

# Calcium sulfate제재가 치주인대세포에 미치는 영향

이준호\* · 김소영\*\* · 최성호\* · 채중규\* · 조규성\*

\*연세대학교 치과대학 치주과학교실

\*\*연세대학교 치과대학 구강생물학교실

## I. 서 론

치주질환으로 인해 상실된 치주조직을 본래의 형태와 구성으로 회복시키는 것을 치주조직재생술<sup>1, 2, 3, 4, 5)</sup>이라고 하며 치주치료의 궁극적인 목적이라 할 수 있다. 치주영역에서 사용하는 대표적인 재생술 중에는 골 이식술<sup>6)</sup>과 치주조직유도재생술<sup>7, 8, 9)</sup>이 있다. 자가골 이식술은 임상적으로 성공적인 결과를 나타내었으나 이차적인 손상과 대량공급의<sup>10)</sup> 어려움 때문에 동종골 이식술 특히 탈회냉동건조골<sup>11)</sup>사용함으로써 이와 같은 문제를 해결하였다. 그러나 탈회냉동건조골은 질병전이 가능성과 윤리적인 문제로 인해 골 대체물에 대한 관심이 높아졌고 많은 연구가 시작되어졌다.

골 대체물에는 calcium 성분으로 구성된 hydroxyapatite<sup>12)</sup>, tricalcium phosphate<sup>13)</sup>등과 calcium carbonate<sup>14)</sup>, plaster of paris 등이 있으며 이 중 calcium sulfate제재인 plaster of paris는 골 대체물 중 가장 오랫동안 사용되어왔고 많은 임상연구들은 calcium sulfate가 골 결손부 치료에 좋은 결과를 나타낸다고 보고<sup>15-28)</sup>하였다.

Plaster of paris는 gypsum(calcium sulfate dihydrate)을 고온에서 가열하여 수분을 제거한 calcium

sulfate hemihydrate이며 물과 섞으면 발열반응을 통해 경화되며 단단한 결정체로 변하는 성질 때문에 치과 영역에서 사용하게 되었다<sup>29)</sup>. 1955년 Weinmann 등<sup>30)</sup>은 미분화세포가 조골세포로 분화하는데는 칼슘의 작용이 크다고 하였고 Bell<sup>31)</sup>은 개에서 calcium sulfate의 평균흡수율이 4-7주라고 보고하였고 Radentz와 Collings<sup>32)</sup>는 개에서 골 결손부가 큰 부위에 calcium sulfate 이식시 좋은 결과를 가졌다고 보고하였으며 12주에 조직학적으로 치밀한 골 소주 형태를 나타냈으며 골형성이 많이 일어났다고 보고하였다. 반면, Shaffer 등<sup>33)</sup>은 사람에서 calcium sulfate를 이식한 결과 생체적합성은 우수하였지만 신생골 형성을 촉진하지 못한다고 보고하였다.

이상의 연구에서 calcium sulfate는 골 조직의 재생에 좋은 결과를 가져왔지만 이것은 calcium sulfate의 골 재생능력에 의해서라기보다도 염증을 일으키지 않고 빨리 흡수되며 이식골과 판막조직을 안정화시키고 초기 치유기간동안에 상처를 보호하는 성질 때문이라고 할 수 있다.

치주조직 유도 재생술에는 차단막이 이용되어지고 있으며 흡수성 차단막으로는 polylactic acid polymer, oxidized cellulose<sup>34)</sup>, vicryl mesh<sup>35)</sup>, collagen membrane 등<sup>36, 37)</sup>이 있으며 비흡수성 차단막으로는

현재까지 널리 쓰이고 있는 polytetrafluoroethylene(PTFE)막이 있다. PTFE 차단막<sup>38-41)</sup>은 이차적인 제거수술이 필요하고 판막의 두께가 얇으면 치은퇴축이 일어나 감염으로 인한 합병증이 발생할 수가 있다. 따라서 치은퇴축을 야기시키지 않고 결손부의 형태에 따라서 알맞은 크기의 차단막을 형성할 수 있으며 일정기간동안 흡수되지 않고 이차수술이 요구되지 않는 흡수성 차단막에 대한 필요성이 제기되었다. 그리하여 조작성이 간단하고 저렴하며 인체에 무해한 골 이식재로 사용되어온 calcium sulfate를 이제는 새로운 차단막의 재료로 하는 연구가 시작되었다.

Sottosanti는 발치와에 탈회냉동건조골(decalcified freeze-dried bone: DFDB)과 calcium sulfate를 섞어서 넣었을 때 DFDB 입자의 손실을 막고 이식골의 mineralization rate가 촉진된다고 하였고 이는 Peltier<sup>42)</sup>의 개 실험에서, Yamazaki<sup>43, 44)</sup>의 쥐 실험에서 입증해주고 있다. Payne은 ePTFE와 polylactic acid 그리고 sterile calcium sulfate 차단막 위에서 치은섬유세포의 이주를 SEM상에서 관찰한 결과 calcium sulfate에서 세포가 정상적인 부착형태와 더 많은 이주를 나타냈다. Lifecore biomedical사에서 보고한 자료에 의하면 일반 plaster는 다양한 비율의  $\beta$ -hemihydrate calcium sulfate로 구성되며 납과 같은 중금속이 소량 존재하고 입자의 크기와 모양이 다양하며 불규칙한 것이 특징이다. 한편, 임상에서 널리 사용되고 있는 medical grade calcium sulfate는  $\alpha$ -hemihydrate calcium sulfate이며 순도가 높고 입자의 모양과 크기가 일정하여 경화시간과 석고의 밀도 그리고 흡수속도를 정확하게 조절할 수 있는 장점이 있음을 보고하였다.

