

염산테트라사이클린으로 처리한 치근면의 치은상피세포부착에 관한 연구

황나영 · 박병기 · 김상목 · 국중기 · 박주철 · 김병옥*

조선대학교 치과대학 치주과학교실*, 구강조직학교실, 구강생화학교실

I. 서론

건강한 치주조직은 치주질환이 진행됨에 따라 치주낭의 형성, 치은 결체조직 및 치주인대의 파괴 등이 나타나고, 치조골 흡수와 치아 동요가 심화되어, 결국 치아의 상실을 초래하게 된다²⁴⁾. 그러므로 치주치료의 목적은 질환의 진행을 억제시키고, 치근 표면에 결합조직과 교원섬유의 재부착, 그리고 백악질 형성에 의한 소실된 치조골의 재생을 도모하여 정상적인 기능을 발휘할 수 있는 치주조직을 형성하는데 있다^{2, 11, 24, 28)}.

이러한 치료목적을 달성하기 위해서는 치주질환의 주요 원인 인자인 치태 및 치석이 제거되어야 하고¹⁹⁾, 괴사된 백악질 및 내독소를 제거하여 새로운 섬유 세포의 부착 및 배열이 증진될 수 있도록 병적인 치근표면의 성질을 변화시켜야 한다^{1, 23)}. 치석제거술과 치근면 활택술은 기계적인 방법으로 치근 표면 성질을 변화시키는 대표적인 방법이다^{8, 41)}. 그러나 Polson 등²⁹⁾은 이런 기계적 방법들만으로는 완벽한 세균성 물질의 제거가 불가능하며, 세포의 재부착을 방해하는 도말층 역시 전부 제거할 수가 없다고 보고하였다. 따라서 내독소 및 도말층을 제거하기 위한 화학요법제로 인산(phosphoric acid)³⁰⁾, ethyl-

ene diamin tetraacetic acid(EDTA)²¹⁾, 구연산²⁷⁾, 그리고, 염산테트라사이클린(tetracycline hydrochloride)⁶⁾과 같은 약제를 소개하였는데, Terranova 등³⁴⁾과 Zaman 등⁴¹⁾은 이와 같은 약제들이 부가적으로 신생결합조직의 부착을 도모한다고 보고하였고, Lasho 등²⁰⁾은 혈병의 부착을 증진시켜서, 상피의 하방증식을 억제하는 기능을 가진 것으로 보고하였다.

이러한 화학요법제 중 Labahn 등¹⁸⁾은 TC-HCl가 고유의 항생효과를 가지므로 임상적으로 치주질환 원인세균의 제거를 위해 흔히 사용된다고 보고하였으며, 또한 염산성분에 의한 산성 pH를 가지고 있기 때문에 치근표면을 탈회시키고, 도말층을 제거할 수 있다고 하였다. 그리고 Larjava 등¹⁹⁾과 Terranova 등³⁵⁾은 TC-HCl이 백악질과 상아질의 구조변성과 단백질의 노출을 유도하여 결합조직 세포의 부착을 증강시킨다는 연구결과를 발표하였다.

현재까지 TC-HCl과 치은섬유아세포의 부착에 관해 Garrett 등¹²⁾은 탈회시 상아질 기질내 교원질을 노출시켜 새로운 백악질이 형성되지 않고도 신생 교원질이 직접 치근면에 결합할 수 있어 결합조직의 부착력이 증진된다고 하였고, Lowenberg 등²²⁾은 탈회된 경우에 교원섬유의 배열이 빨라서 섬유모세포의 부착 및 배

* 2001년도 조선대학교 교육문화재단 연구비에 의해 연구

교신 저자: 황나영, 광주광역시 동구 서석동 421번지 조선대학교치과대학 치주과학교실, 우편번호: 501-825

열이 증진된다고 보고하였고, Boyko등⁹⁾은 치질내 포 함된 수산화인회석보다는 노출된 교원질이 세포부착에 더 좋은 매개체를 제공한다고 보고하였다.

치주조직의 재생을 도모하기 위한 TC-HCl과 치은 섬유모세포와의 관계에 관한 연구는 많이 진행되어져 왔으나, 치주외과 수술 후 흔히 나타나는 긴 접합 상피에 의한 치유³⁶⁾에서 치은상피세포와 TC-HCl의 관계에 대한 연구는 드물었다.

이 연구는 치주질환에 이환된 치근면을 TC-HCl로 처리한 후, 상피세포의 부착실험을 통해 TC-HCl이 세포에 미치는 영향을 규명하고자 시행하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 치은상피세포 배양

부분 매복된 하악 3대구치를 발거하기 위해 내원한 23세 미만의 환자 중 치주조직이 건강한 사람에서 협부 정상치은을 채취하였다. 채취된 조직을 3mm X 3mm의 크기로 절단한 다음 항생제가 함유된 Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco/BRL, N.Y., USA)으로 3-4회 세척하고, 단백질 분해 효소(0.4% Dispase II, B.M + Collagenase grade II, Sigma, Inc. USA)를 이용하여 2시간동안 37°C, 100% 습도, 5% CO₂가 공급되는 탄산가스배양기에 넣고 배양한 후 상피조직과 결합조직세포를 분리하였다³²⁾. 이 후 분리된 상피 조직편을 배양 접시내에서 1mm³내외 크기의 조각으로 세절하고, 37°C에서 0.05% trypsin과 0.53mM ethylenediamine-tetraacetic acid(EDTA)로 처리하여 세포들을 분리한 후 keratinocyte growth medium(KGM, Clonetics, BioWhittaker, Inc. Walkersville, USA)을 이용하여 배양하였다^{16,31,33)}. 배지는 이틀에 한번씩 교체하고 세포가 증식함에 따라 계대배양하여 제 3세대의 구강 상피세포를 본 실험에 이용하였다.

