

고압-저온 보관에 따른 쥐 치아 치주인대세포의 활성화 평가

정진호¹ · 김 진² · 최성호³ · 김의성¹ · 박지용⁴ · 이승종^{1*}연세대학교 치과대학 ¹치과보존학교실, ²구강병리학교실, ³치주과학교실,
⁴연세대학교 생명시스템대학 생명공학과

ABSTRACT

THE EVALUATION OF PERIODONTAL LIGAMENT CELLS OF RAT TEETH AFTER LOW-TEMPERATURE PRESERVATION UNDER HIGH PRESSURE

Jin-Ho Chung¹, Jin Kim², Seong-Ho Choi³, Eui-Seong Kim¹, Jiyong Park⁴, Seung-Jong Lee^{1*}¹Department of Conservative Dentistry, ²Department of Oral Pathology, ³Department of Periodontology, College of Dentistry,
⁴Department of Biotechnology, College of Life Science and Biothchnology, Yonsei University, Seoul, Korea,

The purpose of this study was to evaluate the viability of periodontal ligament cells of rat teeth after low-temperature preservation under high pressure by means of MTT assay, WST-1 assay. 12 teeth of Sprague-Dawley white female rats of 4 week-old were used for each group.

Both side of the first and second maxillary molars were extracted as atraumatically as possible under tiletamine anesthesia. The experimental groups were group 1 (Immediate extraction), group 2 (Slow freezing under pressure of 3 MPa), group 3 (Slow freezing under pressure of 2 MPa), group 4 (Slow freezing under no additional pressure), group 5 (Rapid freezing in liquid nitrogen under pressure of 2 MPa), group 6 (Rapid freezing in liquid nitrogen under no additional pressure), group 7 (low-temperature preservation at 0℃ under pressure of 2 MPa), group 8 (low-temperature preservation at 0℃ under no additional pressure), group 9 (low-temperature preservation at -5℃ under pressure of 90 MPa). F-medium and 10% DMSO were used as preservation medium and cryo-protectant. For cryo-preservation groups, thawing was performed in 37℃ water bath, then MTT assay, WST-1 assay were processed. One way ANOVA and Tukey HSD 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 7 (0℃/2 MPa) showed higher viability of periodontal ligament cells than other group (2-6, 8) and this was statistically significant ($p < 0.05$), but showed lower viability than group 1, immediate extraction group (no statistical significance).

By the results of this study, low-temperature preservation at 0℃ under pressure of 2 MPa suggest the possibility for long term preservation of teeth. [J Kor Acad Cons Dent 35(4):285-294, 2010]

Key words: Periodontal ligament cell, MTT, WST-1, Viability, Low temperature preservation under pressure, Rapid freezing, Cryopreservation

-Received 2010.5.29., revised 2010.6.19., accepted 2010.7.3.-

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

Department of Conservative Dentistry,
Yonsei University School of Dentistry
134, Shinchon-dong, Sudaemoon-gu, Seoul, 120-752, Korea
Tel: +82-2-2228-3148 Fax: +82-2-313-7575
E-mail: sjlee@yuhs.ac

I. 서 론

치아의 재식이나 이식의 성공에 있어서 가장 중요한 요소¹⁻⁷⁾는 발거된 치아의 치근면에 살아있는 치주인대세포의 활성화도를 유지하는 것이다.

※ 본 연구는 연세대학교 치과대학 2009년도 교수연구비에 의하여 이루어졌음(6-2009-0221).

이러한 치주인대세포의 건강성과 활성도를 유지할 수 있는 이상적인 보존방법을 찾는다면, 교정 치료 중 발거된 치아를 미래의 자신의 치아 결손부위에 이식하고자 예비로 보관할 수 있을 것이며, 외상이나 수여부 발치와의 감염으로 인하여 바로 재식할 수 없는 경우에도 치아를 장기보관 하였다가 다시 사용할 수 있을 것이다.^{8,9)} 즉, 장기간 보관된 자신 또는 타인의 치아를 이용하여 상실된 치아를 대신할 수 있는 치아은행도 만들 수 있게 될 것이다.

이러한 이식치아의 치주인대세포의 활성도를 유지하기 위한 이상적인 보존 방법을 찾기 위해서 많은 시도가 있어 왔다.

일반적으로 세포의 활성도를 유지하는 방법으로 저온보존법과 냉동보존법이 있다. 세포 보존의 원리는 생명의 과정이 온도에 의존적인 화학적 반응이며 이것의 총합이 대사라는 것에 기인한다. 저온보존법은 얼음이 어는 온도 전까지 온도를 낮춰 세포 대사를 감소시켜 보관하는 방법으로 심장, 간, 췌장, 신장 등 전체 기관의 단기간 보존에 사용된다. 이것은 세포대사가 10℃ 내려갈 때 1.5-2배 감소된다는데 기초한다. 그러므로 37℃에서 0℃로 내려가면 대사는 12-13배 감소된다.¹⁰⁾

보다 장기적인 보존법인 냉동보존법은 1948년 Polge 등이 glycerol을 첨가하였을 때 닭의 spermatozoa가 -70℃에서 생존함을 우연히 발견하면서 시작되었는데,¹¹⁾ 현재 주로 세포나 조직의 일부 수준에서 냉동보존이 널리 사용되고 있으며 심장판막이나 피부, 각막, 포유류의 수정란 등도 냉동 보존되고 있다. 그러나 아직도 온전한 기관의 냉동보존은 이용되고 있지 않다. 냉동보존법은 세포를 장기간 보관할 때 많이 사용되고 냉동과 해동 과정에서 얼음 결정과 증가된 용질의 축적으로 인한 삼투압의 증가로 인한 세포 손상이 올 수 있다.^{9,10)}

또, 세포를 -196℃의 액화질소에서 바로 얼리는 급속 냉동 방법은 급속한 온도변화에 의해서 조직과 세포가 파손되는 경우가 많아 이를 줄이기 위한 프로그램 냉동 방법에 관하여 다양한 시도가 있었다. Chesne¹²⁾ 등의 연구에 의하면 쥐의 간세포를 냉동할 때 -3℃/min의 조절된 속도로 냉동시 세포 생존율이 가장 높았으며 Kawasaki 등¹³⁾도 치아를 냉동시 -7℃까지는 -1℃/min, -40℃까지는 -6.6℃/min, -80℃까지는 -0.5℃/min의 속도로 냉동되는 속도 조절 냉동기를 사용하여 냉동했을 때 정상 치아와 유사한 결과를 보였음을 보고하였다. Lee 등¹⁴⁾도 3 MPa의 압력을 이용한 저속 냉동 보관법은 4℃ 냉장법이나 압력을 사용하지 않은 다른 냉동 보관법에 비해 우수한 쥐 치아의 치주인대세포의 활성도를 나타내었다고 보고하였다.