Calcium sulfate hemihydrate를 물과 혼합하여 사용했을 경우, 조작시간이 짧고, 경화 후 기계적인 자극에 의해 미세한 파절이 일어나 치유를 방해할 수

가 있고 결손부의 크기가 큰 경우 이식한 calcium sulfate가 초기 치유과정에서 빠르게 흡수되는 단점 때문에 보다 다루기 편리하고 경화과정을 거치지 않으며 다양한 골 결손부위에 공간유지와 골생성을 유도하는 새로운 형태의 calcium sulfate제제가 필요하게 되었다.

이에 특수하게 만든 점성이 높고 흡수속도가 느린 새로운 paste형태의 calcium sulfate와 medical-grade calcium sulfate, plaster의 생체친화성을 비교 분석하여 다소의 지견을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 연구재료

#### (1) 치주인대세포의 배양

교정치료를 목적으로 발거한 건강한 제 1 소구치를 Hank's balanced salt solution(HBSS)\*로 3회 세척하여 잔존하는 혈액을 제거한 다음 치근 중간 1/3부위에서 치주인대조직을 #15 blade로 채취하여 세절한 다음 25cm<sup>2</sup>배양접시에 20% Fetal bovine serum(FBS)\*, 100unit/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin, 0.5mg/ml amphotericin-B\*가 포함된  $\alpha$ -minimal essential medium( $\alpha$ MEM)\*을 넣고 37°C, 100%습도, 5% CO<sub>2</sub> 공기혼합배양기\*에서 배양하였다.

치주인대 세포가 조직세편으로부터 증식되어 단층 밀생이 형성되면 75cm<sup>2</sup> 세포배양접시를 이용하여 7-10일간 간격으로 계대배양하였다. 본 실험에서는 세포의 균일한 특성을 얻기 위해 5-7세대의 세포를 사용하였다.

#### (2) calcium sulfate 용출액 제조

24 well 배양접시에 calcium sulfate제재를 1mm두께로 간후 10% FBS가 함유된  $\alpha$ -MEM 2ml를 첨가하

\* : Gibco/BRL Scientific Technologies Inc. USA.

# : Infrared CO<sub>2</sub> incubator, Forma Scientific Inc., USA.

여 37°C의 항온에서 3일간 보관 후 calcium sulfate 시편에서부터 분리되서 나온 불순물을 제거하기 위하여 여과기로 정제하였다.

## 2. 연구방법

### (1) 실험군 설정

$\alpha$ -MEM에서 배양한 세포군을 대조군으로 하고, medical-grade calcium sulfate\*\*용출액을 넣어 배양한 세포군을 MGCS군으로, 일반 plaster용출액을 넣어 배양한 세포군을 plaster‡군으로, 시험개발한 calcium sulfate paste‡용출액을 넣어 배양한 세포군을 CS paste(성분 : calcium sulfate 51%, zinc oxide 30%, polyvinyl acetate 13%, poly-t-butylacrylate 5%, butyl acetate 1%)군으로 실험군을 설정하였다.

### (2) 세포수 산정에 의한 세포증식도 측정

96 well의 배양접시에 각 well당  $1 \times 10^4$ 개의 치주인대 세포를 가진 10% FBS가 함유된  $\alpha$ -MEM 배양액 200 $\mu$ 를 넣은 후 배양기에서 배양하였다.

배양 1일 후 세포가 배양접시 바닥에 완전히 부착된 상태를 확인한 후 배양액을 제거하고 대조군은 10% FBS가 함유된  $\alpha$ -MEM 배양액 200 $\mu$ 를 재주입하고, MGCS군은 medical-grade calcium sulfate 용출액 200 $\mu$ 를, plaster군은 plaster 용출액 200 $\mu$ 를, CS paste군은 modified calcium sulfate paste에 넣은  $\alpha$ -MEM 배양액 200 $\mu$ 를 재주입하며 동일조건하에서 배양하였다.

배양 1일, 2일, 3일 후 배양접시에서 배양액을 제거하고 0.05% trypsin으로 부착세포로 분리한 다음 Tryphan blue로 염색하여 inverted light microscope\*\*하에서 혈구계수기로 세포 수를 측정하였다.

위의 실험은 3회 반복하여 시행하였다.

### (3) MTT assay에 의한 세포독성 측정

세포 수 산정에서와 동일한 방법으로 96 well의 배양접시에 세포를  $1 \times 10^4$ 개씩 분주하고 대조군과 실험군으로 구분하여 동일조건하에서 배양하였다.

배양 1일, 2일, 3일 후 각각 배양접시에서 배양액을 제거하고 새로운 10% FBS가 함유된  $\alpha$ -MEM 100 $\mu$ 를 각각의 well에 첨가시켰다.

생리식염수로 용해한 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)\*\*\*\*용액 150 $\mu$ 를 각 well에 첨가한 후 4시간동안 세포배양을 실시하였다. 세포배양 후 배양액을 제거하고 125 $\mu$ 의 Dimethyl Sulfoxide(DMSO)\*\*\*\*를 첨가하여 형성된 formazan결정을 용해시킨 후 새로운 96 well 배양접시에 각각의 well에 50 $\mu$ 를 첨가하여 배양접시를 잘 흔든 후 ELISA reader\*\*\*로 파장 570nm로 흡광도를 측정하였다. 위의 실험은 3회 반복 시행하였다.