2. 치아절편의 제작

치주질환 인해 발거된 72개의 치아를 연구재료로

선별하였다. 이 중, 치아우식이 심하거나, 수복 및 근관처리가 시행되어진 치아, 그리고 과도한 치근 만곡 치아는 제외하였다. 선택된 치아에 대하여 초음파 치석제거기로 치석을 제거하고 생리식염수 세척과 함께 큐렛으로 3분동안 치근면 활택술을 시행한 후 치근의 중앙 1/3부분에서 크기 3mm X 3mm, 두께 150-200 μ m,의 사각형 시편 72개를 만들었다.

3. 치근절편의 분류 및 치근 처리

제작된 시편은 크게 두 그룹으로 분류하였다. 대조군은 단지 치석제거 및 치근면 활택술만을 시행하였고, 실험군은 사용된 TC-HCl (Tetracycline-hydrochloride, pH 1.52, 종근당)의 농도에 따라 50mg/ml, 125mg/ml, 250mg/ml군을 각각 실험군 1, 2, 3군으로 분류하였다. 각 농도의 TC-HCl을 소독된 면구에 적셔 연마하는 방법으로, 매 30 초마다 새로운 면구로 교체하면서 총 3분간 적용시킨 후 인산완충 생리식염수(PBS, phosphoric acid buffered saline)로 세척하였다. 실험군 및 대조군은 세포 배양시간에 따라 다시 1시간, 3시간, 그리고 24시간 군으로 세분하였다.

제작된 모든 시편을 70% 알콜에 넣고 초음파 세척기(Biosonic UC100, Whaledent, USA)로 10분간 2회 처리한 후 아세톤에서 10분간 2회 초음파 세척하고, 인산완충생리식염수(PBS)로 10분간 3회 세척하여 6-well 세포배양접시(NUNC™, Denmark)에 옮겨 건조 후 냉동 보관하였다. 실험 하루 전에 냉동 보관된 시편을 새 배양접시로 옮기고 여기에 KGM을 넣어 배양한 후 실험 전에 인산완충 생리식염수로(PBS) 최종 세척 및 건조시켜 본 실험에 이용하였다.

4. 치아절편에서의 상피세포 배양 및 부착 평가

총 72개의 시편을 각 군당 18개씩 분류하고, 다시 관찰할 시간에 맞춰 6개씩 나누어 세포배양 접시(96-well plate, NUNC™, Denmark)에 위치시킨 후, 3.4 X 10³개의 치은상피세포를 함유한 배양액을 분주하여 동일 조건 하에서 배양하였다. 세포배양개시 1시간, 3시간, 그리고 24시간 후에 배양접시로부터 시편을

제거하고, 치아절편에 부착되지 못하고 배양접시에 남아있는 세포의 증식율에 대한 흡광도를 측정하여 간접적으로 치근표본에 부착된 세포의 정도를 추정하기 위해 MTT assay(Cell Proliferation Kit I, Roche, USA)를 시행하였다.

부가적으로 치아절편에 부착된 세포를 직접적으로 관찰하기 위하여 배양접시로부터 제거한 절편을 인산완충생리식염수로 2회 세척한 후, 4% 파라포름 알데하이드용액으로 30분간 고정하고, 다시 동일 세척액으로 1회 세척하여 메틸 그린 염색 및 봉입하였다. 제작된 광학 현미경 표본을 100배 확대 상에서 관찰하여, 시편당 무작위로 선택된 부위를 사진 촬영하였다.

5. 통계학적 분석

탈락된 세포에 대한 차이를 Statistical Package for the Social Science(SPSS)통계프로그램을 이용하여 one-way ANOVA로 각 시간대별, 그리고 각 그룹간의 탈락된 세포의 흡광도를 검사하고, Duncant's test로 사후검정을 실시하였다.

III. 실험 결과

1. 측정시간대별 각 군의 비부착 세포의 흡광도 비교

배양 1시간 후, 부착되지 않은 세포의 흡광도는 대조군에서는 2.01 ± 0.23 , 실험군 1에서는 2.08 ± 0.20 , 실험군 2에서 2.07 ± 0.21 , 그리고 실험군 3에서는 2.16 ± 0.07 로 나타났다. 배양 3시간 후의 흡광도를

Table 1. The results of MTT assay for measurement of the amount of unattached gingival epithelial cells to dentin sample among the groups at each incubation period(+: No statistically significant difference ($p > 0.1$)).

