

구강상피세포의 냉동보관 방법에 따른 세포생존률 비교

백도영 · 이승종 · 정한성 · 김의성*

연세대학교 치과대학 치과보존학교실

ABSTRACT

COMPARISON OF VIABILITY OF ORAL EPITHELIAL CELLS STORED BY DIFFERENT FREEZING METHODS

Do-Young Baek, Seung-Jong Lee, Han-Sung Jung, EuiSeong Kim*

Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Yonsei University

This study examined the influence of the storage methods on the viability of oral epithelial cells using conventional cell freezing storage, slow freezing preservation, rapid freezing preservation, and slow freezing preservation with a pressure of 2 Mpa or 3 Mpa. The cell viability was evaluated by cell counting, WST-1 and the clonogenic capacity after 6 days of freezing storage. After 6 days, the frozen cells were thawed rapidly, and the cell counting, WST-1, and clonogenic capacity values were measured and compared.

1. The results from cell counting demonstrated that conventional cryopreservation, slow freezing under a 2 Mpa pressure and slow freezing under a 3 Mpa pressure showed significantly higher values than slow freezing preservation and rapid freezing preservation ($p<0.05$).
2. The results from the optical density by WST-1 demonstrated that slow freezing under a 2 Mpa pressure showed significantly higher values than slow freezing preservation and rapid freezing preservation ($p<0.05$).
3. The clonogenic capacity demonstrated that slow freezing under a 2 Mpa pressure showed significantly higher values than slow freezing preservation and rapid freezing preservation ($p<0.05$). [J Kor Acad Cons Dent 34(5):491-499, 2009]

Key words: WST-1, Cell counting, Clonogenic capacity, Slow freezing under pressure, Slow freezing, Rapid freezing

-Received 2009.9.1., revised 2009.9.25., accepted 2009.10.6.-

I. 서 론

최근의 치과임상에서 골유착 임플란트의 도입은 높은 성공률과 예지성으로 인해 치과 임상에 획기적인 변화를 가져

왔으나 골유착을 성공 조건으로 보고 있는 한 자연치와 같은 치근막의 감각 기능, 이식 후의 치아 이동, 고유 감각 등을 가질 수 없는 단점이 있다. 더구나 성장기의 환자에서 골유착 임플란트는 금기증이지만 치근막이 살아 있는 자연 치아의 이식은 성장기 환자에서도 자연치와 같은 수준으로 기능이 회복될 수 있다¹⁾. 자가 치아 이식의 예후에 영향을 미치는 가장 주요한 인자로는 공여치의 치근면에 존재하는 건전하고 생활력 있는 치주인대 세포의 유지라고 할 수 있다. 이상적인 자가 치아 이식은 발치 즉시 시행하는 것이나 세포의 적절한 보관 방법을 찾아 치주인대세포의 손상이 최소

*Corresponding Author: **EuiSeong Kim**
Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Yonsei University
134, Shinchon-dong, Sudaemoon-gu, Seoul, Korea
Tel: 82-2-2228-3151 Fax: 82-2-313-7575
E-mail: andyendo@yuhs.ac

*이 논문은 2007년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국 학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임. (KRF-2007-313-E00508)

화 된다면 부득이하게 미리 발치하는 경우에도 발치 된 치아를 추후 이식 가능하게 될 것이다.

살아있는 세포에 냉동생물학적인 과정을 적용하는 주 목적은 생물학적, 의학적, 수술적 목적을 위해 장기간 세포기능을 보존하는데 있다. 이러한 목적에 부합하기 위해서는 냉동 시의 물에 의한 조직의 손상이 최소화되어야 한다. 냉동 보존 과정은 복잡한 현상으로 지난 십 수년간 많은 연구²⁻⁵⁾가 있어왔지만 아직 완전한

기전이 밝혀지지 않았다. 이러한 냉동 보존법에서는 냉동 속도 (cooling rate)에 따라 세포의 생존율이 달라진다. 얼음 결정 형성과 용질 농도 효과(solution concentration effect)는 세포의 불활성화를 유발하며 적절한 냉동속도 (cooling rate)는 각 효과를 최소화 시킨다²⁾.

최근 일본에서는 미소 자장을 이용한 프로그램 냉동고 (Cell Alive System)를 이용하여 세포와 냉동 보존액 전체를 동시에 냉동하게 하는 시도가 있었다. 이 특수한 자장 냉동고를 사용하여 Kawata⁶⁾는 쥐 치아를 15 mA 자기장으로 $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 속도로 -30°C 까지 3일간 냉동 보관했을 때 급속 냉동을 하는 것보다 좋은 결과를 얻었다고 보고하였다. 하지만 Ahn⁷⁾등은 쥐 치아를 $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 속도로 -20°C 까지 21.7 mA, 60Hz, 1G의 자기장을 이용하여 프로그램 냉동을 시도하였으나 급속, 저속 냉동한 군 사이에 유의한 차이는 없다고 보고하였다.

또 다른 방법으로 고압 하에서 냉동시킴으로써 세포의 손상을 줄이고자 하는 방법들도 연구되었는데 Pribenszky^{8,9)}는 쥐를 이용한 생체 내 실험과 소의 난포를 이용한 실험에서 고압(High hydrostatic pressure) 전처치가 냉동보관을 용이하게 하며 생존율을 증가시킨다고 보고 하였다. 또한 이러한 전처치를 통해 냉동시킨 수태지와 황소의 정자가 해빙 된 후 운동력과 번식력이 증가됨을 보고하였다^{9,10)}.

