

자기장 저속 냉동보관법을 이용한 쥐 치아 치주인대세포의 활성화 검사

안현정 · 김의성* · 김 진 · 김덕원 · 김기열 · 이찬영 · 이승중
연세대학교 치과대학 보존학교실

ABSTRACT

EVALUATION OF THE VIABILITY OF PERIODONTAL LIGAMENT CELL IN RAT TEETH USING SLOW CRYOPRESERVATION METHOD WITH MAGNETIC FIELD

Hyun-Jung Ahn, Eui-Seong Kim*, Jin Kim, Duck-Won Kim,
Ki-Yeol Kim, Chan-Young Lee, Seung-Jong Lee
Department of Conservative Dentistry, Yonsei University, Seoul, Korea

The purpose of this study was to evaluate the viability of periodontal ligament cell in rat teeth using slow cryopreservation method with magnetic field through MTT assay and TUNEL test. For each group, 12 teeth of 4 weeks old white female Sprague-Dawley rat were used for MTT assay, and 6 teeth in TUNEL test. The Maxillary left and right, first and second molars were extracted as atraumatically as possible under tiletamine anesthesia. The experimental groups were group 1 (immediately extraction), group 2 (cold preservation at 4°C for 1 week), group 3 (rapid cryopreservation in liquid nitrogen), group 4 (slow cryopreservation with magnetic field of 1 G), and group 5 (slow cryopreservation). F medium was used as preservation medium and 10% DMSO as cryoprotectant. After preservation and thawing, the MTT assay and TUNEL test were processed. One way ANOVA and Scheffe method were performed at the 95 % level of confidence. The value of optical density obtained after MTT analysis was divided by the value of eosin staining for tissue volume standardization. In both MTT assay and TUNEL test, it had showed no significant difference among group 3, 4, and 5. And group 3 had showed higher viability of periodontal ligament cell than group 2.

From this study, slow cryopreservation method with magnetic field can be used as one of cryopreservation methods. (J Kor Acad Cons Dent 33(4):332-340, 2008)

Key words: TUNEL, Periodontal ligament cell, MTT, Magnetic field, Cryopreservation

- Received 2008.4.14., revised 2008.5.20., accepted 2008.5.21.-

* Corresponding Author: Eui-Seong Kim

Department of Conservative Dentistry
College of Dentistry, Yonsei University
134 Shinchon-Dong, Seodaemun-Ku, Seoul, 120-752, Korea
Tel: 82-2-2228-8700 Fax: 82-2-313-7575
E-mail: andyendo@yuhs.ac

I . 서 론

치아 상실부위를 대체하는 방법으로 임플란트, 치아이식, 보철치료가 있으며 이 중 치아 이식은 치주인대세포의 생활력이 유지되어 골 결손부에 이식 시 골이 자연 생성되는 장점을 가지고 있다¹⁾. 그러나 심한 인접치 우식이나 교정치료

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

의 전략상 치아이식에 제공될 치아를 미리 발거 하여 이식이 필요할 때 사용할 수 없는 경우 몇 달 이상 치아를 외부에서 보관할 수 있는 냉동 보관법이 유용한 방법이다²⁾.

세포를 장기간 보관하는 방법에는 저온 냉동법과 냉동 보존법이 있다. 저온 냉동법은 얼음이 어는 온도 전까지 온도를 낮춤으로써 세포 대사율을 감소시켜 세포를 보관하는 방법으로 심장과 같은 전체 기관의 단기간 보존에 흔히 사용된다. 전체 기관의 단기간 운송 중에는 저온 냉동법으로 보존하는 것이 낫다³⁾. 냉동 보존법은 세포를 장기간 보관할 때 많이 사용되지만 세포를 냉동 보존하는 과정이나 다시 원상으로 복귀시키는 해동 과정 중에 세포를 손상시킬 수 있다는 문제점이 있다³⁾. 그래서 세포의 냉동 보관 시 손상을 줄이기 위한 여러 시도가 있었는데 특히 동해 방지제의 사용과 다양한 냉동방법의 개발을 들 수 있다. 동해방지제는 냉동 시 전해질의 농도를 감소시키고 낮은 온도에서 삼투압에 의한 세포 수축의 양을 감소시킨다.

Dimethyl sulfoxide (DMSO)는 glycerol과 함께 침투성 동해방지제로 많이 사용된다. 이것은 세포막을 통과해서 세포 내의 DMSO-NaCl-water 용액의 상평형 상태를 변화시켜 냉동점 이하의 온도에서 세포 내 얼음의 형성으로 상대적으로 높아진 염의 농도를 낮추어 세포 손상을 방지한다⁴⁾. 또한 세포 내 얼음 형성을 막아 세포막 파괴를 방지한다⁵⁾. 그러나 동해방지제의 농도가 증가하면 독성이 생기는 문제점이 있다⁶⁾.