Group	incubation period		
	1 hr ⁺	3 hr ⁺	24 hr ⁺
Control(S&RP)	2.01 ± 0.23	1.82 ± 0.15	0.49 ± 0.41
Test 1(TC-HCl 50)	2.08 ± 0.20	1.81 ± 0.06	0.51 ± 0.40
Test 2(TC-HCl 125)	2.07 ± 0.21	1.81 ± 0.07	0.54 ± 0.05
Test 3(TC-HCl 250)	2.16 ± 0.07	1.80 ± 0.16	0.56 ± 0.06

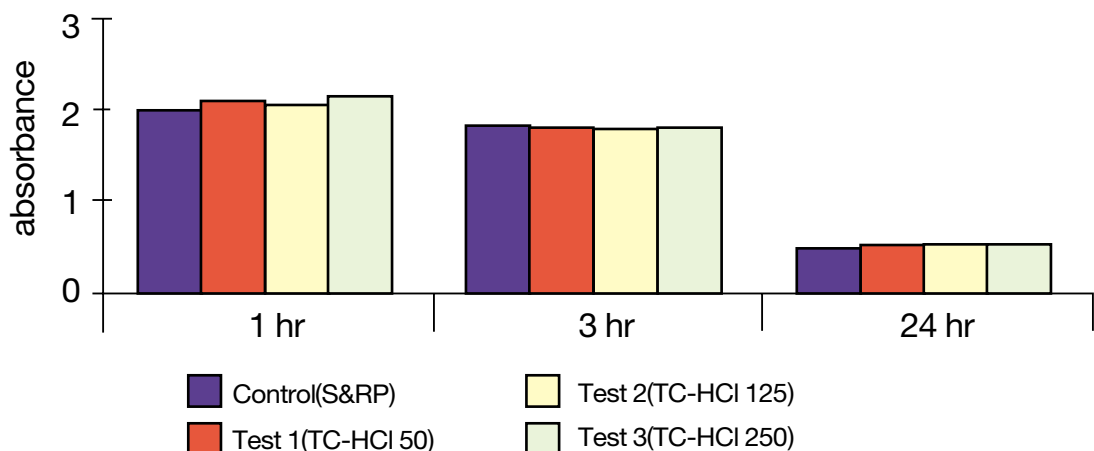


Figure 1. The results of MTT assay for measurement of the amount of unattached gingival epithelial cells to dentin sample among the groups at each incubation period.

측정해본 결과 각각의 군에서 1.82 ± 0.15 , 1.81 ± 0.07 , 1.81 ± 0.07 , 1.80 ± 0.16 로 나타났다. 그리고 24시간이 지난후 각 군의 흡광도는 대조군에서는 0.49 ± 0.41 , 실험군 1에서는 0.61 ± 0.47 , 실험군 2는 0.72 ± 0.51 , 실험군 3은 0.81 ± 0.56 으로 나타났다.

결과적으로 각 시간대별로 탈락한 치은상피세포의 증식율에 대한 흡광도를 측정한 결과 실험군과 대조군간에는 통계학적으로 유의할 만한 차이를 얻지 못했다($p > 0.05$).

또한 TC-HCl의 농도별 유의성을 알아본 결과, 실험군 3에서 나타난 흡광도의 수치가 다소 높았으나, 통계학적 유의성은 없었다($p > 0.05$)(Table 1, Fig 1).

2. 세포배양 시간별 비부착 세포의 흡광도 비교

대조군에서는 1시간 후 비부착 세포의 흡광도는 2.01 ± 0.23 이고 3시간 후에는 1.82 ± 0.15 24시간 후에는 0.49 ± 0.41 로 나타났다. 실험군 1에서는 2.08 ± 0.20 , 1.81 ± 0.07 , 0.61 ± 0.47 이었고, 실험군 2에서는 2.07 ± 0.21 , 1.81 ± 0.07 , 0.72 ± 0.51 으로 나타났다. 그리고 실험군 3에서는 1시간에서 24시간으로 지남에 따라 각각 2.16 ± 0.07 , 1.80 ± 0.16 , 그리고 0.81 ± 0.56 으로 변화하였다.

각 그룹에서 시간의 경과에 따라 1시간에서 3시간, 그리고 24시간으로 진행될수록 배양접시에 남아있는 세포의 흡광도가 유의성 있게 줄어 들었다($p < 0.05$).

이러한 결과로 시간의 경과에 따라 치근표본에 부착하는 세포의 수가 증가한다는 결과를 추정할 수 있었다(Table 2, Fig 2).

Table 2. The result of MTT assay for measurement of the amount of unattached gingival epithelial cell to dentin sample according to incubation periods.