### (4) Immunoblotting assay에 의한 교원질 합성능 측정

세포수 산정에서와 동일한 방법으로 96 well의 배양접시에 세포를  $1 \times 10^4$ 개씩 분주하고 대조군과 실험군으로 구분하여 동일조건하에서 배양하였다.

배양 1일, 2일, 3일 후 각각 배양접시에서 배양액을 제거하고 10mM Tris-Hcl, 100mM Nacl, 1mM PMSF, 1%NP-40, 0.2%SDS가 첨가된 TBS buffer와 섞어서 세포 분해시킨 후 4°C에서 1시간동안 12000rpm에서 원심분리한 후 Bradford방법으로 정량분석하였다.

새로운 96 well 배양접시에 각 well당 1 $\mu$ g의 goat anti-collagen type I 항체®를 깔고 항온항습기에서 하루동안 배양 후 Phosphate buffered saline-

\*\* : Capset®, Lifecore biomedical Co, USA.

‡ : Samwoo chemical, Ulsan, Korea

### : Model ETY-96, Toyo instrument Inc., Tokyo, Japan.

④ : Chemicon International Inc., Ca, U.S.A.

‡ : GC Co., Tokyo, Japan.

### : Model CK-2, Olympus Co., Tokyo, Japan.

\*\*\*\* : Sigma Chemical Co., Mi, U.S.A.

⑤ : Amersham International Plc., Buckinghamshire, England.

Tween(PBS-T) 200 $\mu$ l로 1시간 blocking한 다음 3회 세척하였다. 1 : 2000으로 희석한 goat anti-collagen type I 항체를 1시간 반응시킨 다음 3회 세척한다. 2차 항체인 1 : 1000으로 희석한 horseradish peroxidase conjugated anti-mouse IgG<sup>®</sup>을 1시간 반응시킨 다음 3회 세척하였다. O-phenylenediamine(OPD)<sup>\*\*\*</sup>를 buffer에 최소 20분 동안 녹인 후(이 때 light blocking이 필요) 분주하기 직전에 H2O2를 넣어 분주하여 암실에서 20분 동안 반응시킨 다음 2M H2SO4 50ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 ELISA reader<sup>\*\*\*</sup>로 파장 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

(5) 통계분석

여러 군들 가운데서 유의성있는 차이를 알아내기

위해 비모수적 방법인 Kruskal-Wallis test를 시행하고 군들 사이의 차이는 Tukey's studentized range test를 시행하였으며 모든 실험에서 P<0.05를 유의한 수준으로 평가하였다.

III. 연구결과

1. 세포수 산정에 의한 세포증식도 측정

한 개의 대조군과 3개의 실험군으로 나누고 각 군마다 4개의 표본을 이용하여 실험을 3회 실시하였다. CS paste군의 median과 range값이 1일에 각각 0.2와 0~0.4, 2일에 0와 0, 3일에 0와 0~0.6로 나타나 1, 2, 3일째 모두에서 다른 군들과 비교시 유의성

표 1 The effect of different forms of calcium sulfate on periodontal ligament cell counting(unit:×10000cell)

|         | day 1  |         | day 2  |         | day 3  |         |
|---------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|
|         | median | range   | median | range   | median | range   |
| control | 5,8    | 5,0-7,0 | 5,4    | 3,8-6,2 | 6,8    | 4,8-7,2 |
| MGCS    | 4,8    | 3,2-5,8 | 4,2    | 3,2-5,4 | 6,0    | 5,0-6,2 |
| plaster | 3,0**  | 2,2-4,8 | 3,4    | 2,4-4,8 | 5,6    | 2,8-6,2 |
| CSpaste | 0,2*   | 0,0-0,4 | 0*     | 0       | 0*     | 0,0-0,6 |

\*cs paste group: significantly different compared to all other groups

\*\*plaster group: significantly different compared to day 1 of the control group

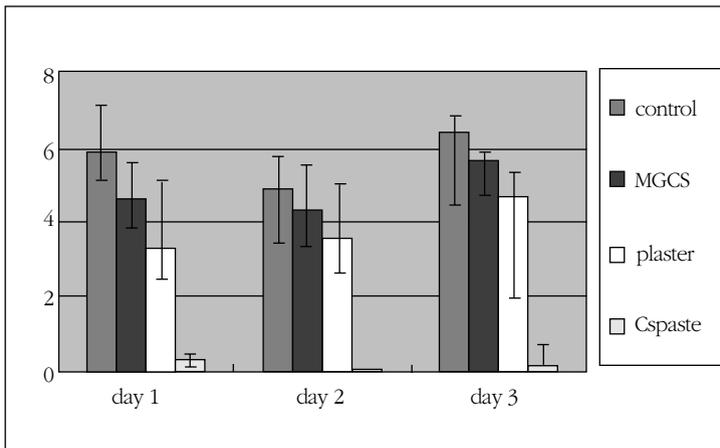


그림 1 The effect of different forms of calcium sulfate on periodontal ligament cell counting(×10000)

있는 차이를 나타냈다. 한편, plaster군은 1일째에서 median과 range값이 각각 0.2와 0.0~0.4로 나타나 다른 군들과 비교시 1일째에서 유의성있는 차이가 나타났(P<0.05)(표 1)(그림 1).

## 2. MTT assay에 의한 세포독성 측정

한 개의 대조군과 3개의 실험군으로 나누고 각 군마다 4개의 표본을 이용하여 실험을 3회 실시하였다. CS paste군의 median과 range값이 1일에 각각 0.03와 0.029~0.04, 2일에 0.015와 0.01~0.019 3일에 0.06와 0.013~0.19로 나타나 1, 2, 3일째 모두에서 다른 군들과 비교시 유의성있는 차이를 나타냈다

(P<0.05)(표 2)(그림 2).

