

# β-glycerophosphate 혼합시 인간 치수 세포에 대한 Portland cement의 생활성에 관한 연구

오영환<sup>1</sup> · 장영주<sup>2</sup> · 조용범<sup>1\*</sup>

단국대학교 치과대학 <sup>1</sup>치과보존학교실, <sup>2</sup>치과생화학교실

## ABSTRACT

### A BIOACTIVITY STUDY OF PORTLAND CEMENT MIXED WITH β-GLYCEROPHOSPHATE ON HUMAN PULP CELL

Young-Hwan Oh<sup>1</sup>, Young-Joo Jang<sup>2</sup>, Yong-Bum Cho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Conservative Dentistry, <sup>2</sup>Department of Dental Biochemistry, College of Dentistry, Dankook University

The purpose of this study is to investigate the response of human pulp cell on Portland cement mixed with β-glycerophosphate. To investigate the effect of β-glycerophosphate and/or dexamethasone on human pulp cell, ALP activity on various concentration of β-glycerophosphate and dexamethasone was measured and mineral nodule of human pulp cell was stained with Alizarin red S. MTS assay and ALP activity of human pulp cell on Portland cement mixed with various concentration of β-glycerophosphate (10 mM, 100mM, 1M) was measured and the specimens were examined under SEM.

Addition of β-glycerophosphate or dexamethasone alone had no effect however, the addition of 5 mM β-glycerophosphate and 100 nM dexamethasone had the largest increasement in ALP activity. There was no toxicity in all samples and the data showed that Portland cement mixed with 10 mM β-glycerophosphate had more increase in ALP activity compared with control.

In conclusion, Portland cement mixed with β-glycerophosphate has no toxicity and promotes differentiation and mineralization of pulp cell compared with additive-free Portland cement. This implicated that application of Portland cement mixed with β-glycerophosphate might form more reparative dentin and in turn it would bring direct pulp capping to success. [J Kor Acad Cons Dent 34(5):415-423, 2009]

**Key words :** Portland cement, β-glycerophosphate, human pulp cell, ALP activity, mineralization

-Received 2009.4.14., revised 2009.4.24., accepted 2009.8.7.-

## I. 서 론

외상이나 우식 등으로 인한 치수 노출 시 시행하는 직접 치수 복조술은 수산화칼슘이나 Mineral Trioxide Aggregate(MTA) 등의 재료로 노출된 부위를 수복하여 상

아질 형성을 유도하여 치수의 생활력을 유지하는 수복법이다. 치수가 노출되면 노출된 부위의 상아모세포는 괴사되지만, 적절한 수복이 이루어지면 새로운 상아모세포양 세포가 삼차 상아질을 형성한다.

새로운 상아모세포양 세포는 치수 내 줄기세포에서 분화한다고 알려져 있으며 이 줄기세포는 외상이나 우식으로 상아모세포 층의 손상이 있을 때 분화하여 결손된 상아모세포 층을 대체함으로써 삼차 상아질을 형성한다. 치수 내 줄기세포를 분리하여 분화실험을 시행하면 세포가 다양한 세포로 분화되었다는 보고가 있으며 또한 나이와 관련 없이 존재한다는 보고도 있었다<sup>1,2)</sup>.

Corresponding author: **Yong-Bum Cho**  
Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Dankook University  
San 7-1, Shinbu-dong, Cheonan, 330-716, Korea  
Tel: 82-41-550-1966 Fax: 82-41-550-1963  
E-mail: raindrop@dku.edu

최근 생체 외 실험에서 치수세포내 줄기세포를 이용하여 상아질을 만들려는 시도는 여러 번 있었다. 인간 치아에서 치수를 발수하여 배양한 뒤  $\beta$ -glycerophosphate를 첨가하여 2달간 배양한 결과, 상아질 기질이 형성되었다는 보고가 있으며<sup>2)</sup> 또 치수내의 줄기세포만 따로 분리시켜 배양함으로써 골을 형성시켰다는 보고도 있었다<sup>3)</sup>.

상아질을 형성하기 위해서는 치수의 줄기 세포를 상아모세포로 분화시켜야 하는데 이것을 촉진하기 위해 골모세포 분화에 사용되는  $\beta$ -glycerophosphate, dexamethasone, ascorbic acid 등이 이용된다. 생체 외 실험에서 인간 치수 조직을 배양하였을 때  $\beta$ -glycerophosphate를 첨가한 조직에서만 상아모세포가 관찰되었으며<sup>4)</sup>, 인간 치수 세포를 배양 시 dexamethasone을 첨가하였을 때 더 많은 석회화가 일어났다고 하였다<sup>5)</sup>. 그러나, 인간 치수세포의 분화에 대한  $\beta$ -glycerophosphate와 dexamethasone의 적정 농도는 아직 보고된 바가 없다.

직접 치수 복소에서 MTA가 수산화칼슘보다 더 생체 친화적이며<sup>6)</sup>, 세포 증식을 증가시키며<sup>7)</sup>, 수중에서 장기간 용해되면서 수산화칼슘을 방출하여 주변 조직의 석회화를 촉진한다는 보고가 있다<sup>8,9)</sup>. MTA의 주요 구성물은 Portland cement와 bismuth oxide이고<sup>10)</sup>, bismuth oxide는 방사선 불투과성을 증가시키기 위해 첨가된다. Portland cement는 공업용 시멘트로써 수산화칼슘이 주성분이며<sup>11)</sup> 치수세포에 대한 독성이 거의 없으며 치수의 석회화를 증진시킨다<sup>12)</sup>.