Group hour	Control (S&RP)	Test 1 (TC-HCl 50)	Test 2 (TC-HCl 125)	Test 3 (TC-HCl 250)
1 hr	$2.01 \pm 0.23^*$	$2.08 \pm 0.20^*$	$2.07 \pm 0.21^*$	$2.16 \pm 0.07^*$
3 hr	1.82 ± 0.15	1.81 ± 0.06	1.81 ± 0.07	1.80 ± 0.16
24 hr	0.49 ± 0.41	0.51 ± 0.40	0.54 ± 0.05	0.56 ± 0.06

* : Statistically significant difference ($p < 0.05$)

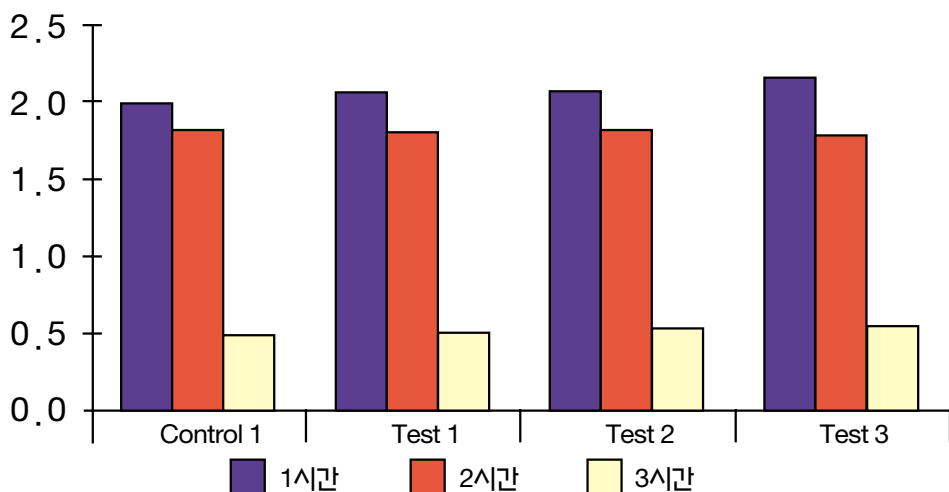
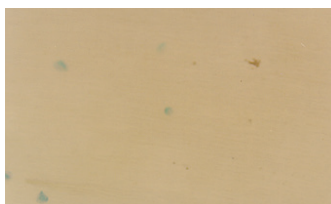


Figure 2. The result of MTT assay for measurement of the amount of unattached gingival epithelial cell to dentin sample according to incubation periods.



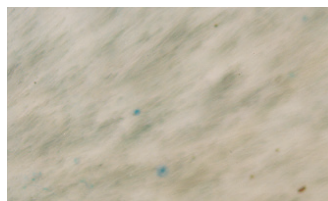
Control group-S & RP



Test group 1-TC-HCl 50mg/ml

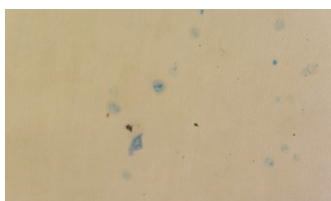


Test group 2-TC-HCl 125mg/ml



Test group 3-TC-HCl 250mg/ml

Figure 3. Light microphotograph of control and test 1, 2, 3, group after 1hour(X 100).



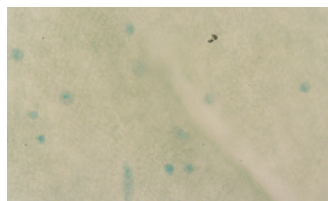
Control group-S & RP



Test group 1-TC-HCl 50mg/m



Test group 2-TC-HCl 125mg/ml



Test group 3-TC-HCl 250mg/ml

Figure 4. Light microphotograph of control and test 1, 2, 3, group after 3hours(X 100).

IV. 총괄 및 고안

치주질환은 치아 주변의 결합조직과 치조골의 상실, 점합상피의 하방증식 및 치근면의 병적 변성 등을 초래하여 치주조직 원래의 형태와 기능을 파괴한다^{1,3)}. 따라서 치주치료의 목적은 이러한 질환의 원인을 제거하여 질환의 진행을 억제 시키고 파괴된 조직을 수복하며 나아가 질환의 재발을 예방하는데 있다⁴⁾. 파괴된 치주조직의 가장 이상적인 치유형태는 노

출된 치근면에 신생백악질, 치조골, 치주인대의 신부착이며, 이를 위해서 치은섬유모세포가 치근면에 부착하거나 치주인대 섬유모세포가 밀접하게 근접하여 정상 치주인대를 형성하는 기질과 교원질을 생산해야한다^{1,23)}. 하지만, 정등⁵⁾은 치주질환에 노출되었던 치근면이 병리적 변화로 인해 섬유모세포의 부착과 발달을 위한 적절한 기질로서 작용하지 못하므로 점합상피가 치근면과 결합조직사이로 성장하여 하나의 물리적 장벽으로 작용하게 되어 재생을 방해한

다고 보고하였고, Polson 등²⁸⁾은 섬유모세포의 존재 여부보다는 치근표면의 변화가 더 직접적으로 결체조직성 신부착에 영향을 미친다고 보고하였다. 따라서 결합조직 세포의 부착할 수 있는 치근면을 형성하기 위해서는 치근면 처리를 해야 한다^{3,18)}. 이러한 목적을 달성하기 위해 가장 먼저 이용될 수 있는 방법은 치석제거술과 치근면활택술이다. 하지만, Polson 등²⁹⁾과 Boyko⁹⁾ 등은 기계적 방법만으로는 세균독소를 완전히 제거할 수 없기 때문에 여러 가지 화학요법제들이 사용되어야 한다고 설명하였다.