WST-1(4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) 검색법은 세포 증식 및 생존 능력, 약제에 대한 세포 독성을 평가할 때 사용된다¹¹⁾. 이 방법은 MTT와는 다른 약한 붉은 색의 tetrazolium salts(WST-1)을 세포 내 미토콘드리아 탈 수소 효소가 분해하여 진한 붉은 색의 formazan 결정으로 환원시키는 원리를 이용하며 450nm의 파장에서 흡광도를 측정한다. 이 흡광도는 살아있는 세포에 의해 WST-1이 환원된 양을 나타내며 생존세포 수와 비례한다¹²⁾.

Clonogenic capacity 측정법은 단일 세포로부터 집락이 각각 얼마나 형성되는가를 바탕으로 하여 세포의 생존력을 측정하는 방법이다. 세포 집락은 최소 50개 이상의 세포로 구성되어야 한다. 오직 소량의 뿌려진 세포만이 집락을 형성할 수 있는 능력을 간직한다. 처치 전후 적절한 농도로 희석된 세포를 뿌려 1~3주안에 집락 형성을 확인하게 된다.

이에 본 연구의 목적은 구강상피세포를 배양하여 일반적

인 세포 냉동 보존법, 저속 냉동 보존법, 급속 냉동 보존법, 2 Mpa, 3 Mpa의 압력을 이용한 저속 냉동 보존법으로 6일간 냉동 보존 시 각 냉동 보존법에 따른 세포의 활성도를 비교 평가 하기 위함이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험 대상 및 전 처치

한국 세포주 은행 (Korean Cell Line Bank)로부터 구강 내 하악 치은 기원의 단층 상피 세포(YD-38)를 분양 받아 세포 배양 후 P1, P2, P3, P4 으로 계대하여 각각의 cell stock을 5개씩 만들었다.

2. 실험 방법

실험에 사용한 보관 용액인 media는 KCLB media인 RPMI 1640 with L-glutamine (300mg/L), 25mM HEPES and 25mM NaHCO_3 , 90%; heat inactivated fetal bovine serum (FBS) 10%를 이용하였다. 냉동 시 세포질 내 동해방지제로는 5% dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였다.

〈Cell culturing〉

먼저 stock으로 보관되어있던 냉동세포를 37°C 수욕조에 급속 해동시켰다. 15ml 원통 튜브에 4ml의 Media (90%RPMI+10%FBS)를 1ml의 세포 부유액과 섞어 원심 분리한 후 냉동보관 시 쓰였던 DMSO용액을 제거하였다. 다시 Media(90%RPMI+10%FBS)를 섞은 후 15회 pipetting하여 세포가 고루 분포하도록 하였다. 이후 100mm² petridish에 Media (90%RPMI+10%FBS)와 세포 부유액 혼합액이 10mm²의 부피가 되도록 하여 incubator에 보관하였다. Media(90%RPMI+10%FBS)는 2~3일에 한번씩 교체하였다. 세포를 해동하여 incubator에 배양한지 약 3일정도 후에 monolayer가 약 70%정도 덮이는데 이때 세포를 계대하였다. 이와 같이 세포를 배양하여 약 $6 \times 10^6 \sim 7 \times 10^6$ 개의 세포가 준비되면 각각의 실험군의 조건에 따라 냉동보존을 시작하였다. 실험 시에는 항상 같은 계대의 세포를 이용하였다.

가. 실험군 분류

대조군으로는 한국 세포주 은행에서 배양 때 쓰였고 세포의 stock을 만들 때 썼던 Freezing container를 이용한 일반적 냉동 보존법을 이용하였다.

1군: 대조군 (Freezing container와 Isopropyl alcohol(nalgene 'Mr. Frosty')를 이용한 일반 세포 보관법)

$1 \times 10^6/\text{ml}$ 의 cell suspension 1ml를 2ml용량의 vial에 담아 Freezing container(Figure 1. 'Mr.Frosty', NALGENE® Labware)를 이용하여 -70°C 까지 $1^\circ\text{C}/\text{min}$ 의 냉동속도로 냉동 후 -196°C 의 nitrogen liquid에 넣어 6일간 보관하였다.

2군: 저속 냉동군

$1 \times 10^6/\text{ml}$ 의 세포 부유액 1ml를 2ml용량의 vial에 담아 속도조절 냉동기에 넣어 4°C 냉장온도에서 -35°C 까지 $-0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ 로 서서히 냉동시킨 뒤 -196°C 액화질소 냉동고에 넣어 6일간 보관하였다

3군: 급속 냉동군

$1 \times 10^6/\text{ml}$ 의 세포 부유액 1ml를 2ml용량의 vial에 담아 -196°C 액화질소 냉동고에 넣어 냉동시켜 6일간 보관하였다.

4군: 2 Mpa 압력 저속 냉동군

$1 \times 10^6/\text{ml}$ 의 세포 부유액 1ml를 2ml용량의 vial에 담아 압력통(Figure 2. Geumsung Science,

Seoul, Korea) 안에 냉동튜브를 넣고 스페너로 잠근 뒤 속도조절 냉동기(Low Temp Freezer Drying Chamber KS5045, Geumsung Science, Seoul, Korea)에 넣고 압력통에 압력을 2 Mpa로 가하고 4°C 에서 -35°C 까지 $-0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ 로 서서히 냉동시킨 뒤 -196°C 액화질소 냉동고에 넣어 6일간 보관하였다.