Portland cement가 수중에서 장기간에 걸쳐 용해되는 것은 예비 실험에서 관찰되었으므로  $\beta$ -glycerophosphate을 혼합한 Portland cement는 수산화칼슘과 함께  $\beta$ -glycerophosphate을 장기간 용해할 것으로 추측된다. 본 실험에서는  $\beta$ -glycerophosphate가 치수세포에 미치는 효과에 대해서 조사하였고  $\beta$ -glycerophosphate을 혼합한 Portland cement에 대한 치수세포의 반응을 알아보았다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 치수세포배양

12시간 이내 발거한 치아 우식증이 없고 수복물이 없는 20대 초반의 제3 대구치를 백악법랑경계부에 멸균 생리식염수 수주 하에 high speed bur로 흠을 만들어서 분할하였으며, 치근부의 치수를 멸균된 기구로 분리해서  $\alpha$ -MEM (GibcoBRL, NY, USA)에 보관하였다. 실험실에서 가위로 치수를 작은 크기로 자르고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다 (Figure 1). 본 실험에서 사용한 배양액은 10% 소혈청과 항생제(100 UI/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 0.25  $\mu$ g/ml amphotericin B)를 첨가한  $\alpha$ -MEM이었으며



Figure 1. Pulp cell emerged from pulp tissue

일주일에 두 번 배양액을 교환해 주었다.

### 2. 치수세포의 분화에 대한 $\beta$ -glycerophosphate와 dexamethasone의 효과 연구

24 well에 1×10<sup>4</sup>개/ml의 3세대 인간 치수 세포를 배양액에서 배양하고  $\beta$ -glycerophosphate (Sigma, St. Louis, USA)와 dexamethasone (Sigma, St. Louis, USA)을 첨가하였다.  $\beta$ -glycerophosphate의 농도는 5 mM, 10 mM, 50 mM이고 dexamethasone의 농도는 10 nM, 50 nM, 100 nM이었으며 한 가지의 분화제를 첨가하여 실험하였고 혼합 첨가하여서도 실험하였다. 일주일에 두 번 배양액과 분화제를 교환해 주었다.

14일 배양이후 alkaline phosphatase (ALP) 활성도를 측정하였다. 배양액을 제거하고 PBS로 씻은 뒤 trypsin으로 세포를 채취하여 15 ml tube에 넣었다. 원심 분리 (1500 rpm, 3 min)한 뒤 상층 배양액을 제거하고 세포막을 파괴하기 위해 2% triton X-100을 첨가하고 -20°C로 얼렸다. 제조사의 지시 (ALP kit 104, Sigma, USA)에 따라 활성도를 측정하기 위해 5분 동안 37°C로 해동시켰으며 총 단백질을 DC protein assay kit (BioRad, Hercules, USA)를 사용하여 측정하고 기질로서 P-nitrophenyl phosphate를 사용하여 ALP 활성도를 측정하였다. ALP는 P-nitrophenyl phosphate을 P-nitrophenol과 phosphate으로 가수분해하는 원리를 이용하여 P-nitrophenol의 양을 분광광도계에서 405 nm 파장으로 측정하였고 표준 단백질 곡선을 기초로 이 흡수도를 ALP 활성도로 변환하였다.

28일 배양이후 alizarin red 염색을 시행하여 calcium의 양을 관찰하였다. 24 well에서 배양액을 제거하고 PBS로

씻어낸 뒤 pH를 4.1~4.3으로 적정한 Alizarin red S (sigma, St. Louis, USA)에 20분간 염색하고 증류수로 3번 씻어내고 24시간동안 증류수를 넣어 두어서 염색이 되지 않은 여분의 Alizarin Red S를 제거하였다.

3. *β-glycerophosphate*를 혼합한 Portland cement 제작

Portland cement (한주바이오, 김해, 한국)을 혼수비 (cement / liquid) 0.3으로 혼합하였으며 liquid는 *β-glycerophosphate*의 농도에 따라 증류수, 10 mM, 100 mM, 1M 농도의 *β-glycerophosphate*을 사용하였다. 직경 12 mm cell culture plate insert에 들어갈 수 있게 직경 10 mm 높이 1 mm의 원통형 mold에 혼합하였고 100% 습도에서 24~48시간 동안 굳혔다. 그 후 멸균을 위해서 autoclave에서 고압가열한 뒤 3일 동안 배양액에 담구어 두었다.

4. *β-glycerophosphate*을 혼합한 Portland cement에 대한 인간 치수 세포의 MTS assay와 ALP activity 측정

준비된 Portland cement 시편이 들어 있는 culture plate insert(0.4 μm membrane, 직경: 12 mm, Non-treated, <sup>®</sup>MilliCell corp., USA)가 있는 24 well에 5×

10<sup>4</sup>개/ml 5계대 인간 치수 세포를 배양하였다 (Figure 2, 3). 배양액은 일주일에 두 번 교환해 주었으며 1, 3, 7일 후에 MTS assay을 시행하여 시편의 세포독성을 측정하였다.

MTS assay을 하기 위해 배양액을 제거하고 PBS로 씻은 다음 MTS 시약(Cell Titer 96 Promega Corp., USA)과 배양액을 넣어주고 3시간 배양하였고 그 후 배양액을 96 well로 옮기고 490 nm 파장으로 측정하였다(n=9).