## 3. Immunoblotting assay에 의한 교원질합 성능 측정

MGCS군은 1일에 0.13, 2일에 0.19, 3일에 0.27로 나타나 점점 증가되는 양상을 보였고 plaster군은 1일에 0.17, 2일에 0.17, 3일에 0.36로 나타나 2일째까지 증가하지 않다가 3일째에 높게 나타났으며 CS paste군은 1일에 0.09, 2일에 0.12, 3일에 0.17로 나타나 증가하는 양상을 보이거나 다른 군들과 비교시 낮은 수치를 나타냈다(표 3)(그림 3).

표 2 The effect of different forms of calcium sulfate on MTT assay of periodontal ligament cells

|         | day 1  |            | day 2  |            | day 3  |            |
|---------|--------|------------|--------|------------|--------|------------|
|         | median | range      | median | range      | median | range      |
| control | 0.34   | 0.29-0.75  | 0.64   | 0.54-0.77  | 0.53   | 0.46-0.64  |
| MGCS    | 0.13   | 0.11-0.48  | 0.52   | 0.33-0.64  | 0.37   | 0.32-0.54  |
| plaster | 0.34   | 0.29-0.42  | 0.72   | 0.32-0.99  | 0.55   | 0.47-0.64  |
| CSpaste | 0.03*  | 0.029-0.04 | 0.015* | 0.01-0.019 | 0.06*  | 0.013-0.19 |

\*cs paste group: significantly different compared to all other groups

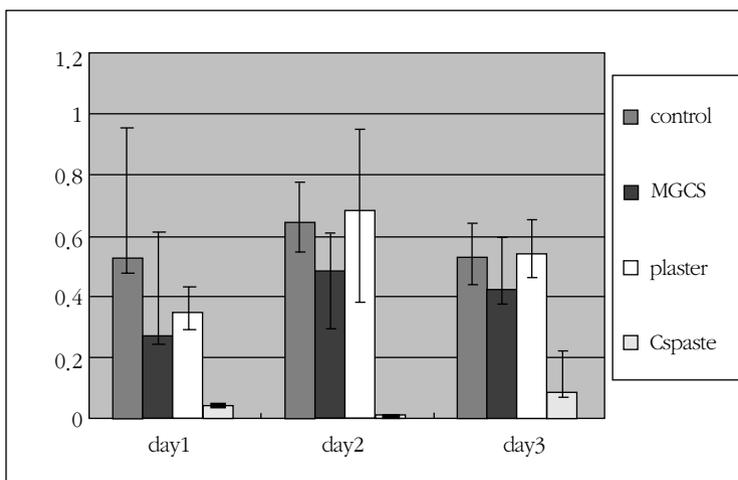


그림 2 The effect of different forms of calcium sulfate on MTT assay of periodontal ligament cells

표 3 The effect of different forms of calcium sulfate on collagen type 1 synthesis by ELISA.

|          | day 1 | day 2 | day 3 |
|----------|-------|-------|-------|
| control  | 0,38  | 0,59  | 0,36  |
| MGCS     | 0,13  | 0,19  | 0,27  |
| plaster  | 0,17  | 0,17  | 0,36  |
| CS paste | 0,09  | 0,12  | 0,17  |

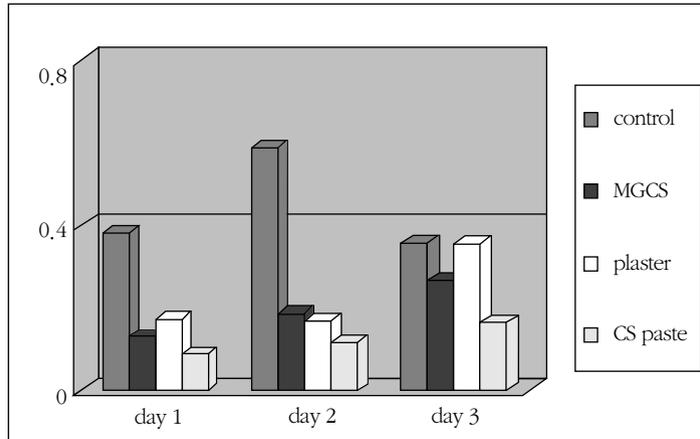


그림 3 The effect of different forms of calcium sulfate on collagen type 1 synthesis by ELISA

## VI. 총괄 및 고찰

현재 임상에서 사용되고 있는 calcium sulfate는 일반석고인 plaster, medical-grade plaster of paris (Edgemark)와 hydroxylapatite(Hapset), 그리고 medical-grade calcium sulfate(Capset)가 있으며 Lifecore biomedical사에서 보고한 바에 의하면 위 제재들의 주성분은 calcium sulfate이고 제재간의 차이는 입자의 크기와 모양이며 medical-grade plaster of paris는 입자가 1/10 gm pellet 크기이고 Capset은 100 mesh, Hapset은 20-100 mesh의 크기로 나타났다. 한편, plaster는 전자현미경상에서 볼 때 입자의 크기와 모양이 매우 다양하게 나타난다.  $\beta$ -hemihydrate calcium sulfate인 Plaster의 입자는 다공성이며 불규칙하지만  $\alpha$ -hemihydrate calcium sulfate인 Capset은 입자의 모양이 모두 각기둥으로 되어있고

크기도 일정하다. 일반적으로 입자의 크기는 혼수비, 경화시간 그리고 경화 후의 강도와 다공성에 영향을 주어 물리적인 성질을 좌우시킨다.