치근면을 탈회시키기 위해 사용되는 화학요법제의 효과에 대해서는 다양한 보고들이 있다¹⁾. Wikesjo 등⁴⁰⁾과 Niveus 등²⁶⁾은 동물실험을 이용한 연구나, 사람을 대상으로 한 임상적 연구에서 화학요법제에 의한 치근면 처리가 치유와 골형성을 촉진한다고 보고하였다. 반면에 Blomlof 등⁷⁾과 Klinge 등¹⁷⁾은 치주인대세포의 치관 쪽으로의 이주저해, 골유착 그리고 주변조직의 괴사 등의 부작용에 대해 보고하였다.

Register 등³⁰⁾은 산을 이용한 치근면의 신부착, 백악질화 그리고 골화에 관한 보고에서, 사용한 여러 종류의 산 중 pH 1의 구연산이 가장 적절하다고 보고했다. 그러나 Claffey 등¹⁰⁾은 구연산을 사용한 경우 과도한 치근흡수가 나타날 수 있다고 보고하였다. 구연산과 함께 널리 사용되는 화학요법제인 TC-HCl에 관해서 Terranova 등^{34,35)}은 치근면에 국소적으로 도포할 경우, 상아질 표면을 부분적으로 탈회시킬 수 있고, 교원섬유를 노출시킴으로서 결체조직세포의 이동을 자극하고, 따라서 상피세포의 이동을 억제한다고 하였다. 또 TC-HCl은 치주질환 발생세균에 효과적¹⁴⁾이므로 임상에서 구연산보다는 널리 사용되고 있다.

TC-HCl이 치은상피세포의 부착에 미치는 영향을 규명하고자, 본 연구에서는 섬유모세포의 부착에 관한 연구들과 비슷한 상아질 표본을 이용하였다. 치근면 처리후 상피세포의 부착에 관한 Vanheusden 등^{37,38)}의 연구에서는 잘게 부쇄진 상아질 가루를 3분 동안 3%의 구연산, 또는 0.01%, 0.1%, 2.5%의 염산 미노싸이클린으로 침전법을 이용하여 처리하였다. 그러나 본 연구에서는 김등¹⁾과 정등⁴⁾의 연구에서처럼 넓이 9mm², 두께 150-200um의 사각형의 상아질

표본으로 실험하였다. 또한 치근면 처리방법에 대한 Isik 등¹⁴⁾의 연구에서처럼 상아세관의 개방율을 최대화 할 수 있고, 또한 임상에서 빈번히 이용되는 문지르는 방법을 이용하였다.

치근면에 부착된 세포의 수를 알아보기 위해 김등¹⁾은 치근표본에 부착된 세포를 염색하여 현미경상에서 무작위로 선택한 부분에 부착된 세포수를 세어 통계를 내는 방법을 이용하였고, Vanheusden^{37,38)}은 ³H-amino acid를 세포에 미리 라벨링하고 액상 scintillation spectrometry를 이용하여 부착된 세포의 방사선 활성도를 측정하였다. 또한 Boyko 등⁹⁾과 정등⁴⁾은 부착된 세포를 치근표본으로부터 떼어내어 적혈구수 계산에 이용되는 chamber counting 방법으로 계산하였다. 본 연구에서는 상아질 표본에 부착된 치은상피세포의 수를 광학현미경상에서 직접 계측하는 것이 불가능하였기 때문에 간접적으로 부착된 세포를 추정하였다. 본 실험에서 비슷한 크기의 상아질 표본을 배양접시에 넣고, 동량의 세포(3.4X10³개)를 치근표본 위에서 배양하여 측정시간이 지난 후 표본은 꺼내고 접시에 남아있는 부착되지 않은 세포의 증식율에 대한 흡광도를 MTT assay로 측정하여, 반대로 치근면에 부착된 cell의 수를 추정하였다. 이때 사용된 MTT assay는 tetrazolium salts를 이용하여 세포의 활성도를 정량적으로 추정할 수 있는 방법으로, 이 물질이 단지 살아있는 세포에서만 formazan dye를 형성한다는데 기초를 두고 ELISA reader를 이용해 실험의 결과로 이용하였다³⁹⁾.

또한 꺼내어진 치근표면은 현미경적으로 관찰하기 위해 고정, 염색, 봉입과정을 거쳤으나, 부착된 세포의 수가 너무 적고, 표본 위에서 고른 분포를 보이지 않았기 때문에 직접 세포의 수를 세는 방법은 시행하지 못하고, 단지 각 그룹별로 부착된 세포의 정도의 경향만을 결과에 나타내었다.