MTS assay와 같은 방법으로 1×10<sup>4</sup>개/ml 3계대 인간 치수 세포를 배양하였고 배양 7일 후 ALP 활성도를 측정하였다(n=6). One-way ANOVA(p > 0.05)와 Scheffe test을 사용하여 통계학적인 분석을 하였다.

5. *β-glycerophosphate*을 혼합한 Portland cement 표면에 배양한 인간 치수 세포의 SEM 관찰

5×10<sup>4</sup>개/ml의 5계대 인간 치수 세포를 준비된 Portland cement 시편 위에 1, 3, 7일 동안 배양하였다 (Figure 4). 배양액을 제거하고 2.5% glutaraldehyde로 10분 고정, 75% ethanol, 95% ethanol로 5분간 탈수, 100% ethanol로 5분간 2회 탈수, 1.1.1.3.3.3.-hexamethyldisilazane으로 10분간 2회 처리하였다. Gold-palladium으로 코팅한 뒤 SEM(Hitachi S-3000H, Japan)으로 관찰하였다 (Figure 5).

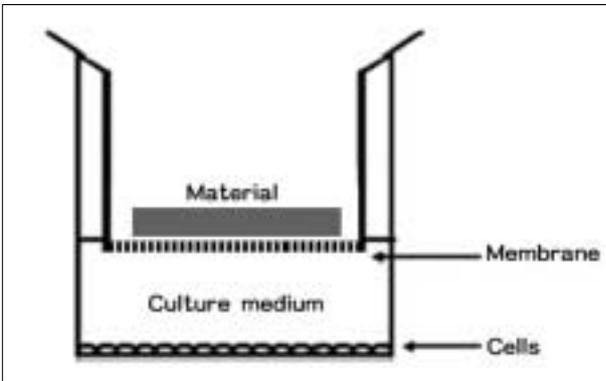


Figure 2. Indirect contact culture



Figure 3. Insert placed in 24 well

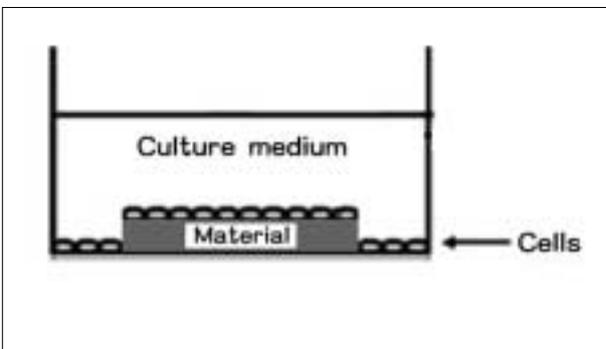


Figure 4. Direct contact culture



Figure 5. Hitachi S-3000H

### III. 연구 결과

#### 1. 치수세포의 분화에 대한 $\beta$ -glycerophosphate와 dexamethasone의 효과 연구

##### ALP activity

한 가지 분화제만 첨가한 경우 ALP activity은 5 mM  $\beta$ -glycerophosphate에서만 대조군보다 약간 높았으며  $\beta$ -glycerophosphate 농도가 높아질수록 ALP activity이 낮아지는 경향을 보였다. dexamethasone은 농도에 관계없이 대조군보다 약간 낮은 ALP activity을 보였다(Figure 6).

두 종류의 분화제를 혼합하여 사용하였을 때는 5 mM  $\beta$ -glycerophosphate와 100 nM dexamethasone을 적용한 경우에서 대조군보다 약 50%정도의 ALP activity 증가를 보였으며  $\beta$ -glycerophosphate와 dexamethasone의 농도가 증가할수록 ALP activity가 감소하는 경향을 보였다(Figure 7).

##### Alizarin red S 염색

다른 군에 비해 5 mM  $\beta$ -glycerophosphate와 100 nM dexamethasone을 적용한 실험군에서 특히 많이 염색되었

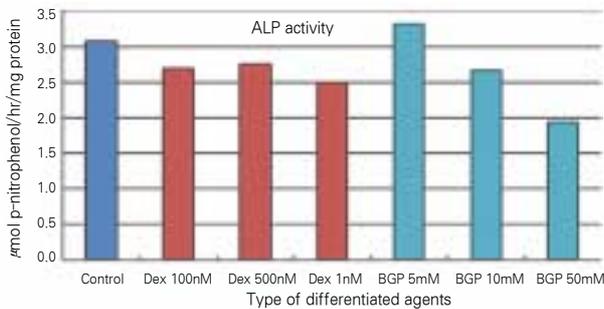


Figure 6. ALP activity (addition of one differentiated agent alone)

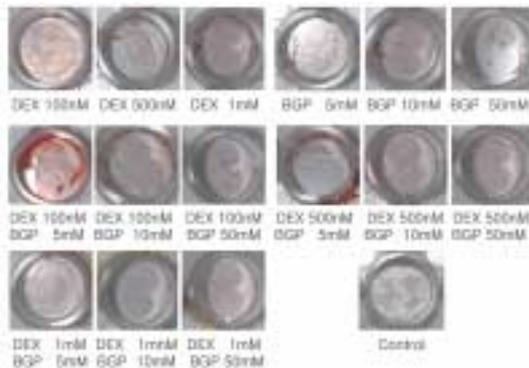


Figure 8. Alizarin red staining (addition of differentiated agents)

다(Figure 8).