또 다른 접근법으로 고압 하에서 냉동시킴으로서 세포의 손상을 줄이고자 하는 방법을 생각할 수 있다. 210 MPa 고압 하에서는 물의 상변이 온도가 0℃에서 -21℃로 내려

가므로 낮은 온도에서도 얼지 않은 상태로 보관할 수 있다.¹⁵⁾

이러한 원리를 근거로 세포의 생존률을 증가시키기 위해 압력을 이용한 시도가 있어왔다. 과냉각(supercooling)이란, 어떤 압력을 가하여 용액이 어는점 이하로 냉각되어서도 결정체를 형성하지 않는 불균형한 열역학적 상태를 일컫는다.¹⁶⁾ Inuzuka 등¹⁷⁾은 쥐의 장을 5 atm의 고압(Hyperbaric Oxygen Pressure) 하에서 2일간 저온 보존 후 이식했을 때 1 atm에서 저온 보존한 것보다 더 좋은 이식 결과를 보였다고 하였고, Takahashi 등^{18,19)}은 냉동에 따른 손상을 피하기 위해 30 MPa까지의 고압(High Hydrostatic Pressure) 하에서 0℃에서는 1시간 동안 쥐의 간을 저온 보존하는 것이 가능하고 5 MPa 고압(High Hydrostatic Pressure) 하에서는 -2℃에서 5시간 동안 쥐의 간을 냉동시키지 않고 저온 보존할 수 있다고 하였다.

이에 더 나아가 Pribenszky 등²⁰⁾은 쥐의 embryo를 30분간 실온에서 60 MPa 고압(High Hydrostatic Pressure) 처리한 후 냉동 보관했을 때 생존률이 증가하였고 Pribenszky 등²¹⁾과 Du 등^{22,23)}도 돼지 난자를 20, 40 MPa 압력을 가한 후 냉동 보관했을 때 생존률이 증가하였다고 하였다.

이번 연구의 목적은 흰 쥐의 상악 대구치를 발거한 후 치주인대세포를 0℃/2 MPa의 압력하에 1주간 보관한 치주인대세포의 활성도를 저속 냉동법(No Additional Pressure, 2 MPa, 3 MPa), 급속 냉동법(No Additional Pressure, 2 MPa), 초고압 저온 보존법(-5℃/90 MPa)과 비교, 평가하여 치주 인대세포를 장기간 보존할 수 있는 치아 은행의 최적의 조건을 찾는 것이다.

Ⅱ. 연구 재료 및 방법

1. 실험 대상 및 전 처치

생후 4주된 암컷 Sprague-Dawley계 흰쥐 72마리를 사용하였다. 마취는 tiletamine (Zoletil50, Virbac, Carros, France) 1 cc를 이용하여 피하 주사하였다. 마취가 유도된 후 날카로운 탐침으로 peritomy를 시행한 후 조직 검자를 이용하여 치관을 잡고 최소한의 외상을 가하면서 접근이 가장 용이한 좌우측 상악 제1, 2대구치를 모두 발거하였다. 이때 발치와 주변의 출혈은 면봉으로 조절하고 발치 후에는 치근의 파절 여부를 현미경을 사용하여 확인하였다.

2. 실험군의 분류

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 (100 units/ μ l), streptomycin (100 μ l/ml), fungizone (0.3 μ g/ml)을 첨가하여 제조하였다.

냉동시 세포질내 동해방지제로는 10% dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였다.

가. 실험군 분류

대조군으로는 즉시 발치군을 사용하였다. 각 군 당 4마리의 쥐에서 12개의 치아를 발거하여 MTT 검색법과 WST-1 검색법에 사용하였다.

· 1군: 즉시 발치군

치아를 발거하자마자 PBS에 세척한 후 실험에 이용하였다.

· 2군: 3 MPa 저속 압력 냉동군

발거된 치아를 PBS에 세척하고 4℃에서 보관한 F-medium에 2.5%, 5%, 7.5% DMSO를 첨가한 용액에 5분간씩 단계적으로 담근 뒤 2 ml 냉동튜브에 F medium과 10% DMSO 혼합용액 2 ml를 넣고 뚜껑 부위를 완전히 잠근 후 다시 반대 방향으로 반바퀴 회전시켜 압력이 통할 수 있도록 하였다. 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 3 MPa로 가한 상태로 4℃에서 -35℃까지 -0.5℃/min로 서서히 냉동시킨 뒤 -196℃ 액화질소 냉동고에 넣어 일주일간 보관하였다.

· 3군: 2 MPa 저속 압력 냉동군

2군과 동일한 방법으로 압력통에 2 MPa의 압력을 가했다.

· 4군: 저속 냉동군(no additional pressure)

2군과 동일한 방법으로 압력을 가하지 않고 시행했다.

· 5군: 2 MPa 급속 압력 냉동군

3군과 같은 방법으로 2 MPa의 압력을 가한 후 즉시 -196℃ 액화질소 냉동고에 넣어 일주일간 보관하였다.

· 6군: 급속 냉동군(no additional pressure)

발거된 치아를 PBS에 세척하고 4℃에서 보관한 F-medium에 2.5%, 5%, 7.5% DMSO를 첨가한 용액에 5분간씩 단계적으로 담근 뒤 2 ml 냉동튜브에 F medium과 10% DMSO 혼합용액 1 ml와 함께 넣고 5분 후 -196℃ 액화질소 냉동고에 넣어 냉동시켜 일주일간 보관하였다.

· 7군: 0℃/2 MPa 고압 저온 보존군

발거된 치아를 PBS에 세척하고 2 ml 냉동튜브에 4℃에서 보관한 F-medium 2 ml에 DMSO없이 담근 뒤, 뚜껑 부위를 완전히 잠근 후 다시 반대 방향으로 반바퀴 회전시켜 압력이 통할 수 있도록 하였다. 그리고, 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 2 MPa로 가하고 0℃로 일주일간 보관하였다.