본 연구의 결과, 치은상피세포의 부착은 TC-HCl을 처리하지 않은 대조군에서 다소 높거나, 거의 동일하게 나타났다. 이것은 치은상피세포가 탈회된 상아질 표면에서 부분적으로 부착이 억제된다는 Terranova 등^{34,35)}의 연구와는 비슷한 결과이나, 상피세포가 탈회된 표면에 더 잘 부착한다는 Vanheusden 등^{37,38)}의

연구와는 다소 차이가 있었다. 이와 같은 연구 결과의 차이는 사용된 TC-HCl의 농도 차이에 의한 것으로 설명할 수 있는데, Vanheusden등^{37,38)}은 사용한 TC-HCl의 농도가 100ug/ml 이상이 되면 상피세포의 부착기능을 저하한다고 보고하였다. 하지만, Trombelli등³⁶⁾은 TC-HCl의 농도가 10mg/ml나 그 이상인 경우에만 치근표면을 변화시킬 수 있다고 하였다. 또한 Isik등¹⁵⁾은 50mg/ml부터 125mg/ml사이의 TC-HCl이 도말층을 제거하고 상아세관 개방율을 최대화 할 수 있는 적절한 농도라고 설명하였고, Madison등²⁵⁾은 농도가 증가할 수록(예, 200mg/ml) 도말층의 제거속도가 빨라진다고 하였다. 이와 같은 이유로 본 실험에서는 치근표면을 치주조직의 재생을 도모할 수 있도록 변화시키며, 또한 임상적으로 빈번히 사용되는 농도인 50mg/ml, 125mg/ml, 250mg/ml의 TC-HCl을 이용하였기 때문에 대조군과 실험군 사이에 상피세포의 부착에 있어서 통계학적 유의성있는 변화가 나타나지 않았다.

본 실험에서 세포배양 시간에 따른 비부착 세포의 흡광도를 비교하였을 때 1시간에서 24시간으로 갈수록 점차 감소하는 양상을 관찰할 수 있었다. 이것으로 시간의 경과에 따라 상피세포의 부착이 더 많이 일어남을 유추해 볼 수 있었다. 또한 24시간이 지난 후에는 각 그룹간에 거의 유사한 결과를 보였는데, 이는 초기(3시간)에는 상피세포의 부착이 실험군에서 더 낮게 나타났으나, 24시간이 지난 후에는 TC-HCl 처리에 관계없이 일정한 부착수준을 유지하는 것으로 나타났다.

이상과 같은 결과를 통해 세포배양 시간에 따른 대조군과 실험군 간의 부착 상피세포는 통계학적으로 유의할 만한 차이가 없고, 배양시간이 지남에 따라 부착되는 상피세포가 증가한다는 결론을 간접적으로 유추해 낼 수 있었다. 또한 임상적으로 유용한 농도인 50-, 125-, 250mg/ml의 TC-HCl의 적용은 상피세포의 초기 부착에는 부분적으로 유해하나, 시간이 경과함에 따라 상피세포의 활발한 분화로 인해 결국 세포의 부착에는 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 사료된다.

본 실험에서는 실험기간동안 세균에 의한 감염을

방지하기 위해 멸균된 치근을 사용하였고, 또한 무균 상태로 조작되었기 때문에 치주질환 유발 및 진행에 주요 원인인 치태내 세균이 치유와 신부착 과정에서 지속적으로 작용하게 되는 실제 임상환경과는 차이가 있으므로 실험결과와 해석 및 임상예의 적용에는 신중을 기해야 한다. 그리고 평가된 표본의 수가 너무 적어서 통계학적 유의성을 규명하는 것이 어려웠다. 또한 부착된 세포수에 대한 연구방법에서도 직접 부착된 세포의 수를 세는 것이 아니라, 탈락된 세포의 흡광도로서 간접적으로 부착을 추정하였다는 한계점이 있다. 따라서 본 연구의 결과를 토대로 보다 많은 표본을 가지고 생체실험을 포함한 추가적인 연구가 계속되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결론

치주질환에 이환된 치근면에 대한 염산테트라사이클린의 처리가 치은상피세포의 부착에 미치는 영향을 규명하기 위해서 중증의 치주염으로 인해 발거된 치아를 이용하여 치근 활택술만 시행한 대조군, 염산테트라사이클린 농도 (50mg/ml, 125mg/ml, 250mg/ml)에 따른 실험군으로 구분하고 3.4×10^3 개의 제 3세대배양 치은상피세포를 이용한 세포부착실험을 시행하였다.

다음의 결과는 관찰시간에 따라 부착되지 못하고 탈락된 세포에 대한 증식율에 대해 흡광도 측정하여 간접적으로 부착된 세포에 대해 추정을 통해 얻어졌다.

1. 각 측정시간대별 비부착 상피세포의 흡광도를 측정한 결과 모든 군에서 통계학적으로 유의할 만한 차이가 없었다($p > 0.05$).
2. 시간의 경과에 따라 비부착 상피세포의 흡광도는 통계학적으로 유의성 있게 감소하였다($p < 0.05$).
3. 사용된 TC-HCl의 농도에 따른 각 그룹간의 흡광도의 차이는 없었다($p > 0.05$).

본 연구를 통한 이런 결과는 치주질환에 이환된 치

근에 대해 TC-HCl을 이용한 치근면 처리가 치은상피 세포의 부착에 미치는 영향은 거의 없다는 것을 시사하였다.