이러한 재료과학적인 성질이 어떠한 생물학적인 효과를 갖는지에 대한 보고는 아직 없다. 기존의 calcium sulfate의 임상적인 가치는 우수한 생체적합성과 수술부위의 치유조직과 이식체의 안정화에 있다. 그러나, calcium sulfate는 매우 빠른 흡수율을 나타내며 4주가 지나면 거의 남아있지 않는 것이 가장 큰 단점이다. 이러한 성질 때문에 골 결손부의 크기가 큰 경우에는 나쁜 결과를 나타낸다. 또한 임상에서 calcium sulfate를 몰과 혼합해서 수술부위에 적용할 때 출혈이 있는 곳에서는 calcium sulfate가 잘 굳지 않아 결손부위에 채우기 힘들고 작업시간의 제한이 있으며 일차치유가 되더라도 약간의 물리적인 자극이 가해지면 이식한 calcium sulfate가 파절 되기 쉬

우며 carrier로 사용했을 경우에도 경화과정에서 발생하는 열로 인해 Bone morphogenic protein과 같은 성장인자를 파괴시킬 수 있다.

따라서, 본 연구에서는 이러한 단점들을 보완할 수 있는 새로운 calcium sulfate제재인 modified calcium sulfate paste를 시험 개발하여 in vitro에서 치주인대 섬유세포에 대한 생체적합성을 시험하여 새로운 paste형태의 calcium sulfate의 사용가능성을 알아보고자 하였다.

단위세포를 이용하여 세포독성을 시험하고 생체적합성을 검증하는 것이 중요한데 일반적인 세포독성 측정검사 방법으로는 약제의 작용 후 생활세포수 산정방법, 세포분해 후 단백질 측정방법, 세포증식시 방사선 동위원소를 이용하는 방법들이 있다.

현재, 널리 사용되어지고 있는 세포독성측정방법으로는 효소활성시험인 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)]test가 있으며 색의 차이를 이용하여 세포의 수나 활성도를 알 수 있다<sup>3)</sup>.

MTT 용액속에 있는 tetrazolium ring이 활성화된 미토콘드리아 내에 있는 dehydrogenase와 반응하여 비용해성의 푸른색의 MTT formazan을 형성하게 된다.

MTT assay는 이러한 색의 변화정도를 ELISA reader를 이용하여 감지시켜서 흡광도를 측정하여 세포독성이나 활성정도를 알 수 있게 해주는 방법으로 다른 세포수 산정이나 방사선 동위원소 등을 이용하는 것보다 한번에 많은 양을 정확하고 간단하게 측정하는 방법이다.

세포수 산정방법으로는 tryphan blue 용액을 배양된 세포와 섞은 후 hemocytometer를 이용하여 광학현미경으로 관찰하여 살아있는 세포의 수를 측정하는 것이며 수동적으로 측정하는 방법이기 때문에 실험하는 과정에서 세포를 배양접시로부터 분리시킬 때나 균일하게 세포를 분산시킬 때 주의를 해야한다.

본 실험에서는 24 well을 이용하여 well당 1mm 두께의 calcium sulfate를 깎 후 고압증기소독을 시행하고 나서 배지를 well 안에 넣고 3일 동안 배양기에 보관하여 용출액을 제조하였다. 만든 calcium sulfate용출액을 정제하고 치주인대세포가 있는 배양 접시에 넣어 배양하였다. 섬유아세포는 세포부착이 잘 되는 환경에서 성장을 할 수 있고 calcium sulfate시편 위에서는 직접 배양하는 것이 어려워서 위와 같은 방법으로 실험을 하였다.

일반적으로 세포수 산정에 의한 세포증식도를 보면, 세포독성을 나타내는 약제가 단위세포에 영향을 미치는 경우 시간이 경과함에 따라 세포독성이 서서히 증가하여 세포의 수가 감소되다가 최대로 독성효과를 나타내고 난 후 세포의 수가 정체되어가는 경향을 나타낸다.

본 실험에서는 대체적으로 대조군, 실험군에서 시간이 경과함에 따라

세포증식이 멈추다가 3일째에 증식되는 성장양상을 보였으며 특히 MGCS군은 1, 2, 3일에서 plaster군은 2, 3일에서 대조군과 비교시 유의차가 없는 것으로 나타나, 순도가 높은 medical-grade calcium sulfate나 소독된 일반 plaster를 물과 혼합하여 얻어진 결정체에서는 유해한 독성물이 유리되지 않는 것으로 추정할 수가 있다. 한편 1 일째에서는 plaster군에서 대조군과 유의성 있는 차이가 있게 보였는데 이는 초기에 치주인대세포가 plaster에 대해서 약간의 거부반응을 나타낸 것으로 관찰이 된다. CS paste군은 다른 군들과 비교시 유의차가 나타났으나 calcium sulfate paste는 세포독성이 있음을 보여주며 치주인대 섬유세포의 성장을 억제하는 것으로 나타났다.

MTT assay에 의한 세포독성을 보면, CS paste군을 제외한 모든 군에서 2일째에 높게 나타났으며 3일째에 약간 떨어지는 양상을 보여 세포수 산정결과와 비교시 초기에 세포성장 양상이 더 두드러지게 나타났다. 한편, MGCS군과 plaster군은 대조군과 비교시

유의성있는 차이가 없게 나타났고 CS paste군은 다른 군들과 비교시 1, 2, 3일에서 모두 유의차가 있게 나타나 세포수 산정에서의 결과와 비슷하게 나타났다.

