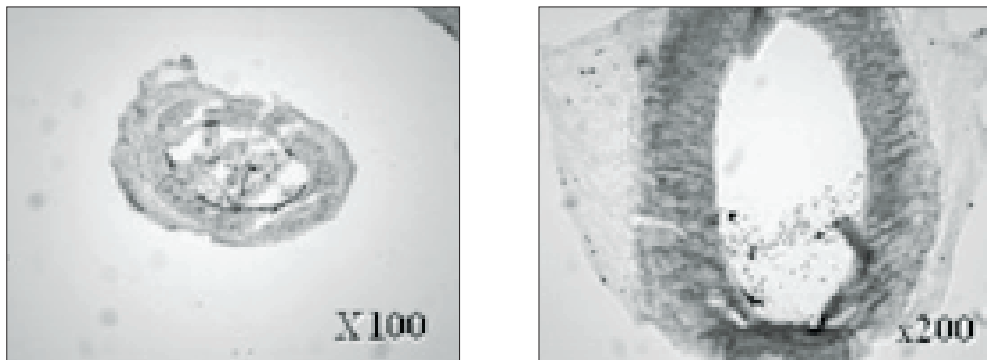


Figure 10. Representative view after MTT staining in the 60 minute time - lapse group.

보다 좀 더 높은 밀도의 crystal 분포를 보였다. 즉시 및 10분 처치 군에서 대조염색 (Nuclear Fast Red) 으로 염색 후 관찰한 일부 시편에서 치근단 1/3정도의 세포성 백악질로 추정되는 부위에서 특징적인 백악질 세포와 백악질모세포를 명확히 관찰할 수 있었다.

4. Hematoxylin-Eosin으로 염색된 치근면 치주조직의 현미경 관찰

: 실험에 사용된 거의 모든 치아에서 치근주위에 어느 정도 균일한 두께의 치주인대 조직을 관찰할 수 있었으며 치아에 붙어있는 치주조직 양의 현미경 비교 관찰에서 모든 군의 치아에서 비슷한 정도의 치주조직 양을 관찰할 수 있었다.

IV. 고 찰

탈구된 치아의 재식시 치주인대의 생활력은 장기간의 성공을 결정하는 가장 중요한 요소이다²⁾. 따라서 치아가 구강

외에 노출된 건조 시간에 따라 치주인대 조직의 세포에 얼마만큼의 손상이 일어날 수 있는지를 이해하는 것은 외상을 받은 치아의 치료계획을 설정하는데 중요한 고려사항이 될 수 있다.

그러므로 이번 실험의 주요 목적은 발거 후 실온의 상태에서 구강 외 노출시간의 차이에 따른 쥐 치아 치근면의 치주인대세포의 활성도를 MTT 검색법을 이용하여 측정하고 동시에 실제로 건조된 시간 변화에 따라 MTT로 염색된 치아의 치근을 냉동 절단법을 이용해서 절단한 후 현미경으로 관찰함으로써 MTT 검색법에 의한 측정치가 실제 치근면의 치주인대세포 활성도 평가에 얼마나 높은 정확성을 갖는지 여부를 검증하기 위해 진행 하였다.

이번 실험의 결과는 MTT 검색법으로 측정한 값과 실제로 냉동 절단법을 이용해서 절단한 치근면의 관찰 결과를 비교하였을 때 상당히 밀접한 상관관계가 있음을 보임으로써 이 방법이 치주인대세포의 활성도 평가에 충분히 사용될 수 있음을 입증해주었다.