#### 2. $\beta$ -glycerophosphate를 혼합한 Portland cement에 대한 인간 치수 세포의 MTS assay

1일 모든 실험군이 대조군과 비슷한 MTS 수치를 보였고 3일 모든 실험군이 대조군보다 낮은 수치를 보였으며 1일 수치와 비슷하였다. 7일 모든 실험군의 경우에는 대조군과 비슷한 수치를 보였다(Figure 9).

#### 3. $\beta$ -glycerophosphate을 혼합한 Portland cement에 대한 인간 치수세포의 ALP activity

$\beta$ -glycerophosphate을 포함하지 않은 시편은 대조군(치수세포만 있는 경우)과 비슷하였으며  $\beta$ -glycerophosphate 10 mM을 혼합한 시편의 ALP activity가 대조군에 비교하여 통계학적인 차이를 보였으며  $\beta$ -glycerophosphate 100mM, 1M은 대조군보다 약간 증가된 ALP activity을 보였으나 통계학적으로 의미있는 차이를 보이지 않았다(Figure 10).

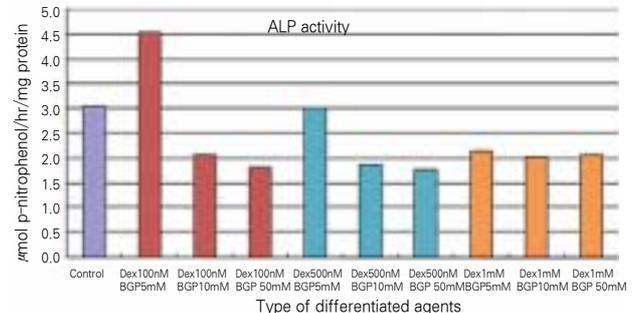


Figure 7. ALP activity (addition of two differentiated agents)

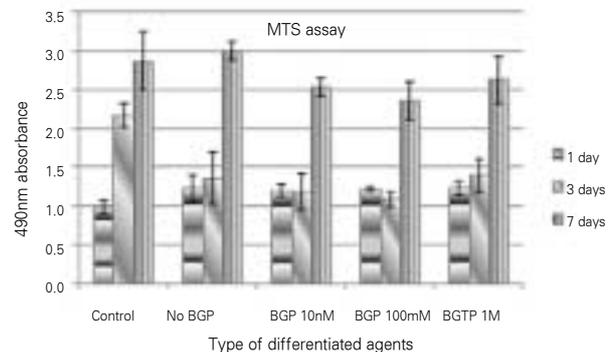
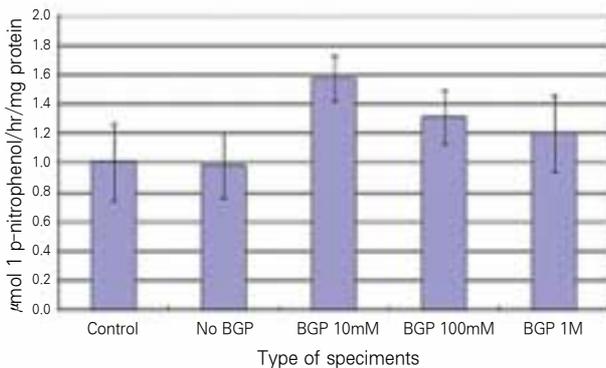


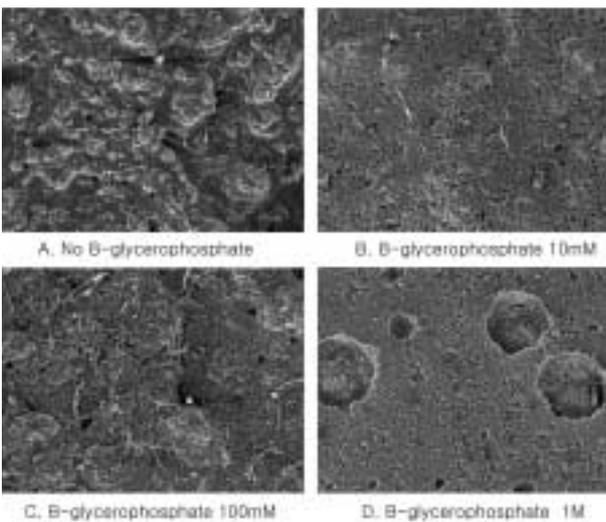
Figure 9. MTS assay of pulp cell on Portland cement mixed with  $\beta$ -glycerophosphate

#### 4. $\beta$ -glycerophosphate를 혼합한 Portland cement의 SEM 관찰

1일, 3일, 7일날 SEM 관찰을 하였다. 1일 날은 4군의 시편 모두 세포 수가 비슷하게 존재하고 있었으며 3일 날  $\beta$ -glycerophosphate를 혼합하지 않은 시편과 10 mM, 1 M을 혼합한 시편의 세포수가 1일과 비슷하였으나, 3일  $\beta$ -glycerophosphate 100 mM을 혼합한 시편의 세포수가 1일에 비해 2~3배 증가하였다. 7일 날  $\beta$ -glycerophosphate을 혼합하지 않은 시편과 10 mM의 세포수가 3일에