VI. 참고문헌

1. 김성봉, 임기정, 김병옥, 한경윤. EDTA를 이용한 치근면 처리가 치은섬유모세포의 초기 부착에 미치는 영향. 『대한치주과학회지』 **30(1)**:145-155, 2000.
2. 이상엽, 최상묵. 정상 및 이환백악질에 대한 치은 조섬유세포의 부착에 관한 전자현미경적 연구. 『대한치주과학회지』 **17(1)**:105-128, 1987.
3. 이종원, 김병옥, 한경윤. EDTA의 적용방법이 상아 세관 개방에 미치는 영향에 관한 주사전자현미경적 연구. 『대한치주과학회지』 **28(4)**:731-742, 1998.
4. 정보미, 정현주. 염산 Tetracycline으로 처리된 치근면에 대한 섬유아세포의 부착효과. 『대한치주과학회지』 **19(2)**:108-115, 1989.
5. 정현주. 치근면 처리(Modification of the periodontally diseased root surface). 『대한치과의사협회지』 **32(1)**:26-32, 1994.
6. Bjorvatn K, Skaug N, Selvig KA. Tetracycline-impregnated enamel and dentin : duration of anti-microbial capacity. *Scan J Dent Res* **93**:192-197, 1985.
7. Blomlof J, Jansson L, Blomlof L, Lindskog S. Long-time etching at low pH jeopardizes periodontal healing. *J Clin Periodontol* **22**:459-463, 1995.
8. Blomlof J, Lindskog S. Periodontal tissue-vitality after different etching modalities. *J Clin Periodontol* **22**:464-468, 1995b
9. Boyko AG, Brunette DM, Melcher AH. Cell attachment to demineralized root surfaces in vitro. *J Periodont Res* **15**:297-303, 1980.
10. Claffey N, Bogle G, Bjorvatn K, et al. Topical application of tetracycline in regenerative periodontal surgery in beagles. *Acta odontol scand* **45**:141-146, 1987.
11. Fernyhough W, Page RC. Attachment, Growth and Synthesis by Human Gingival Fibroblasts on Demineralized or Fibronectin-Treated Normal and Diseased Tooth Roots. *J Periodontol* **54(3)**:133-140, 1983.
12. Garrett JS, Crigger M, Egelberg J. Effects of citric acid on diseased root surfaces. *J Periodont Res* **13**:155-163, 1978.
13. Hanes PJ, Polson AM, Ladenhemmin S. Cell and fiber attachment of demineralized dentin from normal root surfaces. *J Periodontol*. **56**:752-765, 1985.
14. Isik G, Ince S, Saglam F, Onan U. Comparative SEM study on the effect of different demineralization methods with tetracycline HCl on healthy root surfaces. *J Clin Periodontol* **24**:589-594, 1997.
15. Isik AG, Tarim B, Hafex AA, et al. A Comparative scanning electron microscopic study on the characteristics of demineralized dentin root surface using different tetracycline HCl Concentrations and Application Times. *J Periodontol* **71(2)**:219-225, 2000.
16. Joo-Cheol Park, Hyun-Man Kim, Jea-Seun Ko. Effect of extracellular matrix proteins of the attachment of the human oral epithelial cells at the titanium surface. *Journal of College of dentistry, seoul national university* **20(1)**:219-252, 1996.
17. Klinge B, Nilveus R, Egelberg J. Bone regeneration pattern and ankylosis in experimental furcation defects in dogs. *J Clin Periodontol* **12**:456-464, 1985.
18. Labahn R, Fahrenbach W, Clark S, et al. Root Dentin Morphology After Different Modes of Citric Acid and Tetracycline Hydrochloride Conditioning. *J Periodontol* **63(4)**:303-309, 1992.