5군: 3 Mpa 압력 저속 냉동군

$1 \times 10^6/\text{ml}$ 의 cell suspension 1ml를 2ml용량의 vial에 담아 압력통(Geumsung Science, Seoul, Korea) 안에 냉동튜브를 넣고 스페너로 잠근 뒤 속도조절 냉동기(Low Temp Freezer Drying Chamber KS5045, Geumsung Science, Seoul, Korea)에 넣고 압력 통에 압력을 3 Mpa로 가하고 4°C 에서 -35°C 까지 $-0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ 로 서서히 냉동시킨 뒤 -196°C 액화질소 냉동고에 넣어 6일간 보관하였다.

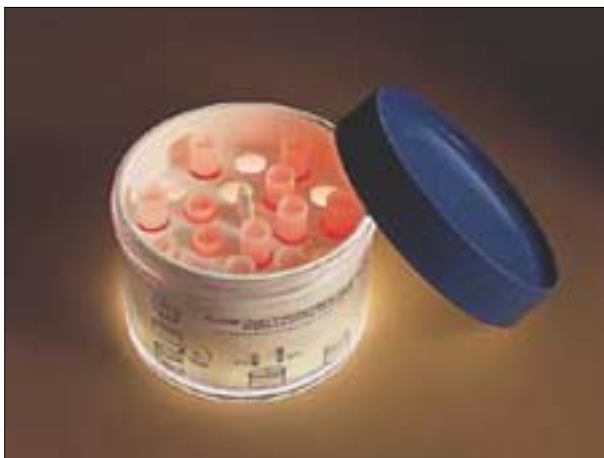


Figure 1. $1^\circ\text{C}/\text{min}$ freezing container "Mr. Frosty"

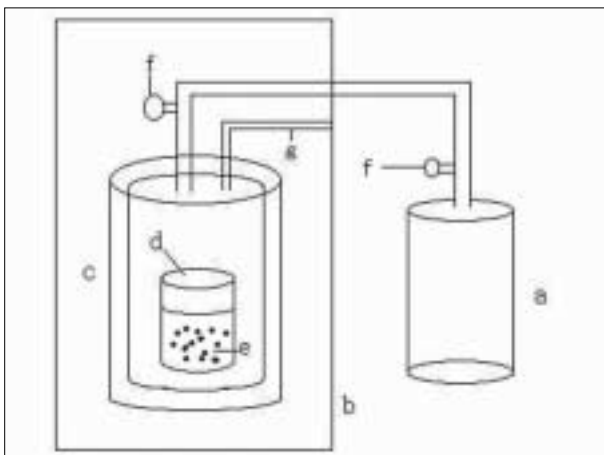
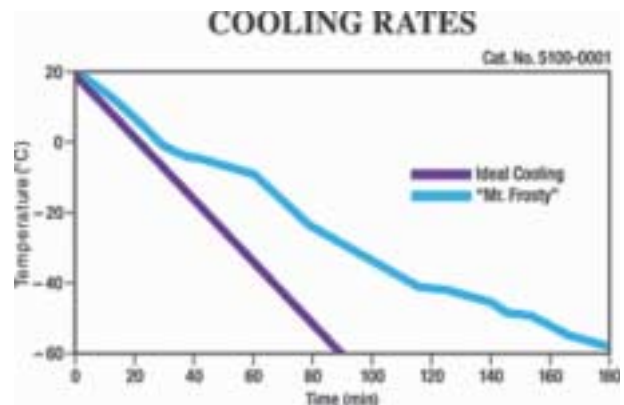


Figure 2. Schematic diagram of program freezer with pressure vessel.

- a. Oxygen container : 2,3 Mpa of pressure
- b. Program freezer
- c. Pressure bottle
- d. 2ml Cryotube: 1ml 65%RPMI+30%FBS+5%DMSO
- e. Cell suspension
- f. Pressure valve
- g. Thermometer

나. 냉동군의 해빙 방법

각군의 냉동한 세포를 냉동튜브 채로 -196°C 액화질소 냉동고에서 꺼내어 37°C 수욕조에 넣어 급속 해빙하였다. 압력 냉동군은 압력통을 액화질소 냉동고에서 꺼내어 압력을 해소하고 안에 든 냉동튜브를 꺼내 37°C 수욕조에 넣어 해빙하였다. 2ml 냉동튜브 속의 보관용액이 완전히 액체 상태로 되었을 때 수욕조에서 꺼내 15ml 원통형 튜브 5개에 Media(90%RPMI + 10% FBS)를 4ml 씩 넣고 각군의 세포 부유액 1ml 를 넣어 5ml 를 만들었다. 냉동보관 시 쓰였던 DMSO제거 위해 원심분리 후 상층부 흡입 하였다. 각 tube에 Media(90%RPMI + 10%FBS)를 1ml 씩 넣고 15~20회 정도 pipetting하여 1ml의 세포 부유액 전반에 균일한 밀도의 세포가 존재할 수 있도록 하였다.