· 8군: 0℃ 저온 보존군(no additional pressure)

발거된 치아를 PBS에 세척하고 2 ml 냉동튜브에 4℃에서 보관한 F-medium 2 ml에 DMSO없이 담근 뒤, 뚜껑 부위를 완전히 잠근 후 다시 속도조절 냉동기(Low Temp Freezer Drying Chamber KS5045, Geumsung Science, Seoul, Korea)에 넣고 압력을 가하지 않고 0℃로

Table 1. Experimental Groups

Group	Preservation method	Condition
Group 1	Immediate Extraction	Control
Group 2		3 MPa
Group 3	Slow freezing	2 MPa
Group 4		No additional pressure
Group 5		2 MPa
Group 6	Rapid freezing	No additional pressure
Group 7		2 MPa
Group 8	0℃ preservation	No additional pressure
Group 9	-5℃ preservation	90 MPa

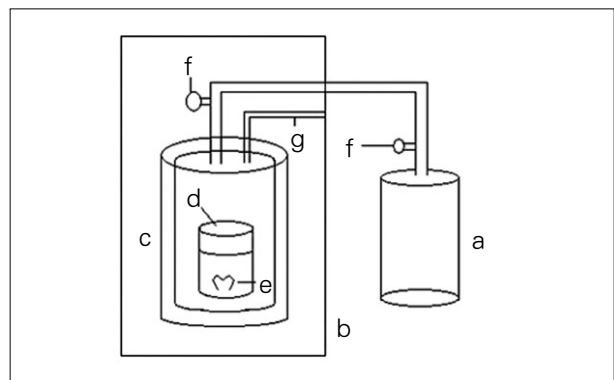


Figure 1. Schematic diagram of program freezer with pressure vessel.

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

일주일간 보관하였다.

· 9군: $-5^{\circ}\text{C}/90\text{ MPa}$ 초고압 저온 보존군

발거된 치아를 PBS에 세척하고 비닐 팩에 4°C 에서 보관한 F-medium에 DMSO없이 담근 뒤, 비닐팩의 개봉 부위를 열을 가하여 이중으로 압접한 후 초고압장치(DP-SHPL-01L-100, Dima Puretech, Incheon, Korea) 용기통 안에 넣고 온도는 -5°C , 압력은 90 MPa로 설정한 후 일주일간 보관하였다.

나. 냉동군의 해빙 방법

급속 냉동군과 저속 냉동군의 냉동한 치아를 냉동튜브 채로 -196°C 액화질소 냉동고에서 꺼내어 37°C 수욕조에 넣어 해빙하였다. 압력 냉동군은 압력통을 액화질소 냉동고에서 꺼내어 압력을 해소하고 안에 든 냉동튜브를 꺼내 37°C 수욕조에 넣어 해빙하였다.

2 ml 냉동튜브 속의 보관용액이 완전히 액체 상태로 되었을 때 수욕조에서 꺼내 치아를 7.5%, 5%, 2.5%, 0% DMSO가 첨가된 용액에 5분씩 순차적으로 담궈 DMSO를 제거한 후 MTT 검색, WST-1 검색에 사용하였다.

3. MTT 검색법(3,4[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

각 실험군의 처리가 끝난 뒤에 96-well plate에 MTT 용액(0.05 mg/ml, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 200 μl 를 넣고 각 군별 치아를 MTT 용액이 있는 well에 담았다. 알루미늄 호일로 96-well plate를 싸서 3시간 동안 37°C 로 배양하였다. 3시간 후 DMSO 150 μl 를 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 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

4. WST-1 검색법(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(20 μl , Cell Proliferation Reagent WST-1; Roche Applied Science, Mannheim, Germany) 200 μl 를 넣고 각 군별 치아를 WST-1 용액이 있는 well에 담았다. 알루미늄 호일로 96-well plate를 싸서 4시간 동안 37°C 로 배양하였다. 치아를 제거하고 Dynatech MRX ELISA microplate reader (Dynatech laboratories, Chantilly, VA, USA)에 넣고 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

5. 치아 치근면에 붙어있는 치주조직의 양 측정

실험에 사용된 치아의 치근면에 붙어있는 치주조직의 양을 정량적으로 측정하기 위해 MTT 검색법과 WST-1 검색법 실험 후 각 군의 well에서 제거된 치아를 각 군별로 96-well plate에 넣고 Eosin (Accustain, sigma-aldrich chemie, Gmbh, Germany) 350 μl 를 첨가하여 12시간 정도 염색을 한 후 치아를 제거하고 다른 well에 넣어 1% acid alcohol (70% ethyl alcohol, 1% HCL) 350 μl 에 30분간 담가두어 치근면에 염색된 치주조직을 탈색시켰다.

치아를 꺼낸 뒤 Dynatech MRX ELISA microplate reader (Dynatech laboratories, Chantilly, VA, USA)에 넣고 530 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

7. 통계처리

대조군과 각 실험군에서 MTT 검색법, WST-1 검색법에서 얻은 흡광도와 이를 Eosin 염색에서 얻은 흡광도로 나눈 수치의 차이를 SPSS 12.0 (SPSS, Chicago, Illinois, USA)을 이용한 ANOVA를 사용하여 분석하였으며 사후 검정으로는 Tukey HSD의 방법을 썼다.

III. 결 과

1. MTT 검색법

치근면의 면적으로 나누어진 값인 WST-1/Eosin 비율은 MTT검색법 결과와 마찬가지로, 즉시 발치군이 가장 높은 세포활성도 값을 나타내었으며, $0^{\circ}\text{C}/2\text{ MPa}$ 고압 저온 보존군은 다른 모든 군보다 통계적으로 유의성 있는($p < 0.05$) 차이를 보이며 높은 세포 활성도를 나타내었다.

그리고, 저속 냉동군, 급속 냉동군, 0°C 저온 보존군에서 모두 압력을 가한 군이 압력을 가하지 않은 군에 비해 높은 세포 활성도를 나타내었다. 또, 2 MPa 저속 압력 냉동군(Group 3)은 3 MPa 저속 압력 냉동군(Group 2)보다 높은 세포 활성도를 나타내었으나, 통계적 유의차는 보이지 않았다. $-5^{\circ}\text{C}/90\text{ MPa}$ 초고압 저온 보존군(Group 9)은 다른 군들보다 가장 낮은 세포 활성도를 나타내었다.