세포를 -196℃의 액화질소에서 바로 얼리는 급속 냉동 방법은 급속한 온도변화에 의해서 조직과 세포가 파손되는 경우가 많아 이를 줄이기 위한 프로그램 냉동 방법에 관하여 다양한 시도가 있었다. Kawasaki 등⁶⁾은 치아를 냉동 시 -7℃까지는 -1℃/min, -40℃까지는 -6.6℃/min, -80℃까지는 -0.5℃/min의 속도로 냉동되는 속도 조절 냉동기를 사용하여 냉동했을 때 정상 치아와 유사한 결과를 보였음을 보고하였다. 최근 일본에서는 온도 조절기와 미소자장을 이용하여 얼음을 균일하게 얼리는 프로그램 냉동고가 개발되었다. 미소자장을 걸어주면 핵 내, 세포 내, 세포 외와 냉동 보존액의 물분자가 각각 자장에 의해 진동하고 보통의 빙점보다 낮은 온도에서 과 냉각 상태가 유지된다는 이론에 근거한다. 또한 자기장에 의해 물분자와의 거리가 일정하게 유지되어 과 냉각된 치아와 냉동 보존액이 빙점을 통과시 동시에 열게 된다. Kawata⁷⁾는 쥐 치아를 이용하여 -30℃까지 15 mA로 자기장을 걸어 -0.5℃/min속도로 냉동 한 후 -150℃에 3일간 보관했을 때 급속냉동을 하는 것보다 좋은 결과를 보였음을 보고하였다. 이전의 연구에서는 냉동 시 사용된 자기장의 세기를 정확하게 기술하지 않았고 액화질소를 이용한 급속 냉동법과 저속 냉동법 및 냉장보관법으로 냉동 시 치주인대세포의 활성도를 비교하지 않았다. 이에 본 연구에서는 치주인대세포를 1gauss (G)의 자기장을

이용한 저속 냉동보관법, 저속 냉동법, 급속 냉동법, 냉장 보관법으로 냉 동 시 치주인대세포의 활성도를 비교하고자 하였다.

세포의 활성도를 측정하기 위한 검사로 Tetrazolium-based colorimetric assay (MTT)가 유용하게 사용된다. MTT검사는 살 아있는 세포에 있어 미토콘드리아에 있는 탈수소 효소가 노란색의 수용성의 tetrazolium salt [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide](MTT)를 물에 녹지 않는 어두운 보 라색 formazan 침전물로 전환시키는 능력에 착안하여 사용하는 방법이다. Kim 등⁸⁾은 쥐 치아를 냉동 후 재식 했을 때 MTT 검색법으로 치주인대세포의 활성도를 평가하여 조직학적 소견과 비교 시 일치함을 보고하면서 MTT 검색법은 치주인대세포의 활성도를 평가하는데 유용한 방법이라고 하였다. 본 연구에서도 MTT 검사를 이용하여 치아에 붙어 있는 치주인대세포의 활성도를 평가하고자 하였다.

또한 MTT 검색법과 병행하여 냉동 후 치주인대세포의 활성도를 평가하는 방법으로 Terminal deoxynucleotidyl transferase(TDT)-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 검사를 이용하였다. 냉동과 해동은 필연적으로 세포사멸과 관련된 유전자 전위와 DNA 분절의 증가와 같은 손상을 야기하는데⁹⁾ TUNEL 검사는 이것을 면역 화학적 기법에 의해 신호를 증폭한 후 관찰하는 방법이다.

본 연구의 목적은 흰쥐의 상악 대구치를 발거 후 1G의 자기장을 이용한 저속 냉동보관법을 이용하여 냉동한 후 치주인대세포의 활성도를 저속 냉동법, 급속 냉동법, 냉장 보관법과 비교하여 평가하는데 있다.

Ⅱ. 연구 재료 및 방법

1. 실험 대상 및 전 처치

생후 4주된 암컷 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였고 발치를 용이하게 하기 위해 0.4% β -aminopropionitrile (β -APN, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 발치 전 3일간 공급하였다. 마취는 Tiletamine (Zoletil50, Virbac, Carros, France)을 이용하여 1 cc 정도를 피하 주사하여 시행하였다. 마취가 유도된 후 조직 검사를 이용하여 치관을 잡고 혐구개측으로 최소한의 외상을 가하면서 발치를 시행하였으며 흰쥐의 상악 제1, 2 대구치를 발거하였다.

2. 실험군의 분류

실험에 사용한 보관 용액으로 F medium은 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco-BRL, NY,

USA)과 Ham's nutrient mixtures F12 (Gibco-BRL, NY, USA)를 3:1의 비로 섞고 10% fetal bovine serum (FBS)와 항생제: penicillin (100 units/ μ l), streptomycin (100 μ g/ml), fungizone (0.3 μ g/ml) (Gibco-BRL)을 첨가하여 제조하였다. 동해방지제로는 10% DMSO (Sigma Chemical Co., St.Louis, USA)를 사용하였다.

가. 실험군 분류

1군: 즉시발치군

치아를 발거하자마자 PBS (직접 제조)에 세척한 후 실험에 이용하였다.

2군: 냉장군

치아를 발거하고 F medium가 1 ml 담긴 2 ml 튜브에 담아 4℃ 냉장고에 1주일간 보관하였다.