Eppendorf tube에 각 군의 세포 부유액 50 μ l과 trypan blue 50 μ l(1:1) 섞은 혼합액을 만들어 5분간 기다린 뒤 Hemocytometer의 cover glass를 덮고, 혼합액 10 μ l를 취하여 Figure 3과 같이 hemocytometer의 홈에 위치시킨 후 현미경 100 \times 배율에서 세포를 관찰하여 계산하였다.

2-1. Cell counting

2-2.WST-1(4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) standard curve 및 검색

먼저 WST-1 standard curve를 완성하기 위해 실험 군

과는 별개의 배양된 세포를 이용하였다. 10^3 , 2×10^3 , 4×10^3 , 8×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 개의 세포를 96-well plate에 각각 3개의 well에 넣었다. 24시간 뒤 96-well plate 용액(20 μ l, Cell Proliferation Reagent WST-1;Roche Applied Science, Mannheim, Germany) 10 μ l를 넣고 알루미늄 호일로 96-well plate를 싸서 4시간 동안 37°C incubator에 배양하였다. 4시간 후 Dynatech MRX ELISA microplate reader (Dynatech laboratories, Chantilly, VA, USA)에 넣고 450nm 파장에서 흡광도를 측정하여 각각의 세포 수와 WST-1의 값을 비교하여 standard curve를 완성하였다.

각 실험 군의 처리가 끝난 뒤에 96-well plate에 5×10^4 개의 cell을 각 실험군당 3번씩 well에 넣었다. 24시간 뒤 96-well plate를 꺼내 WST-1 용액(20 μ l, Cell Proliferation Reagent WST-1;Roche Applied Science, Mannheim, Germany) 10 μ l를 넣고 알루미늄 호일로 96-well plate를 싸서 4시간 동안 37°C incubator에 배양하였다. 4시간 후 Dynatech MRX ELISA microplate reader (Dynatech laboratories, Chantilly, VA, USA)에 넣고 450nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

2-3. Clonogenic capacity

각각의 군당 2개의 petridish (100mm \times 20mm)에 10ml media (10%FBS + 90%RPMI)를 넣고 10^3 개의 세포를 골고루 분포하도록 하였다. 10일 뒤 상층부의 media

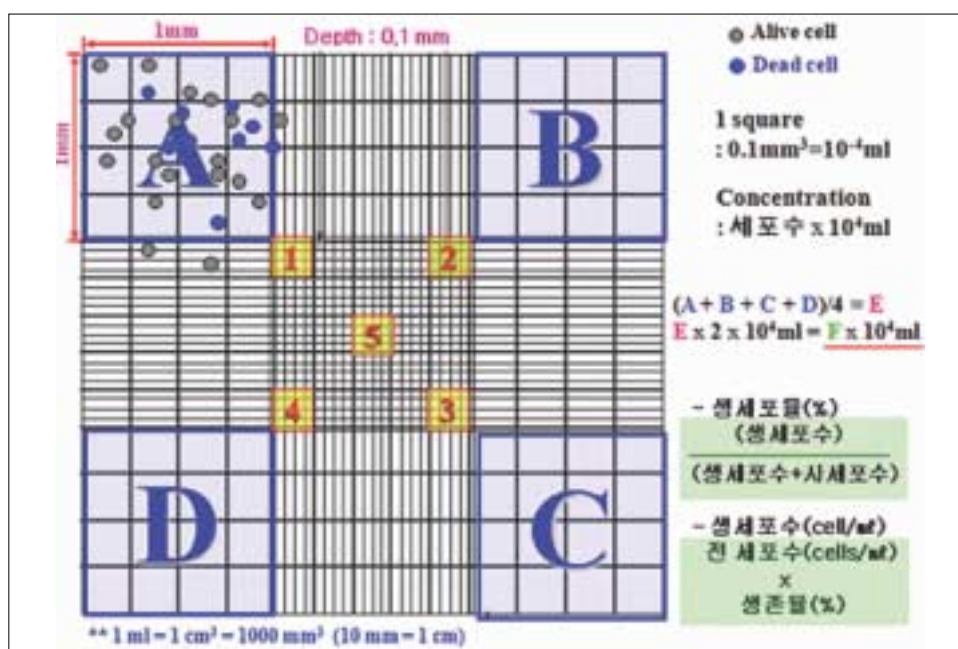


Figure 3. Cell counting by hemacytometer slide and trypan blue

를 제거 후 5ml의 PBS로 2회 세척하여 4% formalin 5ml를 dish에 넣고 10분 간 고정 시켰다. Formalin을 제거 후 Giemsa stain과 PBS를 1:1로 mix한 solution 5ml를 넣고 물로 wash후 건조하여 푸른색으로 염색된 colony 수를 측정하였다.

3. 통계처리

대조군과 각 실험군에서 cell counting에서 얻은 값은 One way ANOVA를 사용하여 분석하였으며 사후 검정으로는 Tukey test를 이용하였다. WST-1 검색 및 Clonogenic capacity검색을 통한 colony 수는 Kruskal-Wallis One Way ANOVA를 사용하여 분석하였으며 사후 검정으로는 Dunn's method를 이용하였다.