IV. 총괄 및 고안

포유류의 세포는 본성적으로 저온에 잘 저항하는 것처럼 보인다. 그러나 세포가 냉각될 때 얼음의 형성은 많은 다양한 파괴적인 영향을 끼친다.²⁴⁾ 그러므로 동해(cryoinjury)에 대한 연구는 냉각 중에 세포내, 외 두 곳 모두에서 언제 어떻게 얼음이 형성되는지에 대한 것이 될 것이다. 많은 동

Table 2. The averages and standard deviations of optical density of MTT

Groups	Condition	MTT ¹	Eosin ²	MTT/Eosin ³
Immediate extraction	Control	2.274 ± 0.303	0.401 ± 0.074	5.718 ± 0.382 ^a
Slow freezing	3 MPa	1.222 ± 0.320	0.328 ± 0.091	3.806 ± 0.619 ^{b,c}
	2 MPa	1.272 ± 0.285	0.305 ± 0.052	4.252 ± 1.045 ^b
	NAP	1.123 ± 0.383	0.358 ± 0.083	3.128 ± 0.657 ^{c,d}
Rapid freezing	2 MPa	1.006 ± 0.302	0.380 ± 0.100	2.667 ± 0.421 ^{d,e}
	NAP	0.651 ± 0.185	0.314 ± 0.092	2.094 ± 0.297 ^e
0℃ preservation	2 MPa	2.338 ± 0.211	0.415 ± 0.045	5.674 ± 0.619 ^a
	NAP	1.778 ± 0.461	0.468 ± 0.123	3.848 ± 0.593 ^{b,c}
-5℃ preservation	90 MPa	0.330 ± 0.097	0.307 ± 0.086	1.074 ± 0.088 ^f

a,b,c,d,e,f: Different superscript letters means statistical difference ($p < 0.05$).

Table 3. The averages and standard deviations of optical density of WST-1

Groups	Condition	WST-1 ¹	Eosin ²	WST-1/Eosin ³
Immediate extraction	Control	1.832 ± 0.341	0.359 ± 0.036	5.109 ± 0.828 ^a
Slow freezing	3 MPa	0.974 ± 0.145	0.331 ± 0.061	2.985 ± 0.432 ^{b,c}
	2 MPa	1.015 ± 0.195	0.306 ± 0.083	3.454 ± 0.862 ^b
	NAP	1.021 ± 0.187	0.399 ± 0.083	2.596 ± 0.316 ^{c,d,e}
Rapid freezing	2 MPa	0.886 ± 0.115	0.388 ± 0.053	2.307 ± 0.345 ^{d,e,f}
	NAP	0.745 ± 0.136	0.372 ± 0.075	2.020 ± 0.227 ^{e,f}
0℃ preservation	2 MPa	1.634 ± 0.362	0.359 ± 0.079	4.578 ± 0.461 ^a
	NAP	1.044 ± 0.138	0.364 ± 0.066	2.913 ± 0.428 ^{b,c,d}
-5℃ preservation	90 MPa	0.731 ± 0.088	0.387 ± 0.056	1.900 ± 0.144 ^f

a,b,c,d,e,f: Different superscript letters means statistical difference ($p < 0.05$).

해 방지제가 얼음의 형성을 조절하거나 막기 위해서 사용되지만, 그 동해 방지제 자체가 세포에 해를 끼칠 수 있다.

세포를 냉동하는 과정 중에 아주 낮은 온도인 -180℃ 이하에서는 세포 손상이 그리 심하지는 않지만 냉동과정 중간 온도인 -15℃ 에서 0℃에서의 세포에 대한 치명적 반응이 문제가 된다. 이 온도는 냉동과 해동 과정에서 두 번 겪게 되는데 -5℃까지는 보존액 내에 포함된 동해방지제(cryoprotectant)에 의하여 빙점이 저하되므로 세포와 주위의 보존액은 얼지 않는다. -5℃ 에서 -15℃ 사이에서는 세포 외부의 보존액에 얼음이 형성되기 시작하나 세포막이 얼음 성장을 막기 때문에 세포 자체는 얼지 않고 과냉각(supercooling)된다.²⁵⁾ 세포내의 과냉각된 수분은 세포 외부의 일부 동결된 보존액보다 화학적 반응성(chemical potential)이 높아 삼투압 차이로 수분이 세포 밖으로 빠져나가 세포 외부에서 얼게 된다. 이후의 물리화학적 변화는 냉동 속도에 의하여 결정된다. Mazur 등²⁶⁾은 냉동 속도에 의한 이 같은 손상을 “two factor hypothesis”로 설명하였다. 즉 냉동

속도가 지나치게 빠르면 세포내 수분이 빠져나가기 전에 과냉각 되면서 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.

Hyon²⁷⁾은 이러한 동해를 피하기 위해 녹차의 Polyphenol이 함유된 특수 용액에 쥐의 췌장의 Langerhans 섬 세포와 쥐의 각막, 돼지의 연골 등을 냉동시키지 않는 방법으로 보관하여 장기 보관 후 세포의 생존률이 높게 나왔음을 보고하였다.

또한, Takahashi 등^{18,19)}은 냉동에 따른 손상을 피하기 위해 30 MPa까지의 고압(High Hydrostatic Pressure) 하에서 0℃에서는 1시간 동안 쥐의 간을 저온 보존하는 것이 가능하고 5 MPa 고압(High Hydrostatic Pressure) 하에서는 -2℃에서 5시간 동안 쥐의 간을 냉동시키지 않고 저온 보존할 수 있다고 하였다

반면에 저온현상은 대사율을 떨어뜨리고, 저장된 에너지를 분해하고, 산소 요구도를 높여서 허혈성 손상을 증가시킬 수 있다.¹⁰⁾ 정상적인 온도 보다 낮은 온도에서 세포에 부정적인 면은 지방의 상변이를 일으킨다는 데에 있다. 지방은 세포의 모든 막구조에 영향을 미치며 특히 세포막에 그러하다. 온도가 내려감에 따라 지방은 젤 상태나 다른 3차원적인 결정구조로 상변이를 진행하게 된다. 이온의 수동적 통로(Passive ion channel)는 보통 저온에 영향을 받지 않으나, 이온 펌프의 에너지 효율은 온도에 의존적으로 감소하게 된다. 이온의 누출과 감소된 이온 펌프의 에너지 효율은 복합적으로 작용하여 세포내 구성과 삼투압을 변화시킬 수 있다. 이것은 단백질 변성과 부종을 야기한다. 세포의 종류에 따라 약 6-18℃의 지방의 상 변이 온도를 갖는데, 이 온도 아래에서 많은 온도에 의한 변화들이 일어나게 된다. 세포를 수일간 보존해야 하는 경우에는 거의 어느점에 가깝게 세포를 보존해야만 한다. 하지만, 1시간 내외의 짧은 시간에는 냉동시키는 것보다 오히려 상온에 보관하는 것이 더 나을 수 있다.¹⁰⁾