기존의 치근막 손상 연구는 치주조직 재생에 중요한 조섬유세포의 다양한 특성을 밝혀내기 위해서 다양한 *in vivo*

및 *in vitro* 모델을 사용하였다⁹⁾. 그러나, Narayanan과 Page는¹⁰⁾ 충분히 많은 수의 세포를 얻기 위한 반복적인 계대배양은 인위적 가능성과 연구자의 세포 선택적 효과를 증가시킨다고 발표하였다. McCulloch와 Knowles는¹¹⁾ 실제로 중요한 형질과 성장능력의 변화가 여러 번의 반복적인 배양으로 인해 선택된 세포 집단에서 일어날 가능성이 있으므로 원래 채취한 세포 (original cell) 집단의 특성을 그대로 반영시키지 못하는 문제점이 있을 수 있다고 보고하였다.

이번 실험의 MTT 검색 결과를 살펴보면 20분 건조군 (2.210)은 즉시 처치군 (2.694)과 10분 건조군 (2.872)과의 비교에서 통계학적인 유의차가 있음을 보였는데, 그것은 Lindskog와 Blomlof가¹⁴⁾ 건조 보관의 임계시간 (critical time)은 18 - 30분 사이인 것처럼 보이며 그 후로는 치근 흡수에 있어 현저한 증가를 보인다는 결과와 일치하였다.

Andersson은¹⁵⁾ 장기간의 follow-up 연구에서 외상 후 15분 내에 재식된 사람의 21개 치아를 평균 5년에 걸쳐 방사선 상으로 관찰하였는데 7개는 관찰기간동안 어떤 흡수도 보이지 않았으며 8개는 얇은 흡수와를 보였으며 6개는 시간이 흐름에 따라 미약한 진행성 치근흡수를 보임으로써 결론적으로 탈구된 치아가 15분 내에 재식 된다면 장기간의 예후는 양호함을 보고하였다.

상악 제 1대구치와 제2대구치 사이에 단위 면적으로 환산된 MTT 검색에 의한 흡광도 측정치 비교에서 상악 제 2대구치에서 약간 더 높은 수치를 보였다. 그 이유는 먼저 쥐의 상악 제 1대구치는 치근이 5개이고 치근의 이개도가 제 2대구치에 비해 크므로 발치 시에 좀 더 많은 외상을 받아 치근면의 치주인대 세포가 손상을 받았을 가능성이 높다. 그러나, 제2대구치는 제1대구치에 비해 치근이 4개이고 치근 이개도가 거의 없어 발치가 상대적으로 손쉬워서 손상 받았을 가능성이 적다는 것이다. 다른 이유로는 이번 실험에 사용된 생후 4주된 쥐 치아의 상악 제 1, 2 대구치는 치근 형성이 완전히 덜 된 상태에서 3 - 4일 정도 상대적으로 늦게 맹출 되는 제 2대구치의 치근단 공이 제 1대구치에 비해 치근단공의 형성이 제대로 안된 상태에서 치근단 공이 넓어서 MTT용액이 치근단공과 분 지를 통해 근관 내로 더 많이 침투되었기 때문으로 예상된다¹⁶⁾.

흥미로운 것은 상악 제 1대구치에서는 단위면적으로 환산된 MTT 흡광도 측정치에서 20분 건조군이 10분 건조군과 비교시 통계학적인 유의차를 보이지 않았으나 상악 제2대구치에서는 MTT 흡광도 측정치에서 20분 건조군이 10분 건조군과 비교시 통계학적인 유의차를 보였다. 이것은 쥐 치아의 발육상태와 연관이 있는 것으로 생각된다.

40분 (1.310)과 60분 건조 (0.970) 처치군에서 급격히 감소된 MTT 측정치는 Modeer¹⁷⁾가 치근막 세포에 관한 연구에서 30분 정도의 짧은 건조 보관 상태에서도 심한 세포

손상이 초래되었음을 보고한 결과와 일치하였다. 다른 많은 연구들도 발치 후 15분이 초과되면 살아있는 세포 수에 있어 급격한 감소가 일어나며 2시간 정도에서는 살아있는 세포는 치주 인대 내에서 전혀 존재하지 않는다고 보고하고 있다^{18,19)}.