치주조직의 결합조직은 주로 섬유성 교원질로 구성되며 나머지는 비교원성 단백질, glycosaminoglycan과 소량의 elastin으로 구성되어 있는데 치주인대에 존재하는 교원질은 Type I collagen이며 94%이상의 많은 비율을 차지하고 있다. 교원질은 섬유아세포가 만들어낼 뿐만 아니라 그것의 분해도 일부분 담당하며 collagenase나 phagocytic collagenolytic mechanism과는 독립적이고 collagen대사의 정상과정이다. 교원질의 합성은 질환에 이환된 부위의 치유과정 및 조직의 구조와 기능을 유지하는데 있어서 중요하다. 또한 치은과 치주인대 교원질의 turnover rate는 매우 높아서 교원질합성이나 분해율에 약간의 변화가 있어도 치주조직의 교원질 섬유가 크게 떨어지거나 많아질 수 있다.

본 실험에서는 교원질의 합성능을 항원성 epitope와 결합하는 항체를 이용하여 cell lysis에서 얻은 collagen extract로부터 원하는 교원질(항원)에 일차항체를 부착시키고 나서 다시 horseradish-peroxidase 효소가 붙어있는 이차항체를 결합시켜 효소반응으로 인한 색깔변화를 흡광도를 측정하는 ELISA 방법을 이용하였다.

ELISA를 이용한 세포활성도시험을 시행한 결과 대조군에서는 전형적인 세포성장곡선을 보여주었고 MGCS군과 plaster군에서 1일과 2일에 교원질 합성능력이 낮게 나타났지만 3일에는 증가하는 양상을 띄고 있어 대조군과 비교시 1일과 2일에는 차이가 있었지만 3일에는 차이가 줄어든 것으로 나타나 독성에 의한 원인보다는 외부약제가 단위세포에 자극시 단위세포가 새로운 환경에 적응하여 본래의 세포의 기능을 회복하는 과정에서 나타난 결과라 생각됨으로 두 가지 제재가 생체 적합성이 있는 것으로 간주할 수 있다. CS paste군은 다른 군들과 비교 시 1,

2, 3일에서 모두 낮게 나타났으며 다른 시험들에서 보여준 결과와 비슷하게 나타났다.

본 실험에서 나타났듯이 medical-grade calcium sulfate와 plaster는 입자의 제조과정과 용도의 차이에도 불구하고 생체적합성과 교원질 합성능에서 비슷한 결과를 가졌다. 그 이유는 이 두 가지 재료가 모두 순도가 높은 calcium sulfate이기 때문이라고 판단되며 calcium sulfate paste는 유기성분들이 상대적으로 많이 존재하고 있기 때문에 좋지 않는 결과가 나타난 것으로 생각된다. 한편, calcium sulfate paste가 물과 반응했을 때 시간이 지나도 경화가 되지 않는 것으로 보아 주성분이 hemihydrate가 아닌 dihydrate calcium sulfate인 것으로 생각된다. 또한 실험하는 과정에서 용출액의 제조를 calcium sulfate시편을 고압증기소독을 시행한 후에 하였기 때문에 경화과정을 다 거친 calcium sulfate와 유기성분과 혼합된 calcium sulfate paste는 불순물의 누출 양이 다르게 나타난 것으로 생각된다. 앞으로 이러한 문제들을 해결하는데 있어서 순도가 더 높고 물과 반응했을 때 경화가 천천히 일어나는 개선된 형태의 calcium sulfate를 향해서 연구해야 할 것이다.

## V. 결론

서로 다른 특징을 갖는 calcium sulfate제제를 이용하여 생체적합성과 세포활성도를 알아보고자 치주인대세포를 10% FBS가 함유된  $\alpha$ -MEM에서 배양한 후  $\alpha$ -MEM에서 배양한 군을 대조군으로 하고 동일한 배지조건 하에서 medical-grade calcium sulfate를 넣어서 배양한 군(MGCS군), 기공용 석고를 넣어서 배양한 군(plaster군), 시험개발한 modified calcium sulfate paste를 넣어서 배양한 군(CS paste군)을 실험군으로 하여 세포배양 1, 2, 3일에 각군의 세포수 산정, MTT assay, 교원질 합성능을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 세포수 산정에 의한 세포증식에 있어서 medical-grade calcium sulfate군과 plaster군은 대조군과 비교시 1일째 plaster군을 제외하고 1, 2, 3일에 유의성있는 차이가 없었고 calcium sulfate paste군은 다른 군들과 비교시 1, 2, 3일에 유의성있는 차이가 있었다( $P < 0.05$ ).
2. MTT assay에 의한 세포독성에 있어서 medical-grade calcium sulfate군과 plaster군은 대조군과 비교시 1, 2, 3일에 유의성있는 차이가 없었고 calcium sulfate paste군은 1, 2, 3일에 다른 실험군들과 비교시 유의성있는 차이가 있었다 ( $P < 0.05$ ).
3. ELISA에 의한 교원질합성능에 있어서 calcium sulfate군과 plaster군은 calcium sulfate paste군에 비해서 1, 2, 3일째에 높게 나타났다.  
이상의 결과에서 볼 때 medical-grade calcium sulfate와 plaster는 생체적 합성이 나타났으나 시험개발한 calcium sulfate paste는 생체적합성을 위해 더욱 성분의 개량이 요구된다.