또한, 온도 뿐 아니라 압력도 세포의 활성도에 영향을 끼친다. 1912년 이래로 물이 압력에 따라 다른 온도에서 상변이를 일으킨다는 것을 알게 되었다.²⁸⁾

Pribenszky²⁹⁾의 연구에서 배아는 압력이 높아짐에 따라 생존할 수 있는 시간이 짧아진다고 하였다. 그러나, 그럼에도 불구하고, 일정 조건의 압력하에서는 생존율의 변화 없이 생존할 수 있다고 했다. 예를 들면, 90 MPa 하에서는 1초동안 30 MPa에서는 2시간 동안 형태적인 변화를 보이지 않았다. 또한 90 MPa 하에서 15분간, 30 MPa 하에서 3시간 동안 가역적인 변화를 보였다. 그러나, 더 압력이 지속되었을 때(90 MPa 하에서 2시간, 30 MPa 하에서 5시간) 배아는 변형되어 분해되었음을 보고했다.

아직까지 치주인대세포의 보존에 대한 정확한 온도와 압력에 대한 최적의 방법이 개발되지 못한 실정이다. 이에 온도와 압력의 여러 조건하에 최적의 여건을 찾고자 본 연구가 진행되었다.

본 실험에서는 0℃/2 MPa 고압 저온 보존군(Group 7)이 MTT 및 WST-1검색법 모두에서 양성 대조군인 즉시발치군(Group 1)과 비슷한 결과를 나타냈고, 두 군간의 통계적 유의차는 존재하지 않았다.

Lee 등¹⁴⁾은 치주인대세포를 3 MPa의 저속 압력 냉동법으로 보관하는 것이 급속 냉동법이나 4℃ 냉장보관법에 비

해서 더 좋은 결과를 나타냈다고 보고하였다. 또, Baek 등³⁰⁾은 구강 상피세포의 냉동보관시 세포를 freezing container에 담아 1℃/min의 냉동속도로 -70℃까지 냉동 후 -196℃에 냉동하여 보관한 일반 냉동 보존군, 세포를 바로 -196℃의 액화질소에 넣어 냉동한 급속 냉동 보존군, 4℃에서 -35℃까지 -0.5℃/min 속도로 서서히 냉동시킨 뒤 -196℃에 냉동한 저속 냉동 보존군, 2 MPa의 압력을 가하고 -0.5℃/min 속도로 4℃에서 -35℃까지 서서히 냉동시킨 뒤 -196℃에 냉동한 2 MPa압력 저속 냉동 보존군, 3 MPa의 압력을 가하고 -0.5℃/min 속도로 4℃에서 -35℃까지 서서히 냉동시킨 뒤 -196℃에 냉동한 3 MPa압력 저속 냉동 보존군으로 나누어 실험한 결과 2 MPa의 압력을 준 것이 3 MPa의 실험군보다 더 높은 세포 생존율을 나타내었다고 보고하였다.

본 연구에서도 2 MPa 저속 압력 냉동군(Group 3)이 3 MPa 저속 압력 냉동군(group 2)에 비해 두 검사법 모두에서 더 높은 세포 활성도를 나타내었다. 하지만, 통계적 유의차는 보이지 않았다. 본 실험의 예비 실험에서도 0℃ 저온 압력 보존시 2 MPa 군이 3 MPa보다 더 높은 활성도를 나타내어 급속 냉동군과 저속 냉동군, 저온 보존군의 실험시 2 MPa의 동일한 압력 조건으로 실험하였다.

그러나, 2 MPa의 압력이 3 MPa의 압력보다 더 높은 활성도를 나타내는 것의 정확한 기전은 더욱 연구가 필요한 부분이다.

-5℃/90 MPa 초고압 저온 보존군은 MTT검색법과 WST-1 검색법 모두에서 가장 낮은 세포 활성도를 나타내었다. 초고압 저온 보존군은 높은 압력에 의해 얼지 않는 과냉각(supercooling) 상태가 되기 때문에 불필요한 동해 방지제에 의한 화학적 독성을 막기 위하여 DMSO를 사용하지 않고 F-media만 사용하였다. 이 번 실험을 위해 제작된 초고압장치(DP-SHPL-01L-100, Dima Puretech, Incheon, Korea)는 압력을 풀 때 속도를 조절할 수 없다는 약점이 있다. Pribenszky 등²¹⁾은 성숙한 돼지의 난모세포를 이용한 실험에서 치사량 이하의 압력은 shock-protein을 활성화 시켜 저항력을 높여주고, 발생능력을 높여 준다고 하였다. 가장 좋은 결과는 30분간 20 MPa의 압력하에 있는 것이 가장 좋은 결과를 보였다. 그러나 40 MPa 이 한계 압력으로 그 압력이상으로는 배반포(blastocyst)를 만들어 내지 못했다고 했다. 또한, 배아의 한계 압력은 종마다 서로 다르며, 쥐와 소의 배아는 80 MPa까지이고, 다른 세균들은 60-80 MPa의 한계압력을 가지며, 그 이상이 되었을 때 비가역적 변화를 야기한다고 하였다. 이번 실험의 90 MPa의 압력은 쥐 치주인대세포의 한계 압력을 넘는 압력이었을 가능성도 있을 것이다. 앞으로 쥐 치주인대세포의 압력에 따른 세포의 활성도 평가를 통하여 한계압력에 대한 연구가 더 필요하리라 생각된다.

프로그램 냉동 속도 조절기를 이용한 저속 냉동은 냉동으로 인한 손상을 줄일 수 있다.¹³⁾ Andreassen 과 Schwartz³¹⁾는 -35°C 까지 $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 속도로 저속 냉동, -100°C 까지 $-6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 속도로 냉동한 뒤 -196°C 까지 급속 냉동할 것을 권하였고, Kawata³²⁾와 Kaku 등³³⁾은 쥐 치아를 자기장으로 $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 속도로 -30°C 까지 3일간 냉동 보관했을 때 좋은 결과를 얻었다고 하였으므로 본 실험에서도 프로그램 냉동속도 조절기를 사용하여 -35°C 까지는 $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 속도로 저속 냉동하였다. -35°C 이하 온도에서는 세포 내부에 얼음결정이 생기지 않고,³⁴⁾ 세포 외부의 냉동환경에 반응해서 세포가 수축하기 때문에 -196°C 까지 빠르게 냉동할 수 있다고^{34,35)} 보고되고 있으므로 -35°C 이하부터 -196°C 까지는 액체 질소통을 사용하여 급속 냉동을 시행하였다. 또, Gao와 Crister²⁵⁾는 급속 해동을 하면 재결정화 현상을 막을 수 있으므로 많은 세포를 살릴 수 있다고 보고하여 본 실험에서는 급속 해동을 시행하였다.