III. 결 과

1. Cell counting

1군, 4군, 5군은 각각 2군과 3군에 비해 통계적으로 유의차 있게 높은 값을 나타냈으며 ($p<0.05$) 4군은 1군과 5군에 비해 높은 값을 나타내었으나 통계적인 유의차는 없었다. 냉동 보존 전 세포의 수가 1.0×10^6 이었으므로 살아남은 세포의 비율을 계산해보면 일반적인 냉동보존법은 약 24%, 저속 냉동은 약 9%, 급속 냉동은 약 5%, 2 Mpa 압력 저속냉동은 약 37%, 3 Mpa압력 저속냉동은 24%의 세포 생존율을 나타냈다.

2. WST-1 standard curve 및 각 실험 군의 WST-1 측정

WST-1의 standard curve는 가로축이 세포 수를 나타내며 세로축이 WST-1의 optical density를 나타낸다. Figure 4의 standard curve에서 보듯이 세포가 증가함에 따라 optical density가 증가하는 양상을 나타내었다.

6일 동안 냉동 보관했던 각 실험 군의 WST-1값을 측정하였다. 2회의 실험에서 측정된 WST-1값은 총 6개로 이의 중앙값(median)은 Table 2와 같다. 4군이 2군과 3군에 비해 통계적으로 유의차 있게 높은 값을 나타내었다 ($p<0.05$). 4군은 1군과 5군에 비해 높은 값을 나타냈으나 통계적인 유의차는 없었다. 또한 1군과 5군이 2군과 3군에 비해 높은 값을 나타냈으나 통계적인 유의차는 없었다.

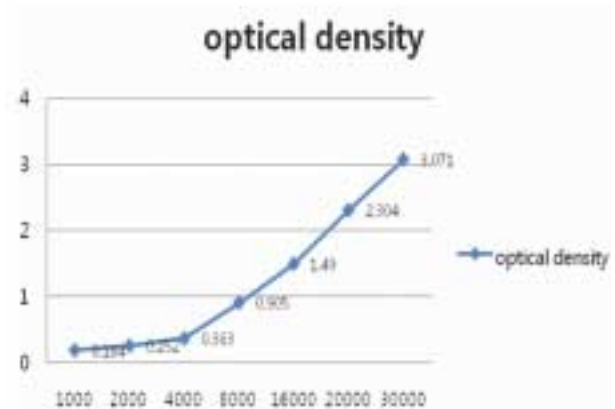


Figure 4. Standard curve of WST-1 using monolayer epithelial cell(YD-38)

Table 1. The averages and standard deviations of viable cell number (logN)

Groups	Mean	SD
Group1(Conventional cryopreservation)	5.376 ^a	0.103
Group2(Slow freezing)	4.933 ^b	0.205
Group3(Rapid freezing)	4.670 ^b	0.234
Group4(Slow freezing under 2 Mpa pressure)	5.569 ^a	0.095
Group5(Slow freezing under 3 Mpa pressure)	5.391 ^a	0.055

a,b: Different letters denote statistically significant ($p<0.05$)

Table 2. The Median and IQR of optical density of WST-1

Groups	Median	IQR
Group1(Conventional cryopreservation)	0.627 ^{ab}	0.156
Group2(Slow freezing)	0.024 ^{bc}	0.024
Group3(Rapid freezing)	0.014 ^{bc}	0.019
Group4(Slow freezing under 2 Mpa pressure)	1.083 ^a	0.478
Group5(Slow freezing under 3 Mpa pressure)	0.544 ^{ac}	0.218

a,b,c: Different letters denote statistically significant ($p<0.05$)

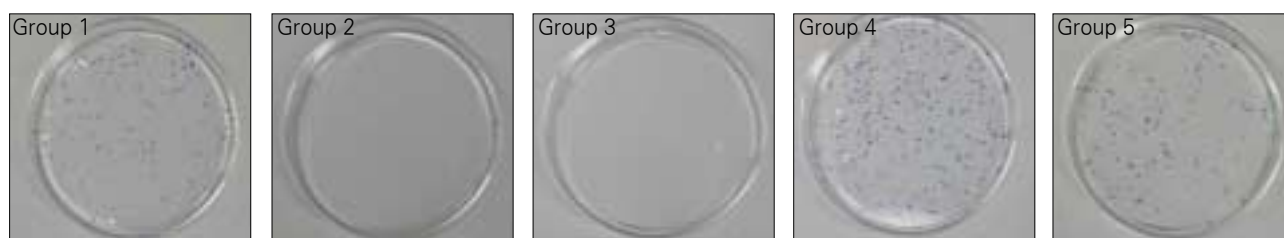


Figure 5. Clonogenic capacity of experimental groups

Table 3. The Median and IQR of the number of colonies (number of cells seeded : 1×10^3)

Groups	Median	IQR
Group1(Conventional cryopreservation)	147 ^{ab}	115.5
Group2(Slow freezing)	0 ^{bc}	0
Group3(Rapid freezing)	0 ^{bc}	0
Group4(Slow freezing under 2 Mpa pressure)	262 ^a	312.5
Group5(Slow freezing under 3 Mpa pressure)	140 ^{ac}	116

a,b,c: Different letters denote statistically significant ($p < 0.05$)

3. Clonogenic capacity

Figure 5와 같이 colony가 형성된 부위는 Giemsa에 염색이 되어 counting이 가능하였다. 형성된 colony 수는 4군이 2군과 3군에 비해 통계적으로 유의차 있게 높은 값을 나타내었다 ($p < 0.05$).