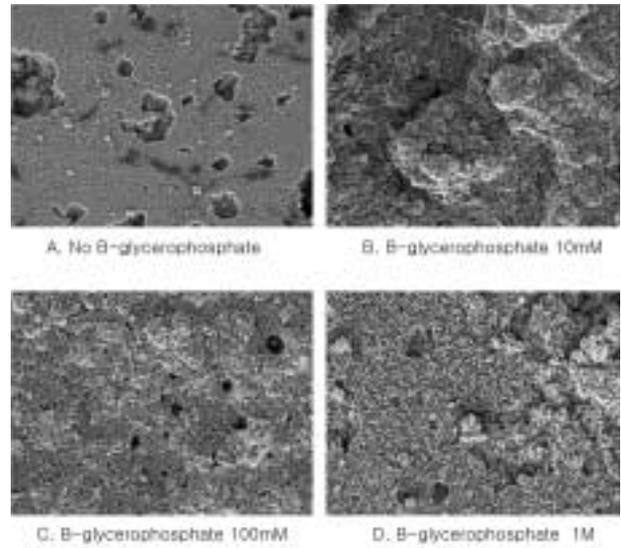


**Figure 10.** ALP activity of pulp cell on Portland cement mixed with  $\beta$ -glycerophosphate

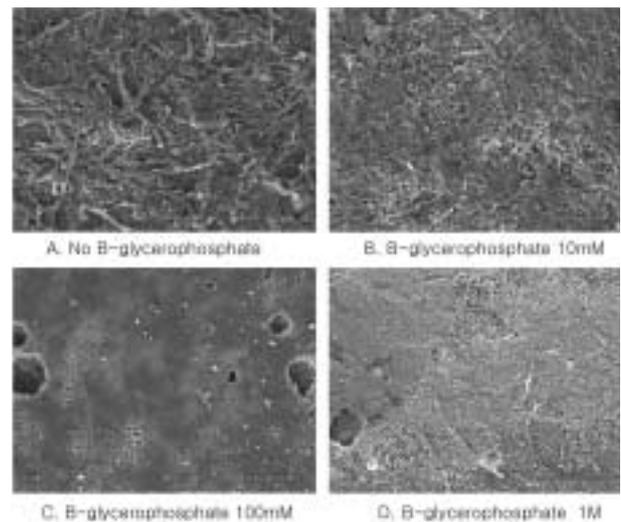


**Figure 12.** SEM evaluation of pulp cell on Portland cement mixed with  $\beta$ -glycerophosphate at 3 days. A: Portland cement with no  $\beta$ -glycerophosphate. B, C, D: Portland cement with  $\beta$ -glycerophosphate 10 mM, 100 mM, 1 M.

비해 증가하였으며 세포의 크기도 매우 커졌고 7일 날  $\beta$ -glycerophosphate 100 mM을 혼합한 시편은 세포에 의해 모든 표면이 덮였다. 7일  $\beta$ -glycerophosphate 1 M은 거의 세포가 자라지 않았고 시편 표면에 다각형의 입자들이 관찰되었으며 그 상방에는 세포들이 거의 자라지 않았다 (Figure 11, 12, 13).



**Figure 11.** SEM evaluation of pulp cell on Portland cement mixed with  $\beta$ -glycerophosphate at 1 day. A: Portland cement with no  $\beta$ -glycerophosphate. B, C, D: Portland cement with  $\beta$ -glycerophosphate 10 mM, 100 mM, 1 M.



**Figure 13.** SEM evaluation of pulp cell on Portland cement mixed with  $\beta$ -glycerophosphate at 7 days. A: Portland cement with no  $\beta$ -glycerophosphate. B, C, D: Portland cement with  $\beta$ -glycerophosphate 10 mM, 100 mM, 1 M.

#### IV. 총괄 및 고안

외상, 우식으로 인한 상아질 손상과 치수 노출에 따른 상아모세포 상실시 직접 치수 복조술의 목적은 수복 상아질을 형성하는 새로운 상아모세포층을 만드는 것이다. 치수의 cell-rich zone내 미분화된 중간엽 세포가 손상부위로 이동하여 상아모세포로 분화하는 증거가 있지만<sup>13)</sup>, 아직까지 정확한 기전은 알려지지 않았다<sup>14)</sup>.

치아에서 치수를 제거해도 상아모세포는 상아질에 붙어있다고 하였다<sup>15,16)</sup>. 그러므로 인간 치수 세포를 배양하기 위해 치수를 치아에서 분리할 때 상아모세포는 치아에 남아 있게 되고 본 실험에서 사용된 인간 치수 세포에는 상아모세포가 존재하지 않는다. 쥐 치수 중간엽 줄기 세포의 계대 수에 따른 분화 정도를 연구한 논문에서 계대 수가 증가할수록 분화력이 감소하는 결과를 보여 주었다<sup>17)</sup>. 예비 실험에서 관찰 시 치수 세포의 계대 수가 증가하면 증식력이 감소하였다 (No data). 그래서 본 실험에서는 석회화 능력 측정 시 더 명확한 결과를 얻기 위해 3계대의 치수 세포를 사용하였으며 증식능력 측정 시에는 일반적으로 많은 논문들에서 사용하는 5-8계대의 치수를 사용하였다.

인간 치수 조직을  $\beta$ -glycerophosphate가 첨가한 배양액에서 배양하면 극성을 가진 상아모세포와 비슷한 세포와 석회화 현상이 관찰되었고  $\beta$ -glycerophosphate을 첨가하지 않은 경우에는 나타나지 않았다<sup>4)</sup>. 그러므로 본 실험에서 대조군보다 ALP activity가 증가하는 것은 치수 세포가 상아모세포와 비슷한 세포로 분화하는 것으로 해석할 수 있다.