이번 실험에서 쥐 치아의 발치를 용이하게 하기 위해 사용된 0.4% β -aminopropionitrile은 amine oxides의 작용을 억제 시켜서 콜라겐 α -chain상의 lysyl-derived aldehyde groups의 형성을 방해해서 반응력이 있는 알데히드 군을 감소시킴으로써 콜라겐 분자와의 교차결합이 많이 일어나지 않게 함으로써 콜라겐 섬유의 인장력을 감소시키게 된다¹²⁾. Barrington과 Meyer는¹³⁾ 0.4% β -aminopropionitrile의 생물학적인 영향 효과에 관한 동물 실험에서 0.4% β -APN 처치를 끊은 지 3일 후에 치주인대는 정상 상태로 되돌아오며, 결과적으로 치주인대세포 또는 콜라겐 섬유에 비가역적인 변화는 전혀 일어나지 않음을 보고하였다.

이번 실험에서 처음 시도된 Hematoxylin-Eosin 검색에 의한 정량적 측정법은 치근면에 붙어있는 치주조직의 양을 정량적으로 측정하기 위해 처음에는 질량이나 표면적 등을 이용하여 구하려 했으나 기술적으로 불가능 하였고 CT scan도 이용하려 했으나 여러 가지 문제로 측정이 어려워져서 MTT검색법을 응용하여 사용하게 되었다. 상악 제1, 2 대구치 각각에서 발치시에 치아의 치근면에 붙어있는 치주조직의 양을 정량적인 수치로 표시하기가 사실상 어렵고 같은 치아 부위라 할지라도 치근의 길이와 지름에 있어 제각기 다르므로 정확한 측정이 어려운 문제점을 보완하기 위해 시도된 방법이다.

Hematoxylin-Eosin 염색에 의한 흡광도 측정에서 상악 제1 대구치 (1.067)와 제2 대구치 (0.790) 사이에 통계학적인 유의차 ($p < 0.05$)가 존재하였으며 상악 제1 대구치에서 더 큰 흡광도 (OD) 값을 보였다. 그러나 동일한 치아를 사용한 각 군 간에는 통계학적인 유의차를 보이지 않았다. 이러한 결과는 치주조직 양의 정량적 측정을 위한 H&E 염색에 의한 검색법의 객관성을 평가하는데 있어서 중요한 근거가 될 수 있으므로 의미 있는 결과라 사료된다. 앞으로 이 측정 방법의 객관성과 정확성을 입증하기위해 보다 더 많은 연구와 검증이 필요하리라 사료된다.

조직학적인 관찰 결과를 살펴보면 즉시 처치군과 10분 건조군에서는 치근단에서 치경부로 갈수록 치주인대 부위의 MTT 염색의 정도는 거의 변화가 없었으나, 치수 내에서는 치경부로 갈수록 MTT 염색이 약해지는 모습을 보였다. 이것은 아마도 생후 4주된 쥐를 사용해서 근첨이 완전히 형성되지는 않아서 MTT 용액이 치근단 공이나 분지를 통해 침투되는 깊이의 한계로 해석되며 대부분 치근단 1/2정도까지 침투되었다. 그리고 치경부위에서는 치근의 지름이 커짐에 따른 사체 날의 절단능력 (cutting efficiency)의 한계로

인해 깨끗한 치아절단면 및 치주인대 부위의 MTT 염색 관찰이 어려웠다.

그러나 40분 이상 건조된 치치군에서는 치주인대조직 섬유모세포 유사세포 (fibroblast-like cell)의 사멸로 인해 살아있는 세포에서만 발견되는 MTT 염색에 의한 crystal을 극히 일부에서만 관찰할 수 있었다.