4군은 1군과 5군에 비해 높은 값을 나타냈으나 통계적인 유의차는 없었다. 또한 1군과 5군이 2군과 3군에 비해 높은 값을 나타냈으나 통계적인 유의차는 없었다.

IV. 고 찰

미성숙치아의 자가 치아 이식은 결손치의 치료에 있어서 다른 치료에 비해 좋은 결과를 나타낸다^{13,14}. 그러나 자가치아 이식을 위한 이상적인 상황이 항상 존재하는 것은 아니다. 만약 발치한 치아의 치근면에 붙어있는 세포들이 잘 유지된다면 발치 후 치아를 보관하여 필요한 때에 맞추어 쓸 수 있을 것이다.

이전부터 세포의 장기간 유지 및 보존에 관한 여러 연구들이 있었다^{7,17-19,25,26}. 오래 전부터 냉동보존 (cryopreservation)이 세포의 장기간 유지에 이용 되었다. -5°C 까지는 세포와 보존액이 얼지 않고 과냉각된 상태로 존재하며 $-5^{\circ}\text{C} \sim -15^{\circ}\text{C}$ 사이에서는 세포 외부 보존액에 얼음이 형성 되나 세포질 내로의 얼음 결정 성장을 세포막이 방해하여 세포 내부는 여전히 과냉각된 상태로 존재한다¹⁵. 세포내의 과냉각된 물은 세포 외부 보존액에 비해 높은 화학적 전위를 가지고 있어 이러한 전위차에 의해 물이 세포 외부로 흘러나와 바깥쪽에서 얼게 된다. 만일 세포가 너무 빠르게 냉동된다면 평형을 유지할 수 있을 만큼 세포내의 물이 빠른 속도

로 제거되지 않는다. 따라서 세포는 과냉각 상태가 증가 하게 되고 결국 세포 내 얼음형성을 통해 평형을 얻게 된다¹⁵.

반면 세포가 느리게 냉동될 경우 세포 내 물이 과냉각을 없앨 정도로 충분히 제거 된다. 그 결과 세포는 탈수되고 세포 내부는 냉동되지 않는다. 그러나 너무 느리게 냉동될 경우 심한 부피 수축이 일어나고 장기간 높은 용질 농도에 노출되어 세포에 손상을 주게 된다. Mazur¹⁶ 등은 이러한 용질의 농도에 따른 세포 손상을 “용질효과(solution effects)”라고 명명하였다. 즉 느린 냉동 속도에서는 높은 용질 효과(high solution effect)에 의해 심한 세포 탈수가 나며 너무 높은 냉동속도에서는 치명적인 세포 내 얼음형성 (intracellular ice formation)에 의해 세포의 손상이 나타난다(Figure 6). 따라서 용질효과를 최소화시키며 세포 내

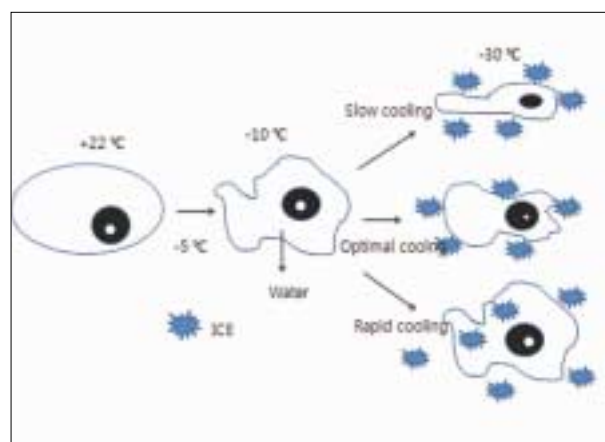


Figure 6. Schematic of physical events in cells during freezing.

얼음형성이 일어나지 않을 때 적절한 냉동속도가 결정 된다. 적절한 냉동 속도는 세포의 타입과 종류에 따라 다르다. Rapatz 와 Luyet¹⁷⁾은 인간의 적혈구 세포에서 냉동속도가 1000℃/min에서 생존율이 가장 높다고 하였고 Thorpe¹⁸⁾은 인간의 림프구에서 10℃/min의 냉동속도에서 생존율이 높다고 하였다. Leibo¹⁹⁾은 쥐의 난자 세포는 1℃/min의 냉동 속도에서 생존율이 가장 높다고 보고한 바 있다. 포유류 조직 세포에서는 특별한 경우를 제외하고 일반적으로 1℃/min의 냉동속도가 추천된다. 본 실험에서 구강 상피 세포가 저속 냉동과 급속냉동에서 좋지 않은 결과를 보이는 것은 적절한 냉동 속도 (optimal cooling rate)보다 너무 느리거나 너무 빠른 속도로 냉동이 일어났기 때문이라고 생각 된다.

고압(High Hydrostatic Pressure)이 세포막의 수송 수송과 능동 수송을 포함한 세포 내 생화학적 반응과 세포의 단백질 운곽을 변화시키는 것이 증명되었다²⁰⁻²²⁾. 여러 다양한 스트레스 자극에 반응하여 heat shock protein (HSP)가 형성되는데 고압에 의해서도 이러한 HSP가 발생한다. 다양한 종류의 세포에서 압력에 의해 HSPs의 합성이 증가한다. HSPs는 일종의 molecular chaperone으로써 접힘, 세포 내 수송, 다른 단백질과의 합성 및 분해 등을 용이하게 함으로써 스트레스에 저항하는 역할을 한다. 이 HSPs는 세포질 내 단백질의 형태와 구조를 완전하게 유지하는데 중요한 기능을 가지며²³⁾ 세포질 내 단백질을 세포 표면으로 이동시켜 면역반응을 유발하는 항원 전달체 기능도 가지고 있다²⁴⁾.