$\beta$ -glycerophosphate의 농도에 대한 치수 석회화 비교 실험에서 2 mM과 10 mM을 쥐 치수 세포에 첨가하여 배양하였을 때 2 mM보다 10 mM에서 더 많은 석회화가 보고되었다<sup>18)</sup>. 예비 실험에서 100 mM을 첨가 시 세포의 괴사가 보였으나 50 mM에서는 괴사가 보이지 않았기 때문에 본 실험에서는 50 mM을 최대 농도로 사용하였다. 본 실험에서는 10 mM보다 5 mM가 더 많은 석회화를 보였으므로 치수세포에 대한  $\beta$ -glycerophosphate의 적정 농도는 2 mM에서 5 mM 사이로 추정되며 추가 실험이 필요하다. Dexamethasone 100 nM을 인간 치수 세포에 첨가하여 배양하였을 때 석회화의 증가가 보고되었다<sup>9)</sup>. 그러나 본 실험에서는 100 nM이 가장 석회화를 많이 일으켰으며 농도가 높아질수록 석회화가 감소하였다. 그러므로 dexamethasone의 적정 농도는 100 nM보다 더 낮을 것으로 추정된다.

Dexamethasone는 골수세포와 치수세포의 분화를 촉진하고 ALP activity를 증가시킨다<sup>4,19)</sup>. 그러나 본 연구에서는  $\beta$ -glycerophosphate와 함께 사용되지 않으면 분화 효과가 없었다. 이 결과는 이전 논문들과 다른 결과이며 본 실험에서 사용한 dexamethasone의 농도가 이전 논문들보다 높

았기 때문으로 생각된다.

본 연구에서  $\beta$ -glycerophosphate만 첨가한 경우에서 ALP activity가 거의 증가하지 않았으나 dexamethasone과 함께 첨가한 경우에는 1.6배 정도 증가를 보였다. 쥐의 골수세포에 대한  $\beta$ -glycerophosphate의 효과를 알아본 연구에서는  $\beta$ -glycerophosphate는 분화 초기에 관련되며 분화 이후에는 큰 영향을 미치지 않는다고 하였다<sup>20)</sup>. 치수 세포의 상아모세포 분화와 관련해서도 비슷할 것으로 추측되며 본 실험에서  $\beta$ -glycerophosphate만 첨가한 경우 ALP activity가 거의 증가하지 않는 이유가 된다.  $\beta$ -glycerophosphate을 혼합한 Portland cement위 치수세포는 용출되는  $\beta$ -glycerophosphate에 의해 초기 분화가 더 많이 일어나고 그 뒤 Portland cement의 영향을 받아 석회화가 일어난다. 이 초기 분화의 증가가  $\beta$ -glycerophosphate을 혼합한 Portland cement가 기존의 Portland cement보다 더 많은 석회화를 일으키는 것으로 생각된다.

1일, 7일 Portland cement의 MTS 결과에서는 대조군과 차이를 보이지 않았으나 3일은 대조군보다 낮은 결과를 보였으며 SEM 평가에서도 비슷하게 나타났다. 그러나 임상적 사용시 이 재료를 치아에 장기간 적용할 것이기 때문에 독성이 매우 낮다고 할 수 있다.

Cell culture plate insert는 치아에 사용되는 재료의 독성 검사 시 광범위하게 사용되고 있으며 재현성이 좋고 세포가 균일하게 재료에 노출되는 장점이 있으나 재료에 직접 접촉하는 것과는 차이가 있다<sup>21)</sup>. 3, 7일 SEM 평가 시  $\beta$ -glycerophosphate 100 mM의 시편에서 가장 많은 세포 증식을 보였으나 MTS에서는 모든 시편에서 비슷한 결과가 보였다. 이는 재료에 직접 노출되는 것과 간접 노출되는 것의 차이로 생각된다.

MTA는 장기간 수중에 두었을 때 20~30%의 용해가 일어나고, 초기에 많은 용해가 일어나며 시간이 흐를수록 감소한다<sup>8)</sup>. Portland cement도 비슷할 것으로 추측되며 예비 실험에서도 장기간 수중 보관 시 시편의 크기가 줄어들을 볼 수 있었다. Portland cement가 용해될 때 혼합되어 있는  $\beta$ -glycerophosphate가 용출되어 치수 석회화 초기에 영향을 미칠 것이다. 본 실험에서  $\beta$ -glycerophosphate 10 mM의 ALP 활성도가 가장 높게 관찰되었으며 이 것은 석회화 초기에  $\beta$ -glycerophosphate가 영향을 주고 그 뒤 cement에서 용출되는 수산화칼슘이 영향을 주었기 때문으로 추측된다.

MTA와 Portland cement을 비교한 실험은 많이 존재한다. 변연 적합성을 SEM으로 관찰한 실험에서 MTA와 Portland cement은 거의 차이가 없었으며<sup>22)</sup> 박테리아를 이용한 미세누출 실험에서도 두 재료의 차이는 없었다<sup>23)</sup>. 세포 독성실험에서 두 재료의 독성과 세포 활성도는 비슷하였지만<sup>24,25)</sup> 미세경도를 비교한 실험에서는 MTA가 더 높았다<sup>26)</sup>.

따라서 Portland cement는 아직은 임상적으로 사용되기는 힘들지만 미래에 MTA를 대체할만한 재료이며 본 실험에서는  $\beta$ -glycerophosphate을 혼합하여 이 재료의 생활성을 높일 수 있음을 확인하였다.