3군: 액화질소군

치아를 발거 한 후 2.5%, 5%, 7.5% DMSO에 5분씩 담긴 후 10% DMSO와 F medium 1 ml 가 담긴 2 ml 냉동 튜브에 넣어 액화질소에 넣어 -196℃까지 급속 냉동하였다.

4군: 자기장군

치아를 발거 한 후 2.5%, 5%, 7.5% DMSO에 5분씩 담긴 후 10% DMSO와 F medium 1 ml 가 담긴 2 ml 냉동 튜브에 넣어 21.7 mA, 60 Hz, 1 gauss의 자기장이 발생되는 코일 중심부 안쪽에 위치시킨 후 냉동고 (SD-108, Korea Y.O.T.,Ltd, Incheon, Korea)에 넣고 -20℃까지 -0.3℃/min의 속도로 서서히 냉동한 후 -196℃까지 액화질소에 넣어 급속 냉동하였다.

5군: 저속 냉동군

치아를 발거 한 후 2.5%, 5%, 7.5% DMSO에 5분씩 담긴 후 10% DMSO와 F medium 1ml 가 담긴 2 ml 냉동 튜브에 넣어 냉동고에 넣고 -20℃까지 0.3℃/min의 속도로 서서히 냉동한 후 -196℃까지 액화질소에 넣어 급속 냉동하였다

나. 냉동군의 해빙방법

급속 냉동한 치아 (3, 4, 5군)를 액체질소 냉동고에서 꺼내 37℃ 수욕조에 넣어 해빙하였다. 해빙 후 치아를 꺼내어 치아를 7.5%, 5%, 2.5%, 0% DMSO가 함유된 각각의 F medium용액에 5분간씩 담겨 DMSO를 제거한 후 실험에 사용하였다.

3. (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT) 검사

각 군 당 12개의 치아를 발거하여 60개의 치아를 MTT 검색법에 사용하였다. 실험군의 처리가 끝난 뒤에 96-well plate에 MTT 용액 (0.05 mg/ml, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 200 μ l를 넣고 각 군별 치아를 MTT 용액이 있는 well에 담았다. 치아가 담긴 96-well plate를 알루미늄 호일에 싼 후 3시간 동안 37℃ 회전 진탕기에서 배양하였다. 3시간 후 96-well plate를 꺼내어 MTT용액에 담겨진 치아를 꺼내어 DMSO 150 μ l를 넣은 well에 치아를 옮기고 15분간 회전 진탕하여 형성된 MTT formazan 결정을 녹여내었다. 15분 후 치아를 제거하고 Dynatech MRX ELISA microplate reader (Dynatech laboratories, Chantilly, VA, USA)에 넣고 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

4. 치아 치근면에 붙어있는 치주조직의 양 측정

실험에 사용된 치아의 치근면에 붙어있는 치주조직의 양을 정량적으로 측정하기 위해 MTT 검색 실험 후 각 군의 well에서 제거된 치아를 각 군별로 96-well plate에 치아를 넣고 eosin (Accustain, Sigma-Aldrich chemie, GmbH, Germany) 350 μ l를 첨가하여 12시간 정도 담겨서 염색을 한 후 치아를 제거하고 1% acid alcohol (70% ethyl alcohol, 1% HCl) 350 μ l이 든 96 well plate에 넣은 뒤 30분간 담가두어 치근면에 염색된 치주조직을 탈색시켰다. 치아를 각각의 96-well plate에서 꺼낸 다음 탈색된 well내의 용액을 microplate reader에 넣고 530 nm파장에서 흡광도를 측정하였다.

5. Terminal deoxynucleotidyl transferase(TDT)-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 검사

각 실험군에 의해 준비된 치아를 4% paraformaldehyde 가 든 2 ml 튜브에 담근 후 조직을 고정하여 보관하였다가 탈석회화한 후 파라핀에 포매하였다. 4 μ m 두께로 조직을 절편한 후 silane coating slide (Muto pure chemicals., Ltd, Tokyo, Japan)에 고정하였다. 각 조직슬라이드를 Tris-HCl용액 (pH 8.0)에서 10분 동안 전처리 하고 20분간 proteinase K (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)로 처리하여 조직을 digestion하였다. PBS 용액으로 수세 한 뒤 3% hydrogen peroxide로 조직에 있는 peroxidase를 불활성 시킨 후 PBS로 다시 수세하였다. 면역조직 화학적 관찰을 위한 양성대조군에 대해 DNA buffer로 10

분간 전 처리하고 DNase I (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland)으로 20분간 반응시켜 인위적으로 DNA를 단편화시켰다. 그 다음 Transferase-mediated deoxyuridin triphosphated (TdT, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) buffer에서 15분간 전 처리한 후 Terminal deoxytransferase와 Biotin-16-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate (dUTP, F.Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland)로 37℃에서 2시간 30분 동안 반응시켜 dUTP를 표지하였다. 음성대조군에서는 TdT 효소를 처리하지 않았다. TB buffer에서 10분간 담가서 반응을 중지시킨 후에 2% Bovine serum albumin (BSA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)로 15분간 blocking 하였고, PBS로 수세 후 streptavidin-peroxidase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)로 30분간 반응시켜 3, 3'-diaminobenzidine (DAB, Vector laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA)로 발색시켰다. 대조염색은 nuclear fast red를 이용하였으며 다시 70%, 90%, 100% 에틸알코올로 탈수하여 봉입하였다. TUNEL 검사에 양성인 치주인대세포의 각 조직 슬라이드에서 400배 크기의 현미경 (Vanox-S; Olympus, Tokyo, Japan) 시야에서 임의로 세 부분을 지정하여 양성 세포수와 전체 세포수를 계산하여 백분율을 구하였다.