의학 분야에서도 이러한 고압을 이용하여 냉동시의 세포 손상을 방지하려는 연구들이 있어 왔다. Du 등²⁵⁾은 돼지의 난모 세포에 치 사량에 가까운 고압(20MPa)을 적용시켰을 때 스트레스 저항성이 증가함을 보고하였다. 또한 이런 방법에 의해 쥐와 소의 배아 및 돼지의 정액에 있어서도 냉동 보존시의 생존률이 증가 하였다^{8,10)}.

또한 Lee 등²⁶⁾이 쥐 치아의 치주 인대 세포를 3 Mpa압력 하에서 저속 냉동 보관하여 저속 냉동군과 냉장군, 급속 냉동군과 세포 활성도를 비교한 실험에서 저속 냉동군과 냉장군(4℃)보관 시 보다 3 Mpa의 압력 하에서 저속 냉동한 군이 MTT, WST-1값이 통계적으로 유의성 있게 높은 값을 나타내었다. 이 경우에서 HSPs의 발현으로 인해 냉동보존에 따른 스트레스 저항성이 높아진 것으로 생각된다. 본 실험에서도 2 Mpa의 압력 저속 냉동군이 저속 냉동군과 급속 냉동군에 비해 세포 활성도에 있어 좋은 결과를 나타내었고 3 Mpa의 압력 저속 냉동군은 유의차는 없지만 저속 냉동군 및 급속 냉동군에 비해 좋은 경향을 나타내었다. 이는 아마도 6일간 적용한 2 Mpa 및 3 Mpa의 압력이 이 세포에 HSPs의 발현을 유도 하였기 때문으로 생각된다.

세포의 장기간 보존을 위해 앞으로 냉동 보존 시 적절한 냉동 속도를 찾는 것과 함께 HSPs의 발현과 함께 고압에

따른 손상이 최소화되는 적절한 압력을 찾는 것이 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구는 구강 상피 세포를 배양한 후 일반적인 냉동 보존법, 저속 냉동 보존법, 급속 냉동 보존법, 2 Mpa 압력 저속 냉동 보존법, 3 Mpa 압력 저속 냉동 보존법간의 세포 활성도를 cell counting, WST-1, Clonogenic capacity의 방법으로 비교 평가 하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Cell counting에서 일반적인 냉동 보존법, 2 Mpa 압력 저속 냉동법, 3 Mpa 압력 저속 냉동법이 저속 냉동법과 급속 냉동법에 비해 통계적으로 유의차 있게 높은 세포수를 나타내었다 ($p<0.05$). 2 Mpa 압력 저속 냉동법은 3 Mpa 압력 저속 냉동법, 일반적인 냉동 보존법에 비해 높은 세포수를 나타냈으나 통계적인 유의차는 없었다.
2. WST-1 검색에서는 2 Mpa 압력 저속 냉동법이 저속 냉동법과 급속 냉동 법에 비해 통계적으로 유의차 있게 높은 흡광도 값을 나타내었다 ($p<0.05$). 2 Mpa 압력 저속 냉동법은 3 Mpa 압력 저속 냉동법, 일반적인 냉동 보존법에 비해 높은 흡광도 값을 나타냈으며 3 Mpa 압력 저속 냉동법, 일반적인 냉동 보존법이 저속 냉동법과 급속냉동법에 비해 높은 흡광도 값을 나타냈으나 통계적인 유의차는 없었다.
3. Clonogenic capacity에서는 2 Mpa 압력 저속 냉동법이 저속 냉동법과 급속 냉동법에 비해 통계적으로 유의차 있게 높은 집락수를 나타내었다 ($p<0.05$). 2 Mpa 압력 저속 냉동법은 3 Mpa 압력 저속 냉동법, 일반적인 냉동 보존법에 비해 높은 집락수를 나타냈으며 3 Mpa 압력 저속 냉동법, 일반적인 냉동 보존법이 저속 냉동법과 급속냉동법에 비해 높은 집락수를 나타냈으나 통계적인 유의차는 없었다.

위의 결과를 통해 구강상피세포에서 2 Mpa 혹은 3 Mpa의 압력을 이용한 저속 냉동법이 저속 냉동법 및 급속 냉동법 보다 세포 활성도에 있어 우수한 경향을 나타냄을 알 수 있다. 자가 치아 이식을 위해서는 치주인대세포를 통한 연구가 필요하며 적절한 압력과 냉동속도에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 김재욱, 김의성, 김진, 이승중. 급속냉동된 쥐 치아의 in vivo MTT 검색법을 이용한 치주인대세포 활성도 평가. *대한치과보존학회지* 31: 192-202, 2006.
2. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247:125-42, 1984.