향후  $\beta$ -glycerophosphate 뿐만 아니라 dexamethasone, ascorbic acid, bone morphologic protein (BMP), transforming growth factor (TGF) 등의 growth factor를 Portland cement에 혼합하여 그 생활성을 알아볼 필요가 있다. 그러나 BMP와 TGF는 단백질이기 때문에 체내의 pH 7.4보다 높은 Portland cement의 pH 11~12에서는 변성이 일어나기 때문에 Portland cement와 혼합시 효과가 없을 것이며 쥐의 치수 절단술에서 MTA와 BMP을 사용한 군과 MTA 단독으로 사용한 군 간 차이는 없었다<sup>27)</sup>. 그러므로 Portland cement의 물성을 향상시키기 위해 첨가하는 물질은 Portland cement의 높은 pH를 견디는 물질이어야 한다.

MTA는 치근이나 치근 이개부 천공 시에도 사용된다. MTA는 인간 치조골 세포의 증식, 부착, 기질 형성을 증진시킨다<sup>28)</sup>. Portland cement도 유사한 작용을 나타낼 것으로 예상되며  $\beta$ -glycerophosphate은 골모세포의 분화 촉진제로 주로 사용되기 때문에  $\beta$ -glycerophosphate을 혼합한 Portland cement은 골모세포의 석회화를 증가시킬 것으로 예상되며 실험을 통해 알아볼 필요가 있다.

## V. 결 론

$\beta$ -glycerophosphate가 치수세포에 미치는 효과와  $\beta$ -glycerophosphate을 혼합한 Portland cement에 대한 치수세포의 반응을 알아본 연구에서는 다음과 같은 결론을 얻었다.

1.  $\beta$ -glycerophosphate는 치수 세포의 분화 초기에 영향을 미치며 단독으로는 석회화 증가를 거의 보이지 않았다.
2.  $\beta$ -glycerophosphate이 혼합된 Portland cement는 MTS assay에서 치수 세포에 대한 독성이 없었다.
3.  $\beta$ -glycerophosphate이 혼합된 Portland cement는 첨가물없이 단독으로 사용된 Portland cement에 비해 치수 세포의 석회화를 증가시켰다.
4.  $\beta$ -glycerophosphate이 혼합된 Portland cement표면에서 첨가물없이 단독으로 사용된 Portland cement에 비해 더 많은 세포의 부착 및 증식이 일어났다.

임상적으로 직접 치수 복조시  $\beta$ -glycerophosphate를 혼합한 Portland cement 적용은 일반 Portland cement보다 재료 하방에 더 많은 상아질을 형성시킬 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Gehron PR, and Shi S: Postnatal human dental pulp stem cells(DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 97:13625-13630, 2000.
2. Imad A, Marie-Jose B, Philippe D, Jean C, Jean-Claude F and Thimios A. Mitsiadis: Human dentin production in vitro. *Exp Cell Res* 258:33-41, 2000.
3. Gregorio L, Riccardo A, Antonio G, Vladimiro L, Francesco C, Fabio N, Giuseppe P and Gianpaolo P: A New population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res* 20:1394-1402, 2005.
4. Couble ML, Farges JC, Bleicher F, Perrat-Mabillon B, Boudeulle M and Magloire H.: Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. *Calcif Tissue Int* 66:129-138, 2000.
5. Huang GT, Shagramanova K and Chan SW.: Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. *J Endod* 32:1066-1073, 2006.
6. Yun YR, Yang IS, Hwang IN, Choi HR, Yoon SJ, Kim SH and Oh WM: Pulp Response of Mineral Trioxide Aggregate, Calcium Sulfate or Calcium Hydroxide. *J Kor Acad Cons Dent* 32:95-101, 2007.
7. Moghaddame-Jafari S, Mantellini MG, Botero TM, McDonald NJ and Nör JE: Effect of ProRoot MTA on Pulp Cell Apoptosis and Proliferation In Vitro. *J Endod* 31:387-391, 2005.
8. Fridland M, Rosado R: MTA Solubility: A Long Term Study *J Endod* 31:376-379, 2005.
9. Fridland M, Rosado R: Mineral Trioxide Aggregate (MTA) Solubility and Porosity with Different Water-to-Powder Ratios. *J Endod* 29:814-817, 2003.
10. Estrela C, Bammann LL, Estrela CR, Silva RS and Pécora JD.: Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Braz Dent J* 11:3-9, 2000.
11. Glasser FP: Fundamental aspects of cement solidification and stabilisation. *J Hazardous Materials* 52:151-170, 1997.
12. Min KS, Kim HI, Park HJ, Pi SH, Hong CU and Kim EC: Human Pulp Cells Response to Portland Cement In Vitro. *J Endod* 33:163-166, 2007.
13. Cotton WR: Pulp response to cavity preparation as studies by the method of thymidine <sup>3</sup>H autoradiography. in: Finn SD(ed). *Biology of the dental pulp organ*. Tuscaloosa, AL: Univ Alabama Press, 69, 1968.
14. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG and Shi S: SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:5807-5812, 2003.
15. Pincus P: Some physiological data on the human dental pulp. *Br Dent J* 89:143-148, 1950.
16. Tjäderhane L, Salo T, Larjava H, Larmas M and Overall CM: Novel Organ Culture Method to study the Function of Human Odontoblasts in vitro: Gelatinase Expression by Odontoblast is Differentially Regulated by TGF  $\beta$  1. *J Dent Res* 77:1486-1496, 1998.
17. Ishikawa H, Kitoh H, Sugiura F and Ishiguro N: The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the osteogenic potential of rat mesenchymal stem cells after several passages. *Acta Orthopaedica*