6. 통계처리

MTT처리와 eosin 염색에서 얻은 흡광도는 대조군과 각 실험군의 차이를 SPSS 12.0을 이용한 ANOVA를 사용하여 분석하였으며 사후검정으로는 Scheffe의 방법을 썼다. TUNEL test를 시행한 결과는 SPSS 12.0 (SPSS, Chicago, IL, USA)을 이용한 one way ANOVA를 사용하여 분석하였으며 사후검정으로는 Scheffe와 Tukey HSD 방법을 사용하였다.

Ⅲ. 결 과

1. MTT값을 Eosin 염색값으로 나눈 비율

치근면 단위 면적당 치주인대세포의 활성도를 나타내는 MTT/Eosin 비율은 모든 군에서 즉시 발치군보다 통계적으로 유의하게 낮은 세포 활성을 보였으며 ($p < 0.05$) (Figure 1) 자기장군과 액화질소군, 저속냉동군 간에는 통계학적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다 (Figure 1). 그러나 냉장군은 모든 군들과 통계학적으로 유의한 차이를 보이며 ($p < 0.05$) 가장 낮은 치주인대세포의 활성을 보였다.

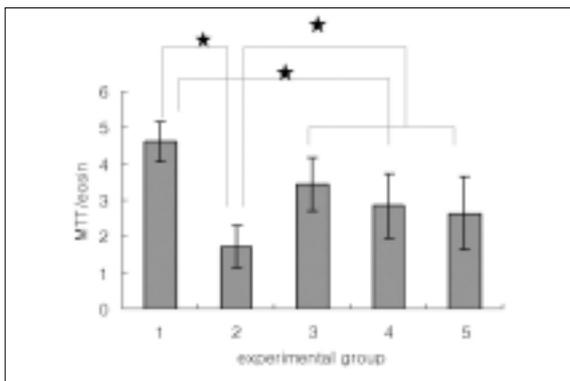


Figure 1. MTT/Eosin ratio.

- 1: immediately extraction
- 2: cold preservation at 4℃
- 3: rapid cryopreservation in liquid nitrogen
- 4: slow cryopreservation with magnetic field of 1G
- 5: slow cryopreservation
- ★: $p < 0.05$.

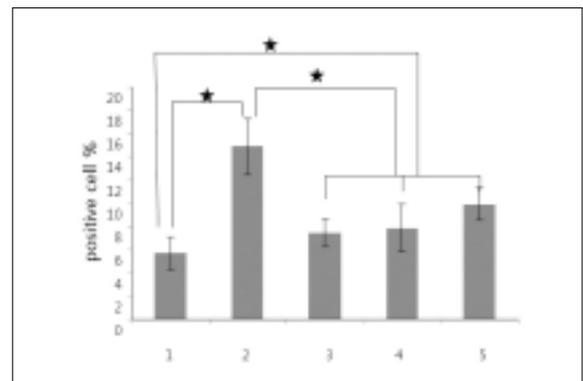


Figure 2. Average and standard deviation of percentage of positive cells by TUNEL test.

- 1: immediately extraction
- 2: cold preservation at 4℃
- 3: rapid cryopreservation in liquid nitrogen
- 4: slow cryopreservation with magnetic field of 1G
- 5: slow cryopreservation
- ★: $p < 0.05$.

2. TUNEL test

각 실험군 당 6개의 치아를 이용하여 정상 세포수에 대한 양성 세포수의 비율을 구해 각 군별로 평균 및 표준편차를 구해 one way ANOVA를 시행한 결과 자기장군은 즉시 발치군보다 통계학적으로 유의하게 많은 세포 사멸을 보였다

($p < 0.05$). 또한 자기장군은 세포사멸에 있어서 액화질소군, 저속냉동군과 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 그러나 냉장군은 다른 모든 군들과 통계적으로 유의한 차이가 있었고 세포 사멸의 정도가 가장 심했다($p < 0.05$) (Figure 2).