즉시 처치 군과 10분 건조군에서 MTT 염색에 의한 crystal 결정체를 동일 시편에서 저배율 ($\times 100$)에서 고배율 ($\times 1000$)로의 연속 관찰시 특징적으로 많은 가지 같은 형태의 crystal이 치주인대부위와 치수 내에서 관찰되었고 전 치주인대부위와 치수 내에 골고루 널리 산재해 있는 모습을 관찰할 수 있었다. 이는 건강한 치주인대와 치수 내에서 살아있는 세포들의 고른 분포를 뜻한다고 해석된다. 그러나, 치주인대 내에서의 MTT 염색에 의한 전체적인 crystal의 분포를 살펴보면 치근면에 인접한 부위와 치조골에 인접한 부위가 중간부위보다 좀 더 높은 밀도의 crystal 분포를 보였다. 이것은 이 부위에 치주조직의 재생과 연관이 높은 세포 분열 능력이 왕성한 섬유모세포 유사세포 (fibroblast-like cell) 들이 특히 많이 분포되어 있음을 암시 한다²⁰⁻²³. 아마도 치아에 공급되는 혈관 분포와도 상관이 있을 것으로 사료된다.

지금까지의 대부분의 *in vivo* 및 *in vitro* 연구는 시 (hours) 단위 보다는 일 (days) 단위의 치주인대세포 생활력을 유지할 수 있는 보관 용액의 효과나 시간 단위의 구강 외 노출 시간에 관한 효과에 대해 주로 연구 되어져 왔다^{4,5}. 그러나, 본 연구는 시 (hour) 단위 보다는 실제 임상에서 일어날 수 있는 분 (minute) 단위의 짧은 시간에 따른 치주인대 섬유세포의 활성도를 조사하는데 초점을 맞추었다.

이번 실험에서는 1시간이상 건조 탈구된 치아의 표면상에는 살아있는 치주인대세포는 전혀 남아있지 않다고 보고되고 있기 때문에 60분 이상 건조군은 실험에서 제외시켰다^{2,23}.

본 연구의 결과를 종합적으로 생각해보면, MTT 검색법으로 측정한 흡광도 값과 실제로 냉동 절단법을 이용해 절단한 치근면의 MTT crystal 관찰 소견을 서로 비교하였을 때 상당히 일치된 결과를 보임으로써 MTT 검색법은 치아 재식술이나 이식술의 치료 성패를 결정짓는 치주조직의 재생에 중요한 치주인대 내의 살아있는 세포를 객관적으로 평가하는데 응용될 수 있음을 보여 주었다. 건전한 치주인대 세포의 보존이 치아 이식이나 재식의 성공에 중요한 영향을 미치며 구강 외 건조시간이 20분을 넘지 않아야 한다는 것을 보여주었다.

또한 이번 실험의 중요한 의의는 MTT 검색법이 치주인대 세포의 활성도 평가에서 배양된 세포가 아닌 치근면에 붙어있는 세포를 직접 평가할 수 있는 기존 평가법의 문제

점을 보완해주는 새로운 대안이 될 수 있는 가능성을 제시해 주었다.

V. 결 론

흰쥐 80마리를 이용하여 상악 제 1, 2 대구치 발거 후 실온의 건조 상태에서의 짧은 시간 변화 (즉시, 10분, 20분, 40분, 60분)에 따른 쥐 치아 치근면의 치주인대 세포의 활성도를 MTT 검색법으로 측정함과 동시에 이를 냉동 절단법을 이용한 조직학적인 관찰을 통해 치주인대세포의 활성도 측정에 있어 MTT검색법의 유용성을 검증하였다.