대표적인 동해방지제로서 DMSO가 널리 사용되며 Schwartz와 Andreassen^{1,2)}은 속도조절기로 저속 냉동을 했을 때 10% DMSO를 사용한 경우 정상 치근단막 생성이 제일 좋았다고 하였고 Kim 등³⁶⁾도 급속 냉동시 10% DMSO를 사용했을 때 치주인대 활성도가 제일 높았다고 보고하였으므로 본 실험에서는 동해방지제로 10% DMSO를 선택하여 실험하였다.

고압(High Hydrostatic Pressure)은 세포막의 수동 수송과 능동 수송을 포함한 세포 내 생화학적 반응과 세포의 단백질 운곽을 변화시키는 것이 증명되었다.³⁷⁻³⁹⁾ Kaarniranta 등⁴⁰⁾은 고압이 후전자 활성화를 유도해 HSPs 70의 생산을 유도한다고 하였고, Elo 등⁴¹⁾은 고압이 HSPs 90 β 의 생산을 유도한다고 하였다. HSPs (Heat shock proteins)은 스트레스 단백질이라고도 불리는 일종의 molecular chaperone으로서 세포가 고온으로 자극되었을 때 다량으로 생성되는 세포질 내 단백질 군으로 추운 온도, 삼투압, 산도, 세포의 대사 장애, 독성물질, 물리적 자극 등에 의해서도 생성이 증가된다.^{22,23,42)} 이 HSPs는 세포질 내 단백질의 형태와 구조를 완전하게 유지하는데 중요한 기능을 담당하며,⁴³⁾ 사람의 혈액 종양세포를 이용한 연구에서 HSPs 70은 세포의 분화를 촉진시키며 세포사멸을 억제할 뿐만 아니라 유발하는 약제에 대해서도 세포가 내성을 갖도록 한다는 보고도 있다.⁴⁴⁾

본 실험에서도 각 군에서 2 MPa의 압력을 준 군이 압력을 가하지 않은 군에 비해 높은 세포활성도를 보였으며, 급속 냉동군을 제외한 저속 냉동군과 저온 보존군에서는 통계적 유의차를 보였다($p < 0.05$).

MTT 검색법과 WST-1 검색법은⁴⁵⁾ 세포 증식 및 생존 능력, 약제에 대한 세포 독성을 측정하며 세포의 활성도를 보는데 방사능 물질을 사용하지 않고 96 well plate를 사용하

므로 많은 시료를 검사할 수 있고 과정이 반자동으로 이루어지므로 상당히 정확하다. Kim 등⁴⁶⁾, Kim 등³⁶⁾, Ahn 등⁴⁷⁾, Lee 등¹⁴⁾은 쥐 치아가 96 well plate에 잠길 정도로 충분히 작기 때문에 *in vivo* MTT 검색법을 이용하여 치주인대세포의 활성도를 배양이라는 과정없이 직접 측정할 수 있다고 하였다.

MTT는 비수용성의 formazan 결정으로 환원되어 결정을 녹이는 단계를 한 번 더 거치게 되나 동일 계통의 기질인 WST-1은 수용성 formazan 결정으로 환원되어 추가적인 단계 없이 측정할 수 있어 MTT보다 민감도가 뛰어나다.⁴⁸⁾ 그러나, Alotto 등⁴⁸⁾은 피부 은행(skin bank)의 연구에 있어 조직의 활성도를 평가하는 실험에서 WST-1은 장기간 보존기간 동안의 시편의 활성도의 평가보다는 단기간내의 세포의 죽음을 평가하는 데에 더 적절하다고 하였다. 또한, 그 실험에서 WST-1은 72시간 4°C 보존시 단지 6%의 세포 생존률을 보였지만, 그의 임상 실험 결과, 피부이식의 임상 성공율은 80%이상을 보였다고 하였다. 반면에 MTT는 4°C 에서 보관했을 때, 피부 조직의 생활력 손실을 시간의 경과에 따라 더욱 정확히 나타냈으며, 임상 데이터와도 일치함을 보고하였다. 이에 피부이식의 경우 피부 조직의 생활도를 양적으로 평가하는 것은 MTT가 더 적절하다고 하였다.

본 실험에서도 MTT에 비해 WST-1은 환경의 영향을 더 더욱 많이 받고, 술자의 숙련도에 따라 그 편차가 있을 수 있음을 보였다. 세포가 아닌 치주인대조직에 대한 평가의 적절성에 대한 연구가 더 필요하리라 생각된다. 또한, MTT와 WST-1의 비용 면에서 WST-1보다 MTT가 상대적으로 저렴하여 쉽게 이용할 수 있다는 장점도 있다.

본 실험에서는 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 MTT 검색법과 WST-1 검색법에 사용하였다.

이렇게 발거된 상악 제1대구치와 제2대구치를 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 등³⁶⁾이 시도한 Eosin 검색법을 이용하였다. 이는 MTT 검색법을 응용하여 세포질의 염기성 물질과 반응한 Eosin을 1% acid alcohol로 탈색시킨 용액의 흡광도를 530 nm에서 측정해서 그 농도를 구해 간접적으로 치주인대세포의 양을 알아보는 것이다. 이렇게 구한 MTT 환원 흡광도를 Eosin 흡광도로 나누어 표준화하면 치주조직의 양이 다른 제1, 2대구치를 치주인대 단위면적으로 환산해 서로간 상호 비교가 가능하다고 하였다.

본 연구에서는 쥐 치주인대세포의 1주간 보관에 있어 온도와 압력간 최적의 조건을 찾고자 하였으며, MTT검색법과 WST-1검색법 모두에서 0℃/2 MPa의 고압 저온 보존한 군이 급속냉동군, 저속 냉동군, 초고압-저온 보관군보다 통계적으로 유의성 있게 높은 활성도를 나타내었다($p < 0.05$). 또한 이것은 양성 대조군인 즉시 발치군보다는 낮은 수치를 보였으나 통계적으로는 유의하지 않았다.