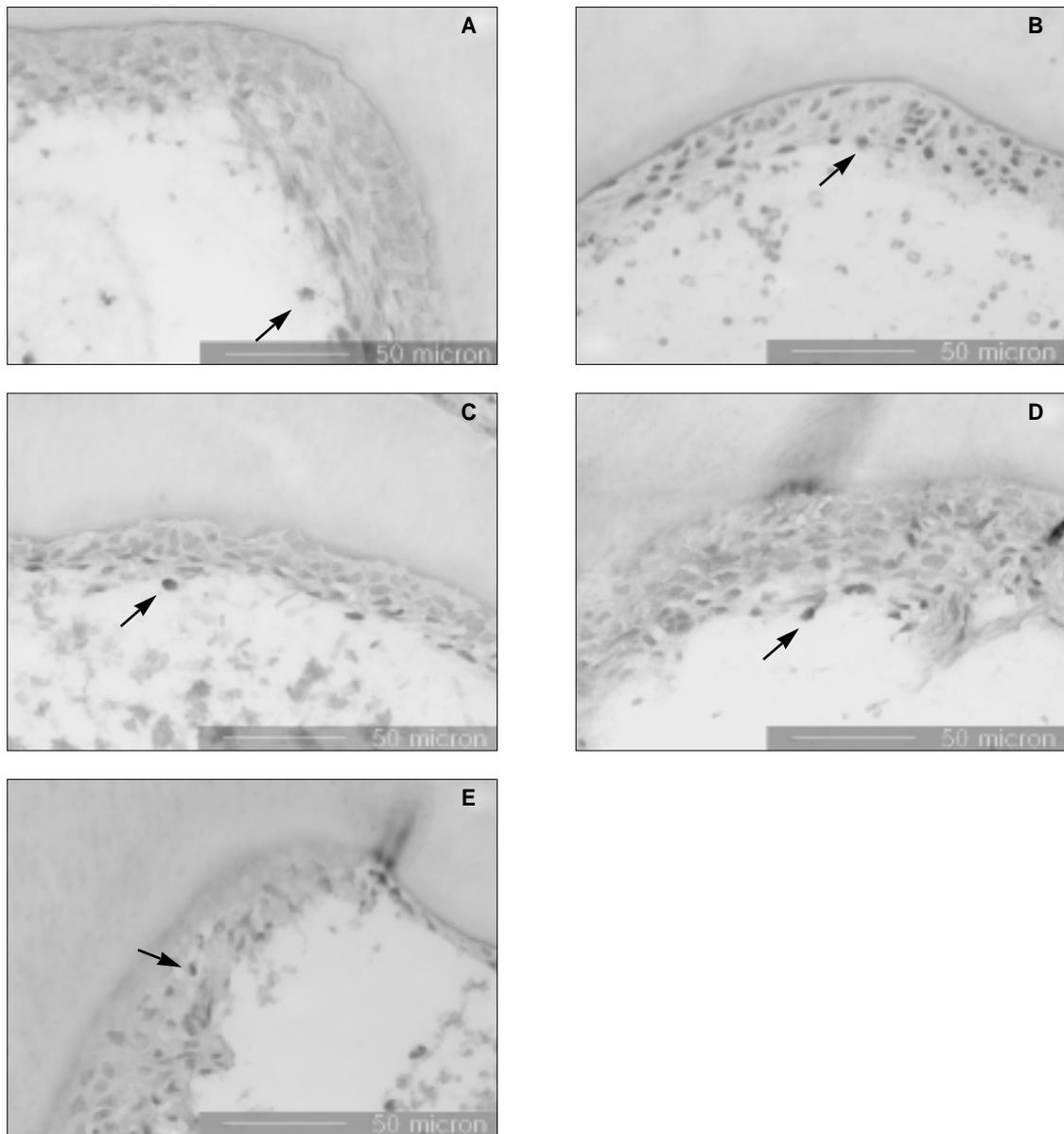


Figure 3. Micrograph of experimental groups by TUNEL test. Arrow shows positive cell.

A. immediately extraction ($\times 400$).

B. cold preservation ($\times 400$).

C. rapid cryopreservation ($\times 400$).

D. slow cryopreservation with magnetic field ($\times 400$).

E. slow cryopreservation ($\times 400$).

각 실험군별로 400배 크기의 현미경 시야에서 양성세포를 관찰했을 때 즉시 발치군은 양성세포가 거의 관찰되지 않았으며 대조 적으로 냉장군에서는 진하게 염색되는 양성세포가 가장 밀집되어 있음을 관찰할 수 있었다 (Figure 3). 자기장군과 저속냉동군, 액화질소군에서는 양성세포가 국소적으로 분포함을 관찰할 수 있었다 (Figure 3).