19. Larjava H, Salone J, Hakkinen L, Narhi T. Effects of citric acid treatment on the migration of epithelium on root surfaces in vitro. *J Periodont* **59**:95-99, 1988.
20. Lasho DJ, O'Leary TJ, Kafrawy AH. A scanning electron microscope study of the effects of various agents on instrumented periodontally involved root surfaces. *J Periodontol*. **54**:210-220, 1983.
21. Leidal TL, Ericksen H. A Scanning electro microscopic study of the effect of various cleansing agents on cavity walls in vitro. *Scand J Dent Res* **87**:443-449, 1979.
22. Lowenberg F, Aubin E, Deporter E, et al. Attachment, Migration, and Orientation of human gingival fibroblasts to collagen-coated, surface-demineralized, and untreated root slices. *J Dent Res* **64**:1106-1110, 1985.
23. Lowenberg B, Thibault J, Lawrence C, Sodek J. The Influence of Chemically-Induced Modifications of Root Surfaces on Cell Migration, Attachment and Orientation. *J Dent Res* **65**:1010-1015, 1986.
24. Lowenguth RA, Blieden TM. Periodontal regeneration: root surface demineralization. *Periodontology 2000* **1**:54-68, 1993.
25. Madison JG, Hokett SD. The Effects of Different Tetracyclines on the Dentin Root surface of Instrumented, Periodontally Involved Human Teeth: A Comparative Scanning Electron Microscope Study. *J Periodontol* **68**:739-745, 1997.
26. Nilveus R, Egelberg J. The effect of topical citric acid application on the healing of experimental furcation defects in dogs(III). The relative importance of coagulum support, flap design and systemic antibiotics. *J Periodont Res* **15**:551-560, 1980.
27. Pitaru S, Gray A, Aubin JE, Melcher AH. The influence of the morphological and chemical nature of dental surfaces on the migration, attachment and orientation of human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodont Res* **19**:408-418, 1984.
28. Polson AM, Proye MP. Fibrin Linkage: A Precursor for New Attachment. *J Periodontol* **54**(3):141-146, 1983.
29. Polson A, Frederick G, Ladenheim S, Hanes S. The production of a root surface smear layer by instrumentation and its removal by citric acid. *J Periodontol* **55**:443-446, 1984.
30. Register AA. Bone and cementum induction by dentin, demineralized *in situ*. *J Periodontol* **44**:49-54, 1973.
31. Schuster GS, Singh BB, Welter DA, Erbland JF. A simplified method for culture of oral epithelial cells. *J oral pathology* **14**:332-341, 1985
32. Stenn KS, Link R, Moellmann G, et al. Dispace, a neutral protease from *Bacillus polymyxa*, is a powerful fibronectinase and type IV Collagenase. *J Invest. Dermatol* **93**:287-290, 1989.
33. Taichman L, Reilly S, Garant PR. *In-vitro* cultivation of human oral keratinocytes. *Archs oral Biol*. **24**:335-341, 1979.
34. Terranova VP, Martin P. Molecular factor determining gingival tissue interaction with tooth structure. *J Periodontal Res* **17**:530-533, 1982.
35. Terranova VP, Franzetti LC, Hic S, et al. A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth. *J Periodont Res* **21**:330-337, 1986.
36. Trombelli L, Scabbia A, Zangrai F, et al. Effect of tetracycline HCl on periodontally-affected human root surfaces. *J Periodontol* **66**:685-691, 1995.
37. Vanheusden A, Nussgens B, Goffinet G, et al. In

- vitro* modulation of human gingival epithelial cell attachment and migration by minocycline-HCl. *J Periodontal Res* **33(6)**:377-385, 1998.
38. Vanheusden A, Goffinet G, Zahedi S, *et al*. In Vitro stimulation of Human Gingival Epithelial cell attachment to Dentin by surface Conditioning. *J periodontol* **70(6)**:594-603, 1999.
 39. Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, *et al*. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res* **51**:2515-2520, 1991.
 40. Wikesjö U, Christersson L, Baker P. A biochemical approach to periodontal regeneration : tetracycline treatment conditions dentin surfaces. *J Periodont Res* **21**:322-329, 1986.
 41. Zaman K, Sugaya T, Hongo O, Kato H. A Study of Attached and Oriented Human Periodontal Ligament Cells to Periodontally Diseased Cementum and Dentin After Demineralizing with Neutral and Low pH Etching Solution. *J Periodontol* **71**:1094-1099 2000.

Effect of tetracycline-HCl root conditioning on gingival epithelial cell attachment to root surface

Na-Young Hwang¹, Byung-Ki Park¹, Sang-Mok Kim¹, Jung-Ki Kuk², Ju-Chul Park³, Byung-Ock Kim¹

¹Dept. of Periodontology, ²Dept. of Oral Biochemistry,

³Dept. of Oral Histology College of Dentistry, Chosun University

The ultimate goal of periodontal therapy is directed to arresting the progression of the disease, and regenerating the fibrous attachment. In order to achieve such treatment aim, the plaque and calculus must be eliminated and the physiological conditions of the root surface must be changed to facilitate the attachment and migration of the new fibroblasts. The method of changing the proper root surface conditions to promote the healing of periodontal tissue involves mechanical procedures, such as scaling and root planing, and chemical procedures such as tetracycline-HCl. However, the formation of a long junctional epithelium was most frequently observed type of healing. Thus, the aim of this study was to examine in vitro the influence of surface conditioning of dentin by TC-HCl on human gingival epithelial cell attachment. Human gingival epithelial cells were obtained from healthy retromolar pad area (under the age 23 years). Seventy two teeth extracted from severe periodontitis were used as study material. To evaluate the epithelial cell attachment to dentin, the prepared specimen was divided to four groups. For the control group, only scaling and root planing were carried out, and for the test group, 1 to 3, the concentration of the TC-HCl was 50, 125 and 250mg/ml, respectively. After cell cultivation time of 1-, 3-, 24 hour, for the indirect quantitative assessment of gingival epithelial cell attached to dentin sample, the absorbance of epithelial cell unattached to dentin was measured. The results were as follows ;

1. There was no statistically significant difference between scaling and root planing group and TC-HCl 50mg/ml, 125mg/ml and 250mg/ml group about absorbance of unattached epithelial cell to dentin sample ($p > 0.5$).
2. As time passes, the absorbance of unattached gingival epithelial cell to dentin sample was decreased statistically significant ($p < 0.05$).
3. There was no statistically significant difference among the TC-HCl group ($p > 0.05$)

We concluded that there was similar effect on gingival epithelial cell attachment between TC-HCl conditioning on root surface and only scaling and root planing treatment

Key words : TC-HCl, root conditioning, epithelial cell, attachment