1. MTT 검색에 의한 흡광도 값에 있어 즉시 처치군과 10분 건조군 사이에는 통계학적인 유의차가 없었다. 그러나, 즉시 처치군 및 10분 건조군은 20분 40분 및 60분 건조군과 비교시 통계학적인 유의차를 보였다. 그리고, 20분 건조군도 40분 및 60분 건조군 과의 비교에서 각각 통계학적인 유의차를 보였다. 그러나, 40분 건조군 (1.310)과 60분 건조군 사이에는 통계학적인 유의차를 보이지 않았다 ($p < 0.05$).
2. 실험에 사용된 상악 제 1 대구치의 Hematoxylin-Eosin 염색에 의한 흡광도의 평균 측정값은 상악 제 1 대구치가 제 2 대구치에 비해 더 큰 흡광도 값을 보였다. 그러나 동일 치아의 각 군 간에 평균 흡광도 값은 약간의 차이는 있었으나, 통계학적인 유의차는 보이지 않았다 ($p < 0.05$).
3. 조직학적 현미경 관찰에서 시간 경과에 따라 환원된 MTT crystal의 모양과 분포 및 수에서 확연히 구별되는 특징적인 양상을 보여주었다.
4. 치아에 붙어있는 치주조직 양의 현미경 비교 관찰을 위한 치아 시편의 Hematoxylin-Eosin 염색 관찰에서 시간 경과에 따른 치주조직 양에 있어 군 간에 차이가 관찰되지 않았다.

이번 실험의 결과를 종합적으로 분석해보면 MTT 검색법에 의한 측정값과 냉동 절단법을 이용한 시편의 MTT 염색 관찰 소견 결과를 서로 비교 했을 때 상당히 밀접한 상관관계가 있음을 보였다. 또한, 건전한 치주인대 세포의 보존이 치아 이식이나 재식의 성공에 중요한 영향을 미치며 구강 외 건조시간이 20분을 넘지 않아야 한다는 것을 보여주었다.

참고문헌

1. Lee SJ, Jung IY, Lee CY, Choi SY, Kum KY. Clinical application of computer-aided rapid prototyping for tooth tranplantation. *Dent Traumatol* 17:114-119, 2001.

2. 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* 39:1-13, 1981.
3. Patel S, Dumsha TC, Sydiskis RJ. Determining periodontal ligament cell vitality from exarticulated teeth stored in saline or milk using fluorescein diacetate. *Int Endod J* 27:1-5, 1994.
4. 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* 13:223-227, 1997.
5. Lekic P, Kenny D, Barrett E. The influence of storage conditions on the clonogenic capacity of periodontal ligament cells : implications for tooth replantation. *Int Endod J* 31:137-140, 1998.
6. 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.
7. 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.
8. Kim HK, Kim ES, Choi IB, Kim J, Lee SJ. The verification of the MTT assay on the viability of periodontal ligamental cells in rat molars through the histologic examination. *J Kor Acad Cons Dent* 28(5):385-391, 2003.
9. Bordin S, Page RC, Narayanan AS. Heterogeneity of normal human diploid fibroblasts: isolation and characterization of one phenotype. *Science* 223:171-173, 1984.
10. Narayanan AS, Page RC. Connective tissues of the periodontium : a summary of current work. *Coll Rel Res* 3:33-64, 1983.
11. McCulloch CAG, Knowles G. Discrimination of two fibroblast progenitor population in early explant cultures of hamster gingiva. *Cell Tissue Res* 264:87-94, 1991.
12. Bornstein P. The cross-linking of collagen and elastin and its inhibition in osteolathyrism. Is there a relation to the aging process *Am J Med* 49:429-435, 1970.
13. Barrington EP, Meyer J. Recovery of the rat dental organ from experimental lathyrism. *J Periodontol* 37:453-467, 1966.
14. Lindskog S, Blomlof L. Influence of osmolarity and composition of some storage media on human periodontal ligament cells. *Acta Odontol Scand* 40:435-41, 1982.
15. Andersson L, Bodin I. Avulsed human teeth replanted within 15 minutes- a long-term clinical follow-up study. *Endod Dent Traumatol* 6:37-42, 1990.
16. Schour J, Massler M. The teeth. In : The Rat in Laboratory Investigation. 2nd edn, eds E.J. Farris and J. Q. Griffith. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1949.
17. Modeer T, Dahllof, Otteskog P. Effect of drying on human periodontal ligament repair *in vitro*. *J Int Assoc Dent Child* 15:15-20, 1984.
18. Soder PO, Otteskog P, Andreasen JO, Modeer T. Effect of drying on viability of the periodontal membrane. *Scand J Dent Res* 85:164-168, 1977.
19. Lekic P, Kenny D, Moe HK, Barrett E, McCulloch CA. Relationship of clonogenic capacity to plating efficiency and vital dye staining of human periodontal ligament cells: implications for tooth replantation. *J Periodontol Res* 31:294-300, 1996.
20. Cho MI, Garant PR. The effect of beta-aminopropionitrile on the periodontal ligament: I. Ultrastructure of fibroblasts and matrix. *J Periodontal Res* 19:247-260, 1984.
21. Cho MI, Garant PR. The effect of beta-aminopropionitrile on the periodontal ligament: II. Radioautographic study of collagen secretion from fibroblasts. *Anat Rec* 209:41-52, 1984.
22. Cho MI, Matsuda N, Lin W-L, Moshier A, Ramakrishnan PR. *In vitro* formation of mineralized nodules by periodontal ligament cells from the rat. *Calcif Tissue Int* 50:459-467, 1992.
23. McCulloch CA. Basic considerations in periodontal wound healing to achieve regeneration. *Periodontol* 2000:1:16-25, 1993.