IV. 총괄 및 고안

치아를 장기간 보관하는 방법으로 냉동 보존법이 사용될 수 있다. 이 경우 치주인대세포는 냉동 과정 중에 손상을 받게 된다. 냉동 시 치주인대세포의 생존율을 가장 높일 수 있는 조건으로 농도 단계별로 적용한 10% DMSO를 동해 방지제로 사용하고 -4°C 에서 -35°C 사이의 온도에서는 $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 저속 냉동을 하며 그 이하의 온도에서는 액화질소에 넣어 급속 냉동을 한 뒤 해동 시에는 급속 해동을 하는 것이라고 Schwartz 등이 보고한 바 있다⁹⁾. -35°C 이상의 온도에서는 세포 내부에 얼음이 형성되지 않고 세포 외부의 냉동상태에 따라 수축하게 되어 저속 냉동으로 냉동하면 세포가 손상을 적게 받는다¹⁰⁾. 본 실험에서는 자기장군과 저속 냉동군을 냉동시킬 때 사용한 냉동고가 최저 -20°C 까지 내려가는 기능을 가지고 있어 -20°C 까지는 $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 저속 냉동을 하였으며 -20°C 이하의 온도에서는 -196°C 로 급속 냉동 하였다. 비록 동해 방지제로 10% DMSO를 사용하였지만 냉동 전 온도가 -20°C 였고, -20°C 와 -35°C 사이의 온도에서 급속 냉동되었기 때문에 세포 내 얼음의 급격한 증가로 손상을 받았을 것으로 생각되며 이로 인해 본 실험에서 저속 냉동군의 세포 활성이 급속 냉동을 한 액화질소군과 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았을 것으로 사료된다.

최근 일본에서는 치아를 냉동시 치주인대세포의 손상을 줄이기 위해 자기장을 이용한 프로그램 냉동고를 사용하여 좋은 결과를 보였다고 보고하였다⁷⁾. 자기장의 작용 원리는 세포의 주된 구성 성분이 물 분자로 되어 있고 수소원자는 약한 (+)전하를 띄며 산소원자는 상대적으로 (-)전하를 띄고 있는 극성 분자이기 때문에 전자기장을 걸어주면 물 분자는 전자기장과 나란해 지려고 회전하게 되어 물 분자의 운동에너지가 물 분자들이 결합하려고 하는 반데르발스 결합 에너지보다 크게 되어 온도가 내려가도 얼지 않고 과냉각되어 있다가 더 낮은 온도에서 균일하게 얼게 된다¹¹⁾. 냉동기술에 있어서 자기장을 이용하는 것은 심장과 같은 장기의 냉동 후 해동 시 전체 장기의 온도가 동시에 같이 상승할 수 있도록 300 MHz 이상의 자기장을 걸어 조직을 균일하게 가열하는데 이용되었다. 장기를 열전도 방식에 따라 가열하면 조직 가장자리의 온도는 올라가지만 중심부는 냉동된 상태라 기계적인 스트레스와 파절이 발생하게 된다. 낮

은 주파수의 자기장을 걸면 침투 깊이가 깊고 균일한 열이 들어가게 된다. 주파수가 300 MHz 이상이 되면 물 분자를 진동시켜 에너지를 침착시키며 결과적으로 온도가 상승하게 된다^{12,13)}. 본 연구에서는 물 분자를 진동시키되 열 발생을 최소화해야 하기 때문에 열 발생 효과가 없는 극저주파인 60 Hz의 주파수를 사용하여 자기장을 발생시켰다¹²⁾.

Kaku 등¹⁴⁾은 이러한 자기장을 이용하여 냉동고를 생산하는 회사인 ABI Corporation Ltd와 공동 작업으로 'Cell Alive System' (CAS)을 개발하였으며 75 mA의 자기장을 이용한 프로그램 냉동고를 사용하여 냉동 시 세포 활성이 가장 높았다고 보고하였다. CAS에 의한 냉동은 세포를 자기장 환경 안에 넣어 미약한 에너지를 가해 물 분자를 진동시켜 결정화를 억제해 과냉각 상태를 유지하며 세포 전체를 동시에 냉동하게 되는 방법을 사용한다고 설명한다. 치아를 냉동시킬 때 Kawata⁷⁾의 실험에서는 15 mA세기의 자기장을 이용했고 Kaku 등¹⁴⁾의 연구에서는 75 mA세기의 자기장을 걸었다고만 기술했다. 그러나 일반적으로 자기장의 세기는 전류의 크기에 비례하나 거리에 반비례하여 급격히 감소하기 때문에¹¹⁾ 이런 기술로는 정확히 몇 가우스의 자기장이 작용했는지 알 수 없다. 같은 전류라도 코일이 감긴 수나 자기장이 작용하는 곳까지의 거리에 따라 자기장의 세기가 달라지기 때문이다. 본 연구에서는 21 mA, 60 Hz의 자기장을 발생시켜 세포에 가한 자기장의 세기는 1 ± 0.05 G이다. 1G는 80 A/m이며 1 m당 80A의 전류가 걸린다는 의미이며 이 세기의 자기장은 일상생활에서 본다면 지구자계는 0.3 - 0.5G, 헤어 드라이기를 15 cm의 거리에서 사용하면 0.7G의 자기장이 발생한다는 것에 비교할 수 있다¹⁵⁾. 본 연구에서 자기장을 이용한 저속 냉동법으로 치아를 냉동 시 치주인대세포의 활성도가 액화질소를 이용한 급속 냉동법 및 저속 냉동법과 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 이는 향후 자기장의 세기의 조절을 통해 냉동 시 치주인대세포의 활성도를 높일 수 있는 연구가 필요하리라 사료된다.