그러나, 이것은 1주 보관의 결과로, 그 이상의 기간에서 더 발전된 연구가 진행되어야 하리라 생각된다. 또한 쥐 치주인대세포가 견딜수 있는 한계 압력을 찾아 내는 것도 매우 의미있는 일이라 할 수 있을 것이다.

V. 결 론

본 연구는 흰쥐 상악 대구치를 발거 후 고압-저온 보관하에 치아냉동 시 치주인대세포의 활성도를 MTT 검색법, WST-1 검색법을 이용해 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MTT 검색법 및 WST-1검색법 결과 0℃/2 MPa 고압 저온 보존군이 즉시 발치군보다 세포 활성도가 낮았으나 통계적 유의차는 없었으며, 저속 압력 냉동군(NAP, 2 MPa, 3 MPa)과, 급속 압력 냉동군(NAP, 2 MPa), 저온보존군(0℃/NAP), 초고압 저온 보존군(-5℃/9 MPa)보다 통계적으로 유의차 있게 높은 세포 활성도를 나타내었다($p < 0.05$).
2. MTT검색법 및 WST-1 검색법 결과 -5℃/90 MPa 초고압 저온 보존군이 가장 낮은 세포 활성도를 나타내었으며, MTT 검색법 결과에서는 모든 군에 대해 통계적으로 유의성 있는 결과를 보였다($p < 0.05$).
3. MTT검색법 및 WST-1 검색법 결과, 2 MPa 저속 압력 냉동군은 3 MPa 저속 압력 냉동군보다 높은 활성도를 나타내었으나, 통계적 유의차는 없었다.
4. MTT검색법 및 WST-1 검색법 결과, 저속 냉동군과 저온 보존군에서 2 MPa의 압력을 가한 군이 압력을 가하지 않은 군(NAP)에 비해 통계적으로 유의성 있게 높은 세포활성도를 나타내었다($p < 0.05$).

위의 결과를 통해, 0℃/2 MPa (20기압)의 고압-저온 보존법이 다른 급속 냉동 보관법(2 MPa, NAP)이나 저속 냉동보관법(2, 3 MPa, NAP), -5℃/90 MPa 초고압 저온 보존법에 비해 우수한 쥐 치아의 치주인대세포의 활성도를 보여 차후 치아의 재이식시 치아보관을 위한 방법으로서의 가능성을 제시하였다.

〈감사의 글〉

본 연구를 진행할 수 있게 해주신 지도교수 이승종 교수님께 감사를 드립니다. 보존과 김의성 교수님, 구강병리학교

실 김진 교수님, 치주과 최성호 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 구강병리학교실 홍준철 선생님께도 감사함을 전합니다.

References

1. 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* 12:425-436, 1983.
2. 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* 14:350-361, 1985.
3. Kristerson L. Autotransplantation of human premolars. A clinical and radiographic study of 100 teeth. *Int J Oral Surg* 14:200-213, 1985.
4. Lindskog S, Blomlof L, Hammarstrom L. Repair of periodontal tissues *in vivo* and *in vitro*. *J Clin Periodontol* 10:188-205, 1983.
5. Melcher AH. Repair of wounds in the periodontium of the rat. Influence of periodontal ligament on osteogenesis. *Arch Oral Biol* 15:1183-1204, 1970.
6. Andreasen JO. Interrelation between alveolar bone and periodontal ligament repair after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *J Periodont Res* 16:228-235, 1981.
7. Andreasen, J. O. and L. Kristerson. "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.
8. Schwartz, O. and C. P. Rank. "Autotransplantation of cryopreserved tooth in connection with orthodontic treatment." *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 90(1): 67-72, 1986.
9. Schwartz, O. Cryopreservation of teeth before replantation or transplantation. Atlas of replantation and transplantation of teeth, Medglobe 241-256, 1992.
10. Rubinsky B. Principles of low temperature cell preservation. *Heart Fail Rev* 8(3):277-284, 2003.
11. Pegg DE. The history and principles of cryopreservation. *Seminars in reproductive medicine* 20(1):5-13, 2002.
12. Chesne C, Guillouzo A. Cryopreservation of isolated rat hepatocytes: a clinical evaluation of freezing and thawing conditions. *Cryobiology* 25(4):323-30, 1988.
13. Kawasaki N, Hamamoto Y, Nakajima T, Irie K, Ozawa H. Periodontal regeneration of transplanted rat molars after cryopreservation. *Archives of Oral Biology* 49: 59-69, 2004.
14. Lee YE, Kim ES, Kim J, Han SH, Lee SJ. Efficacy of programmed cryo-preservation under pressure in rat periodontal ligament cells. *J of Korean Academy of Conservative Dentistry* 34:356-363, 2009.
15. Schluter O, Urrutia Benet G, Heinz V, Knorr D. Metastable states of water and ice during pressure-supported freezing of potato tissue. *Biotechnol Prog* 20:799-810, 2004.
16. Arav A, Natan Y. Directional freezing: a solution to the methodological challenges to preserve large organs. *Semin Reprod Med*. Nov;27(6):438-42, 2009. Epub Oct 5, 2009.