국문초록

구강 외 노출시간에 따른 흰쥐 치아 치주인대세포 활성도의 MTT 검색법을 이용한 평가

전인수 · 김의성 · 김 진 · 이승종*

연세대학교 치과대학 치과보존학교실

본 연구의 목적은 MTT 검색법을 이용하여 흰쥐 상악 대구치를 발거한 후 실온의 건조 상태에서의 시간 변화에 따른 쥐 치아 치근면의 치주인대 세포 활성도를 측정함과 동시에 냉동 절단법을 이용한 조직학적인 관찰 결과를 토대로 하여 MTT검색법이 유용한지를 검증하고자 하였다.

생후 4주된 암컷 Sprague-Dawley계 흰쥐 80마리를 이용하여 β -APN 전처치 후 상악 제 1 & 2 대구치를 모두 발거하였다. 이들 치아를 즉시 혹은 10, 20, 40, 60분 동안 실온에서 건조 시킨 후 치아 자체를 MTT용액에 저장한 다음 흡광도 측정을 이용한 정량적 분석과 동시에 냉동 절단법을 이용하여 조직을 관찰하였다.

MTT 검색에 의한 흡광도 값에 있어 즉시 처치군과 10분 건조군 사이에는 통계학적인 유의차가 없었다 ($p > 0.05$). 그러나, 즉시 처치군 및 10분 건조군은 20분과 40분 및 60분 건조군과 비교시 통계학적인 유의차를 보였다 ($p < 0.05$). 또한, 20분 건조군도 40분 및 60분 건조군과의 군 간 비교에서 각각 통계학적인 유의차를 보였다 ($p < 0.05$). 그러나, 40분 건조군과 60분 건조군 사이에는 통계학적인 유의차를 보이지 않았다.

조직학적 관찰에서 시간 경과에 따라 crystal의 모양과 분포 및 수에서 확연히 구별되는 특징적인 양상을 보여주었다. 즉시 및 10분 건조 군에서는 가시모양의 crystal이 전 치주인대부위 조직과 치수 내에 밀도 높게 골고루 폭넓게 퍼져 있었으나 20분 이상 건조 군에서부터는 치주인대와 치수 부위 조직 모두에서 crystal 결정체 수가 급격히 감소하는 양상을 보였다.

이번 실험의 결과를 종합적으로 분석해보면 MTT 흡광도 측정값과 냉동 절단법을 이용한 시편의 MTT 염색 관찰 소견 결과를 서로 비교 했을때 상당히 밀접한 상관 관계가 있음을 보였다.

주요어: 치주인대세포, 활성도, MTT 검색법, 냉동 절단법, 흡광도