치아를 냉동한 후 치주인대세포의 활성을 검사하는 방법들 중 본 연구에서 사용한 MTT검색법은 냉동 후 세포 활성도를 측정하는 검사로 유용하게 사용되어 왔다^{8,16,17)}. MTT 검색법은 간편하며 대부분의 세포에 적용이 가능하고 큰 규모의 실험에도 사용할 수 있다는 장점이 있다. 또한 실험의 재현성이 높아 신뢰성이 높은 검사방법이다. In vitro상의 치주인대세포의 활성도를 검사하는 방법들은 수집된 치주인대세포가 치주인대세포의 실제 상태를 반영하지 못하고 있으며 수집된 세포의 성질이 배양 기간이나 배양 전 단계에서 변할 수 있다는 단점을 가지고 있다¹⁸⁾. 그러나 본 실험에서는 96 well plate에 잠길 정도로 작은 쥐 치아를 이용한 in vivo MTT 검색법을 이용하여 쥐 치아 치주인대세포의 활성도를 측정할 수 있었다⁸⁾.

치아가 냉동과 해동과정을 거치게 되면 치주인대세포는 세포사멸과 관련된 유전자 전위와 DNA 분절의 증가와 같은 손상을 받게 된다¹⁰⁾. 이러한 세포 사멸도를 표시하는 방법으로 TUNEL 검사가 있다. 세포사멸 (apoptosis)은 1972년 Kerr 등에 의해 처음으로 도입된 개념으로 괴사 (necrosis)와는 감별되는 세포사망의 한 형태로 괴사가 DNA 파괴 전에 세포막의 소실이 일어나는 것이 특징인 반면, 세포사멸은 DNA 파괴 후 세포막이 소실되며 그 병리소견으로는 세포핵의 분열, 염색체의 응결 및 세포질의 응축, 세포 사멸체 (apoptosis body)의 형성 등의 특징적인 양상을 동반한다¹⁹⁾. 또한 건강한 조직이 방사선 조사, 항암제 및 세포 독성물 등 DNA 파괴성 요인에 노출되는 경우 세포사멸이 발생하는 것으로 보고되어 있다²⁰⁾. 그러나 TUNEL 방법의 문제는 조직에 따라 양성, 음성의 구분이 명확하지 않게 되는 경우가 있다는 것과 DNA 가 분해되는 상황 즉 세포손상 후 DNA가 수리되거나 세포 괴사가 되는 경우에도 모두 양성으로 나올 가능성이 있다는 단점에도 세포사멸을 표시하는 최적의 방법으로 이용되고 있다²¹⁾.

사람 치아를 냉동한 후 치주인대세포의 DNA 손상을 MTT분석과 TUNEL검사로 측정할 시도도 있었다. Oh 등¹⁷⁾은 치아를 발거 후 치근의 치주인대세포를 긁어 관찰한 군과 액화질소에 넣어 1주일 보관 후 해동한 군에서 TUNEL검사 및 MTT분석을 시행한 결과 두 군에서 유의할 만한 차이를 보이지 않음으로 급속 냉동방법이 유용함을 보였다. 본 연구에서도 치아를 냉동 후 치근에 붙어 있는 치주인대세포의 활성을 검사했을 때 TUNEL 검사와 MTT검색 결과 모두 자기장군, 액화질소군, 저속 냉동군이 유사한 세포 활성도를 보였고 냉장군에서 세포활성도가 가장 낮은 결과를 얻었다.

본 연구에서 시행한 자기장 저속 냉동보관법은 쥐 치아 치주인대세포의 활성에 있어서 저속 냉동법과 액화질소를 이용한 급속 냉동법과 유사한 결과를 보였다. 그러나 치아를 급속 냉동 시에는 치아의 파절과 같은 경조직 손상이 가해지므로 자기장을 이용한 저속 냉동보관법은 급속 냉동법보다 치아를 냉동 보관하는데 적합한 방법이라고 사료된다.

V. 결 론

본 연구는 흰쥐 상악 대구치를 발거 후 자기장 하 저속 냉동법을 이용하여 치아 냉동 시 치주인대세포의 활성도를 MTT 검색법과 TUNEL 검사를 이용하여 측정하고자 하였고 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 각 실험군 당 12개 치아에 대하여 MTT검사를 시행하여 나온 흡광도를 치근면의 eosin염색을 통해 얻은 흡광도로 나눈 값에서 자기장군은 즉 시 발치군보다 세포 활성이 떨어졌으나 액화질소군, 저속 냉동군과 유사한

세포활성을 보였고 냉장군보다 높은 세포 활성도를 보였다 ($p < 0.05$).

2. 각 실험군 당 6개의 치아에 대하여 TUNEL 검사를 시행하여 단위면적 당 양성 세포수를 세어 백분율을 구해 통계분석을 시행한 결과 자기장군은 즉 시 발치군보다 세포사멸도가 높았으며 저속 냉동군과 액화질소군과는 유사한 세포 사멸도를 보였고 냉장군보다 세포사멸도가 낮음을 보였다 ($p < 0.05$).