## VI. 참고문헌

1. Aukhil, I., Petersson, E., Sugges, C. : Guided tissue regeneration. An experimental procedures in beagle dogs, J. Periodontol., 57:72, 1986.
2. Aukhil, I., Ighaut, I. : Periodontal ligament cell kinetics following experimental regenerative procedures, J. Clin. Periodontol., 15:374, 1988.
3. Melcher, A. H. : On the repair potential of periodontal tissue, J. periodontol., 47:256, 1976.
4. Nyman, S., Gottlow, J., Karring, T., Lindhe, J. : The regenerative potential of the periodontal ligament : An experimental study in the monkey, J. Clin. Periodontol., 9:257, 1982.
5. Nyman, S., Lindhe, J., Karring, T., Rylander, H. : New attachment following surgical treatment of human periodontal disease, J. Clin. periodontol., 9:290, 1982.
6. Magnusson, I., Batich, C., Collins, B. R. : New attachment formation following controlled tissue regeneration using biodegradable membrane, J. Periodontol., 59:1, 1988.
7. Becker, W., Becker, B. E. : Guided tissue regeneration for implants placed into extraction sockets and for implant dehiscences : Surgical techniques and case reports, Int. J. Periodont. Resto. Dent., 10:377, 1990.
8. Payne, J. M., Cobb, C. M., Rapley, J. W., Killoy, W. J., Spencer, P. : Migration of human gingival fibroblasts over guided tissue regeneration barrier materials, J. Periodontol., 67:236, 1996.
9. Pontoriero, R., Nyman, S., Ericsson, I., Lindhe, J. : Guided tissue regeneration in surgically produced furcation defects : An experimental study in the beagle dog, J. Clin. Periodontol., 19:159, 1992.
10. Nabers, C. L., O'Leary, T. J. : Autogenous bone transplants in the treatment of osseous defects, J. Periodontol., 36:5, 1965.
11. Mellonig, J. T. : Clinical evaluation of freeze-dried bone allografts in periodontal osseous defects, J. Periodontol., 47:125, 1976.
12. Hanker, J. S., Tucker, M. R. : Composite plaster/hydroxylapatite implants for jaw bone restoration, Mat. Res. Soc. Symp. Proc., 55:77, 1986.
13. Strub, J. R., Gaberthal, T. W., Firstone, A. R. : Comparison of tricalcium phosphate and

- frozen allogenic bone implants in man, J. Periodontol., 50:624, 1979.
14. 최미령, 조규성, 채중규, 김종관 : 성견의 3면골 내낭에 calcium carbonate와 calcium sulfate의 혼합이식이 치주조직 치유에 미치는 영향, 대한치주과학회지 24(3):633, 1994.
  15. Alderman, N. E. : Sterile plaster of Paris as an implant in the infrabony environment : a preliminary study, J. Periodontol., 40:11, 1969.
  16. Andries, S. C. : Regeneration of bone in the presence of calcium sulfate, Arch. Otolaryngol. 106:405, 1980.
  17. Anson, D. : Calcium sulfate : A 4-year observation of its use as a resorbable barrier in guided tissue regeneration of periodontal defects, Compend. Cont. Ed., 17 : 895, 1996.
  18. Calhoun, N. R., Greene, G. W., and Blackledge, G. T. : Effects of plaster of Paris implants on osteogenesis in the mandible of dogs, J. Dent. Res., 42:1244, 1963.
  19. Conner, H. D. : Bone grafting with a calcium sulfate barrier after root amputation, Compend. Cont. Ed., 17:42, 1996.
  20. Sottosanti, J. S. : Aesthetic extraction with calcium sulfate and the principle guided tissue regeneration, Pract. Periodont. & Aesthetic. Dent., 5:62, 1993.
  21. Sottosanti, J. S. : Calcium sulfate : A biodegradable and biocompatible barrier for guided tissue regeneration, Compend. Cont Ed., 13:226, 1992.
  22. Sottosanti, J. S. : Calcium sulfate is a safe, resorbable barrier adjunct to implant surgical procedures, Dental Implantology Update., 4:69, 1993.
  23. Sottosanti, J. S. : Bone grafting with a calcium sulfate barrier after root amputation, Compend. Cont. Ed., 17(1):42, 1996.
  24. Sottosanti, J. S. : Calcium sulfate - aided bone regeneration : A case report, Periodontal. Clin. Invest., 17(2):10, 1995
  25. 정유선, 김종관 : 성견 3면 골내낭에서 calcium sulfate를 calcium carbonate와 혼합이식 및 차단막으로 사용시 치주조직의 치유효과, 연세치대 논문집 11:171, 1995.
  26. 최동훈, 최성호, 조규성, 채중규, 김종관, 문익상 : The effect of calcium sulfate on periodontal healing of 2 wall intrabony defects in dogs, 대한치주과학회지 27(2):395, 1997.
  27. 채중규, 김종관, 조규성, 문익상, 김진, 한수부, 최상묵 : Healing following transplantation of periodontitis-affected roots with calcium sulfate in the extracted socket, 연세치대논문집 10:147, 1995.
  28. 김종관, 채중규, 조규성, 김성희, 서혜연 : Periodontal healing in intrabony defects treated with demineralized freeze-dried bone allografts in conjunction with ePTFE membranes, 대한치주과학회지 26(3):21, 1996.
  29. Skinner, E. W., Philips, R. W. : Skinner's Science of Dental Materials, W. B. Saunders Co, 8th edition, 1982.
  30. Weinmann, L. P., and Sicher, H. : Bone and Bones, Ed.2, St. Louis, C.V. Mosby Co., 1955.
  31. Bell, W. H. : Resorption characteristics of bone and bone substitutes, Oral Surg., 17:650, 1964.
  32. Radentz, W. H., and Collings, C. K. : The implantation of plaster of Paris in the alveolar process of the dog, J. Periodont., 36:357, 1965.
  33. Shaffer, C. D., and App, G. R. : The use of