3. Farrant J. Water transport and cell survival in cryobiological procedures. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 278 (959):191-205, 1977.
4. Fujikawa S. "Freeze-fracture and etching studies on membrane damage on human erythrocytes caused by formation of intracellular ice." *Cryobiology* 17(4):351-62, 1980.
5. Diller KR, Cravalho EG. A cryomicroscope for the study of freezing and thawing processes in biological cells. *Cryobiology* 7 (4):191-9, 1971.
6. Kawata T. Tooth transplantation by teeth bank-approach to human-Hiroshima. Department of Orthodontics, Hiroshima University School of Dentistry, 2005.
7. 안현정, 김의성, 김진, 김덕원, 김기열, 이찬영, 이승중. 자기장 저속 냉동보관법을 이용한 쥐 치아 치주인대세포의 활성화 검사. *대한치과보존학회지* 33:332-240, 2008.
8. Pribenszky C, Molnar M, Cseh S, Solti L. Improving post-thaw survival of cryopreserved mouse blastocysts by hydrostatic pressure challenge. *Anim Reprod Sci* 87(2):143-50, 2005.
9. Pribenszky C, Molnar M, Ulrich P, et al. Pressure assisted cryopreservation. *Reprod Dom Anim* 40:228-344, 2005.
10. Kuo YH, Pribenszky Cs, Huang SY. Higher litter size is achieved by the insemination of high hydrostatic pressure-treated frozen-thawed boar semen. *Theriogenology* 70:1395-96, 2008.
11. Berridge MV, Tan AS, McCoy KD, Wang R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* 4:15-20, 1996.
12. 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* 3(1):3-10, 2002.
13. Czochrowska EM, Stenvik A, et al. "Outcome of tooth transplantation: survival and success rates 17-41 years posttreatment." *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 121 (2):110-9:quiz 193, 2002.
14. Jonsson T, Sigurdsson TJ. "Autotransplantation of premolars to premolar sites. A long-term follow-up study of 40 consecutive patients." *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 125(6):668-75, 2004.
15. Mazur P. "Equilibrium, quasi-equilibrium, and non-equilibrium freezing of mammalian embryos." *Cell Biophys* 17(1):53-92, 1990.
16. 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):345-55, 1972.
17. Rapatz G, Sullivan JJ, et al. "Preservation of erythrocytes in blood containing various cryoprotective agents, frozen at various rates and brought to a given final temperature." *Cryobiology* 5(1):18-25, 1968.
18. Thorpe PE, Knight SC, et al. "Optimal conditions for the preservation of mouse lymph node cells in liquid nitrogen using cooling rate techniques." *Cryobiology* 13(2):126-33, 1976.
19. Leibo SP, McGrath JJ, et al. "Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilized mouse ova as a function of cooling rate." *Cryobiology* 15(3):257-71, 1978.
20. Abe F, Kato C, Horikoshi K. Pressure regulated metabolism in microorganisms. *Trends Microbiol* 7 (11):447-453, 1999.
21. Aldridge BE, Bruner LJ. Pressure effects on mechanisms of charge transport across bilayer membranes. *Biochem Biophys Acta* 817 (2):343-354, 1985.
22. 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. *Theriogenology* 70:1391, 2008.
23. Parsell DA, Lindquist S. The function of heat shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Ann Rev Genet* 27:437-96, 1993..
24. Pelham HR. Heat shock proteins: coming in from cold. *Nature* 332:776-7, 1988.
25. 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):325-30, 2008.
26. 이영은, 김의성, 김진, 한승훈, 이승중. 압력 저속 냉동 방법의 쥐 치아 치주인대세포 보존 효율 평가. *대한치과보존학회지* 34:356-363, 2009.

국문초록

구강상피세포의 냉동보관 방법에 따른 세포생존률 비교

백도영 · 이승종 · 정한성 · 김의성*

연세대학교 치과대학 치과보존학교실

본 연구의 목적은 구강상피세포를 배양한 후 각기 다른 조건의 냉동 보존법으로 6일간 보존 시 각각의 세포의 활성도를 Cell counting, WST-1, Clonogenic capacity의 방법을 이용하여 비교 평가하기 위함이다. 각 실험군당 1×10^6 개의 세포를 다음의 방법으로 6일간 냉동 보존한다. Freezing container에 담아 $1^\circ\text{C}/\text{min}$ 의 냉동속도로 -70°C 까지 냉동 후 -196°C 에 냉동하여 보관한 일반 냉동 보존군, 세포를 바로 -196°C 의 액화질소에 넣어 냉동한 급속 냉동 보존군, 4°C 에서 -35°C 까지 $-0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ 속도로 서서히 냉동시킨 뒤 -196°C 에 냉동한 저속 냉동 보존군, 2 Mpa, 3 Mpa의 압력을 가하고 $-0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ 속도로 4°C 에서 -35°C 까지 서서히 냉동시킨 뒤 -196°C 에 냉동한 2 Mpa, 3 Mpa압력 저속 냉동 보존군으로 나누었다. 6일 후 냉동되었던 세포를 급속 해빙하여 각각의 Cell counting, WST-1, Clonogenic capacity 값을 측정하여 비교하였다.

실험 결과 2 Mpa 혹은 3 Mpa의 압력을 이용한 저속 냉동법이 저속 냉동법 및 급속 냉동법 보다 세포 활성도에 있어 우수한 경향을 나타내었다.

주요단어: WST-1, Cell counting, Clonogenic capacity, 압력 저속 냉동, 저속냉동, 급속냉동