- 78:285-292, 2007.
18. Arany S, Nakata A, Kameda T, Koyota S, Ueno Y and Sugiyama T: Phenotype properties of a novel spontaneously immortalized odontoblast-lineage cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 342:718-724, 2006.
  19. Alliot-Licht B, Bluteau G, Magne D, Lopez-Cazaux S, Lieubeau B, Daculsi G and Guicheux J: Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures. *Cell Tissue Res* 321:391-400, 2005.
  20. Fratzl-Zelman N, Fratzl P, Hörandner H, Grabner B, Varga F, Ellinger A and Klaushofer K: Matrix Mineralization in MC3T3-E1 Cell Cultures Initiated by  $\beta$ -Glycerophosphate Pulse. *Bone* 23:511-520, 1998.
  21. Tang AT, Li J, Ekstrand J and Liu Y: Cytotoxicity tests of in situ polymerized resins: Methodological comparisons and introduction of a tissue culture insert as a testing device. *J Biomed Mater Res* 45:214-222, 1999.
  22. Bidar M, Moradi S, Jafarzadeh H and Bidad S: Comparative SEM study of the marginal adaptation of white and grey MTA and Portland cement. *Aust Endod J* 33:2-6, 2007.
  23. De-Deus G, Petrucci V, Gurgel-Filho E and Coutinho-Filho T: MTA versus Portland cement as repair material for furcal perforations: a laboratory study using a polymicrobial leakage model. *Int Endod J* 39:293-298, 2006.
  24. Ribeiro DA, Duarte MA, Matsumoto MA, Marques ME and Salvadori DM: Biocompatibility in vitro tests of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements. *J Endod* 31:605-607, 2005.
  25. Chang SW, Yoo HM, Park DS, Oh TS, Bae KS: Ingredients and cytotoxicity of MTA and 3 kinds of Portland cement. *J Kor Acad Cons Dent* 33:369-376, 2008.
  26. Danesh G, Dammaschke T, Gerth HU, Zandbiglari T and Schäfer E: A comparative study of selected properties of ProRoot mineral trioxide aggregate and two Portland cements. *Int Endod J* 39:213-219, 2006.
  27. Park KT, Yang WK, Ko HJ, Kim MR: Tissue response of Pro-Root<sup>®</sup> MTA with rhBMP-2 in pulpotomized rat teeth *J Kor Acad Cons Dent* 32:402-410, 2007.
  28. Al-Rabeah E, Perinpanayagam H and MacFarland D: Human alveolar bone cells interact with ProRoot and tooth-colored MTA *J Endod* 32:872-875, 2006.

## 국문초록

 $\beta$ -glycerophosphate 혼합시 인간 치수 세포에 대한 Portland cement의 생활성에 관한 연구오영환<sup>1</sup> · 장영주<sup>2</sup> · 조용범<sup>1\*</sup>단국대학교 치과대학 <sup>1</sup>치과보존학교실, <sup>2</sup>치과생화학교실

$\beta$ -glycerophosphate는 치수의 상아모세포 분화를 촉진하는 물질이다. Portland cement는 수중에서 장기간에 걸쳐 용해되기 때문에  $\beta$ -glycerophosphate을 혼합한 Portland cement는 수산화칼슘과 함께  $\beta$ -glycerophosphate를 장기간 용출하게 된다. 본 실험에서는  $\beta$ -glycerophosphate을 혼합한 Portland cement에 대한 인간치수세포의 반응을 알아보았다.

인간 치수 세포에 대한  $\beta$ -glycerophosphate의 효과를 알아보기 위해 다양한 농도의  $\beta$ -glycerophosphate와 dexamethasone에 대한 인간 치수 세포의 ALP activity을 측정하였고 alizarin red S로 염색하여 관찰하였다.  $\beta$ -glycerophosphate가 다양한 농도(10 mM, 100 mM, 1 M)로 혼합된 Portland cement에 대한 인간 치수 세포의 MTS assay, ALP activity를 측정하고 SEM으로 관찰하였다.

치수세포의 석회화 정도를 관찰한 연구에서  $\beta$ -glycerophosphate와 dexamethasone 단독으로 적용하였을 때 거의 효과가 없었으나 5 mM  $\beta$ -glycerophosphate와 100 nM dexamethasone을 혼합 적용하였을 때 가장 높은 ALP activity를 보였다. 분화제를 첨가하거나 첨가하지 않은 모든 실험군에서 치수세포에 대한 독성은 관찰되지 않았으며 Portland cement에 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate을 혼합한 시편의 ALP activity가 대조군에 비교하여 가장 많이 증가하였다.

결론적으로  $\beta$ -glycerophosphate이 혼합된 Portland cement는 세포 독성이 없으며 첨가물이 없는 Portland cement에 비해 치수 분화 및 석회화를 더 많이 일으키므로 임상적으로  $\beta$ -glycerophosphate을 혼합한 Portland cement 적용은 재료 하방에 더 많은 상아질을 형성시킬 것으로 추측된다.

**주요단어** : 포틀랜드 시멘트, 치수세포, 석회화, 분화제