- plaster of Paris in treating infrabony periodontal defects in humans, *J. Periodontol.*, 42:685, 1971
34. Galgut, P.N. : Oxidized cellulose mesh used as a biodegradable barrier membrane in the technique of guided tissue regeneration. A case report, *J. Periodontol.*, 61:766, 1990.
  35. Fleisher, H. Waal, H.D., Bloom, A. : Regeneration of lost attachment apparatus in the dog using vicryl absorbable mesh (Polyglactin 910®), *Int. J. Periodont. Resto. Dent.*, 8:45, 1988.
  36. Blumenthal, N. M., Sabet, T. W., Barrington, E. : Healing response to grafting combined collagen-decalcified bone in periodontal wound healing, *J. Periodontol.*, 57, 1986.
  37. Pitaru, S., Tai, H., Soldinger, M., Grosskopf, A., Noff, M. : Partial regeneration of periodontal tissues using collagen barriers. Initial observations in the canine, *J. Periodontol.*, 59:380, 1988.
  38. Selvig, K. A., Kersten, B. G., Wilkesj, U. M. E. : Surgical treatment of intrabony periodontal defects using e-PTFE barrier membranes : Influence of defect configuration on healing response, *J. Periodontol.*, 64:733, 1993.
  39. Selvig, K. A., Kersten, B. G., Chamberlain, A. D., Wilkesj, U. M. E., Nilveus, R. E. : Regenerative surgery of intrabony periodontal defects using e-PTFE barrier evaluation of retrieved membranes versus clinical healing, *J. Periodontol.*, 63:974, 1992.
  40. Selvig, K. A., Nilveus, R. E., fitzmorris, L., Kersten, B., Khorsandi, S. S. : Scanning electron microscopic observations of cell population and bacterial contamination of membranes used for guided periodontal tissue regeneration in humans, *J. Periodontol.*, 61:515, 1990.
  41. Simion, M., Baldoni, M., Rossi, P., Zaffe, D. A. : Comparative study of the effectiveness of e-PTFE membranes with and without early exposure during the healing period, *Int. J. Periodont. Resto. Dent.*, 14:167, 1994.
  42. Peltier, L., Lillo, R. : The substitution of Plaster of Paris rods for portions of the diaphysis of the radius in dogs, *Surg. Forum.*, 6:556, 1955.
  43. Yamazaki, A., Oida, S., and Akimoo, Y. : Response of mouse femoral muscle to an implant of a composite of morphogenetic protein and plaster of Paris, *Clin. Orthop.*, 234:240, 1988.
  44. Kim, C. K., Chai, J. K., Cho, K. S., Choi, S. H., Sottosanti, J. S., Wilkesj, U. M. : Periodontal repair in intrabony defects treated with a calcium sulfate implant and calcium sulfate barrier, *J. Periodontol.*, accepted, 1998.
  45. Freshney, R. I. : *Culture of Animal cells*, 3rd ed, Wiley-liss, Inc., 1994.

## The effects of calcium sulfate on periodontal ligament cells

Jun-Ho Lee\*, So-Young Kim\*\*, Seong-Ho Choi\*, Jung-Kiu Chai\*, Kyoo-Sung Cho\*

\*Department of Periodontology, College of Dentistry, Yonsei University

\*\*Department of Oral biology, College of Dentistry, Yonsei University

Calcium sulfate has a long history of medical use as an implant material. The biocompatibility of the material has been clearly established. Bone ingrowth concomitant with resorption occurs rapidly with efficient conduction of bone from particle to particle. Calcium sulfate also has a potential for functioning as a good barrier membrane.

The purpose of this study was to compare the biocompatibility of different types of calcium sulfate grafting materials including an experimental calcium sulfate compound on periodontal ligament cells in vitro as a preliminary test towards the development of a more convenient and useful form of grafting material which could promote regeneration of periodontal tissue. Human periodontal ligament cells were collected from the premolar teeth extracted for orthodontic treatment. Cells were cultured in  $\alpha$ MEM culture medium containing 20% FBS, at 37°C and 100% humidity, in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. Cells were cultured into 96 well culture plate 1×10<sup>4</sup> cells per well with  $\alpha$ -MEM and incubated for 24 hours. After discarding the medium, those cells were cultured in  $\alpha$ MEM contained with 10% FBS alone (control group), in medical-grade calcium sulfate (MGCS group), in plaster (plaster group), experimental calcium sulfate paste (CS paste group) for 1, 2, 3 day respectively. And then each group was characterized by examining of the cell counting, MTT assay, collagen synthesis.

The results were as follows.

1. In the analysis of cell proliferation by cell counting, both medical-grade calcium sulfate group and plaster group showed no statistically significant difference at day 1, 2, 3 except for plaster group at day 1 compared to control group, but there was statistically significant difference between CS paste group and all other groups at day 1, 2, 3 ( $P < 0.05$ ).
2. In the analysis of cytotoxicity by MTT assay, both medical-grade calcium sulfate group and plaster group showed no statistically significant difference compared to control group at day 1, 2, 3 but there was statistically significant difference between CS paste group and all other groups at day 1, 2, 3 ( $P < 0.05$ ).
3. In the analysis of collagen synthesis by immunoblotting assay, high level was detected for medical-grade calcium sulfate group and plaster group at day 1, 2, 3 compared to CS paste group. On the basis of these results, medical-grade calcium sulfate and plaster was shown to possess biocompatibility whereas the CS paste had unfavourable outcome. This observation shows a need for modification of the materials contained

in calcium sulfate paste.

---

Key words : medical-grade calcium sulfate, periodontal ligament cell, biocompatibility, MTT assay, collagen synthesis