17. 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.
18. Takahashi T, Kakita A, Takahashi Y, I. Sakamoto, K. Yokoyama, T. Fujiu, S. Yamashina, T. Tamaki, Y. Takazawa, R. Muratsubaki. Functional integrity of the rat liver after subzero preservation under high pressure. *Transplantation Proceedings* 32:1634-1636, 2000.
19. Takahashi T, Kakita A, Takahashi Y, Yokoyama K, Sakamoto I, Yamashina S. Preservation of rat livers by supercooling under high pressure. *Transplantation Proceedings* 33:916-919, 2001.
20. 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.
21. 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.
22. 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 and stem cells* 10(3):325-330, 2008.
23. 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.
24. Fowler A. Cryo-injury and biopreservation. *Ann N Y Acad Sci*. Dec:1066:119-35, 2005.
25. Gao D, Critser JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J* 41(4):187-196, 2000.
26. 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.
27. Hyon, SH. A Non-frozen living tissue bank for allo-transplantation using green tea polyphenols. *Yonsei Med J* 45(6):1025-1034, 2004.
28. Bridgman, P. W.: Water in the liquid and five solid forms under pressure. *Proc. Amer. Acad. Arts and Sci.* 47:441-558, 1911.
29. Pribenszky C, Molnár M, Cseh S, Solti L. Survival of mouse blastocysts after low-temperature preservation under high pressure. *Acta Vet Hung.* 52(4):479-87, 2004.
30. Baek DY, Lee SJ, Jung HS, Kim ES. Comparison of viability of oral epithelial cells stored by different freezing methods. *J of Korean Academy of Conservative Dentistry* 34:491-99, 2009.
31. Andreasen JO, Schwartz O. Atlas of replantation and transplantation of teeth. Mediglobe SA, Fribourg, Switzerland. 1992.
32. Kawata T. Tooth transplantation by teeth bank-approach to human-Hiroshima. Department of Orthodontics, Hiroshima University School of Dentistry. 2005.
33. Kaku M, Kamata H, Kawata T. Cryopreservation of PDL cells by use of program freezer with magnetic field for tooth banking. *Dentistry in Japan.* 43:82-86, 2007.
34. Ashwood-smith MJ. Low temperature preservation of cells, tissues and organs. *Pitman Medicals* 19-45, 1980.
35. Farrant J. Water transport and cell survival in cryobiological procedures. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* B278(959):191-205, 1977.
36. 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 of Korean Academy of Conservative Dentistry* 3(3):192-202, 2006.
37. Abe F, Kato C, Horikoshi K. Pressure regulated metabolism in microorganisms. *Trends Microbiol* 7:47-453, 1999.
38. Aldridge BE, Bruner LJ. Pressure effects on mechanisms of charge transport across bilayer membranes. *Biochem Biophys Acta* 817:343-354, 1985.
39. 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.
40. 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* 95:2319-2324, 1998.
41. 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* 40:141-146, 2003.
42. Alahiotis SN. Heat shock proteins. A new view on the temperature compensation. *Comp Biochem Physiol* B75:379-387, 1983.
43. Parsell DA, Lindquist S. The function of heat shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Ann Rev Genet* 27:437-496, 1993.
44. Kwak HJ, Jun CD, Pae HO, Yoo JC, Park YC, Choi BM, Na YG, Park RK, Chung HT, Park WJ, Seo JS. The role of inducible 70-kDa heat shock protein in cell cycle control, differentiation and apoptotic cell death of the human myeloid leukemic HL-60 cells. *Cell Immunol* 187:1-12, 1988.
45. Carlson MA. Technical note: assay of cell quantity in the fibroblast populated collagen matrix with a tetrazolium reagent. *Eur Cell Materials.* 12:44-48, 2006.
46. Kim ES, Jeon IS, Kim JW, Kim J, Juhn HS, Lee SJ. An MTT-based method for quantification of periodontal ligament cell viability. *Oral Diseases* 13(5):495-499, 2007.
47. 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 of Korean Academy of Conservative Dentistry* 33(4):332-340, 2008.
48. 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 and Tissue banking* 2002:3:3-10.

국문초록

고압-저온 보관에 따른 쥐 치아 치주인대세포의 활성화 평가

정진호¹ · 김 진² · 최성호³ · 김의성¹ · 박지용⁴ · 이승종^{1*}

연세대학교 치과대학 ¹치과보존학교실, ²구강병리학교실, ³치주과학교실,

⁴연세대학교 생명시스템대학 생명공학과

본 연구의 목적은 흰 쥐의 상악 대구치를 발거한 후 치주인대세포를 0℃/2 MPa고압-저온하에 1주간 보관시켜 MTT, WST-1 검색법을 이용하여 측정한 치주인대세포의 활성도를 저속 냉동법(No Additional Pressure, 2, 3 MPa), 급속 냉동법(No Additional Pressure, 2 MPa), -5℃/90 MPa초고압 저온보존법과 비교하여 평가하는 것이다.

생후 4주된 암컷 Sprague-Dawley계 흰쥐의 상악 좌우 제1, 2대구치를 발거하여 각 군 당 12개의 쥐 치아를 MTT, WST-1 검색에 이용하였다. 실험군은 9개군으로 대조군은 즉시 발치군이며, 각각 3 MPa, 2 MPa, No Additional Pressure (NAP)의 압력을 가한 후 4℃에서 -35℃까지 -0.5℃/min 속도로 서서히 냉동시킨 뒤 -196℃에 냉동한 저속 냉동군, 발치 후 동해방지제 처리과정을 거쳐 각각 2 MPa, NP의 압력을 가한 후, -196℃의 액화질소에 넣어 냉동한 급속 냉동군, 발치 후 각각 2 MPa, NP의 압력을 가한 후, 0℃에 보관한 저온 보존군, -5℃/90 MPa의 초고압 저온 보존군으로 나누었다. 보존액은 F medium을 사용했으며 동해방지제로 10% dimethylsulfoxide (DMSO)를 사용하였다. 치근면을 단위면적으로 표준화하기 위해 MTT, WST-1 측정값을 Eosin 염색 후 530 nm에서 측정된 흡광도 값으로 나누었다. 통계 분석을 위해 one way ANOVA를 시행하였으며 사후 검정으로는 Tukey HSD 방법을 사용하였고 결과는 다음과 같다.

1. MTT 검색법 및 WST-1 검색법 결과 0℃/2 MPa 고압 저온 보존군이 즉시 발치군보다 세포 활성도가 낮았으나 통계적 유의차는 없었으며, 저속 압력 냉동군(NP, 2 MPa, 3 MPa)과, 급속 압력 냉동군(NP, 2 MPa), 저온보존군(0℃/NP), 초고압 저온 보존군(-5℃/90 MPa)보다 통계적으로 유의차있게 높은 세포 활성도를 나타내었다($p < 0.05$).
2. MTT검색법 및 WST-1 검색법 결과 -5℃/90 MPa 초고압 저온 보존군이 가장 낮은 세포 활성도를 나타내었으며, MTT 검사 결과에서는 모든 군에 대해 통계적으로 유의성 있는 결과를 보였다($p < 0.05$).

위의 결과를 통해, 0℃/2 MPa (20기압)의 고압-저온 보존법이 다른 급속 냉동 보관법(2 MPa, NAP)이나 저속냉동보관법(3, 2 MPa, NAP), -5℃/90 MPa 초고압 저온 보존법에 비해 우수한 쥐 치아의 치주인대세포의 활성도를 보여 차후 치아의 재이식시 치아보관을 위한 방법으로서의 가능성을 제시하였다.

주요단어: 치주인대세포, MTT, WST-1, 활성화도, 고압 저온 보존, 급속 냉동, 압력 저속 냉동