이상의 결과로 자기장 저속 냉동보관법은 쥐 치아의 세포 활성에 있어서 저속 냉동법과 액화질소를 이용한 급속 냉동법과 유사한 결과를 보이니 치아를 급속 냉동 시에는 치아의 파절과 같은 경조직 손상이 가해지므로 자기장을 이용한 저속 냉동보관법은 급속 냉동법보다 치아를 냉동 보관하는데 있어 적합한 방법이라고 사료된다.

참고문헌

1. Kristerson L, Johansson LA, Kisch J, Stadler LE. Autotransplantation of third molars as treatment in advanced periodontal disease. *J Clin Periodontol* 18:521-528, 1991.
2. Schwartz O. Cryopreservation as long-term storage of teeth for transplantation or replantation. *Int J Oral Maxillofac Surg* 15:30-32, 1986.
3. Rubinsky B. Principles of low temperature cell preservation. *Heart Fail Rev* 8:277-284, 2003.
4. Lovelock JE, Polge C. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. *Biochem J* 58: 618-622, 1954.
5. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247: C125-142, 1984.
6. Kawasaki N, Hamamoto Y, Nakajima T, Irie K, Ozawa H. Periodontal regeneration of transplanted rat molars after cryopreservation. *Arch Oral Biol* 49:59-69, 2004.
7. Kawata T. Tooth transplantation by teeth bank-approach to human- Hiroshima. Thesis. Department of Orthodontics, Hiroshima University School of Dentistry. 2005.
8. Kim ES, Jeon IS, Kim JW, Kim J, Jung HS, Lee SJ. An MTT-based method for quantification of periodontal ligament cell viability. *Oral Dis* 13:495-499, 2007.
9. Schwartz O, Andreasen JO, Greve T. Cryopreservation before replantation of mature teeth in monkeys(II). Effect of preincubation, different freezing and equilibration rates and endodontic treatment upon periodontal healing. *Int J Oral Surg* 14:350-361, 1985.
10. Ashwood-Smith MJ. Low temperature preservation of cells, tissues and organs. *Pitman Medical* 19-45, 1980.
11. Stuart M. Wentworth. Fundamentals of electromagnetics with engineering application. 2nd ed, Science & Technology, Chicago, p156-160, 2004.
12. Marsland TP, Evans S, Pegg DE. Dielectric measurements for the design of an electromagnetic rewarming system. *Cryobiology* 24:311-323, 1987.
13. Monica W, Martin R, David P. Vitrification of large tissues with dielectric warming: biological problems and some approaches to their solution. *Cryobiology* 48:179-189, 2004.

14. Kaku M, Kamata H, Kawata T. Cryopreservation of PDL cells by use of program freezer with magnetic field for tooth banking. *Dent Jpn* 43:82-86, 2007.
15. RAPID Report. <http://www.niehs.nih.gov/emfrapid/home.htm>.
16. Jeon IS. Evaluation of periodontal ligament cell viability in rat teeth according to various extra-oral dry time using MTT assay and a histologic verification. PhD Thesis. Yonsei University, Graduate School. 2004.
17. Oh YH, Che ZM, Hong JC, Lee EJ, Lee SJ, Kim J. Cryopreservation of human teeth for future organization of a tooth bank—a preliminary study. *Cryobiology* 51:322-329, 2005.
18. Ashkenazi M, Sarnat H, Keila S. In vitro viability, mitogenicity and clonogenic capacity of periodontal ligament cells after storage in six different media. *Endod Dent Traumatol* 15:149-156, 1999.
19. Fischer S, Maclean AA, Liu M, Cardella JA, Slutsky AS, Suga M, Moreira JF, Keshavjee S. Dynamic changes in apoptotic and necrotic cell death correlate with severity of ischemia-reperfusion injury in lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 62:1932-1939, 2000.
20. Kerr JF. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 27:181-182, 471-474, 2002.
21. Park SY, Kim EY, Cui XS, Tae JC, Lee WD, Kim NH, Park SP, Lim JH. Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. *Zygote* 14:125-131, 2006.

국문초록

자기장 저속 냉동보관법을 이용한 쥐 치아 치주인대세포의 활성화 검사

안현정 · 김의성* · 김 진 · 김덕원 · 김기열 · 이찬영 · 이승중

연세대학교 치과대학 보존학교실

본 연구의 목적은 흰쥐 상악 대구치를 발거하여 자기장 저속 냉동보관법을 이용하여 냉동 시 치주인대세포의 활성화 및 세포 사멸도를 MTT 검색법과 TUNEL 검사를 이용하여 측정하고자 하였다.

4주령의 암컷 Sprague-Dawley계 흰 쥐의 상악 좌우 제1,2대 구치를 발거하여 각 군 당 12개의 쥐 치아를 MTT검색에 이용하였고 6개의 치아를 TUNEL 검사에 이용하였다. 실험군은 5개군으로 대조군은 즉시 발치군이며 4℃냉장고에서 1주일간 보관한 냉장군, 발치 후 동해방지제 처리과정을 거쳐 -196℃의 액화질소에 넣어 급속 냉동한 액화질소군, 21.7 mA, 60 Hz, 1 G의 자기장을 이용하여 -0.3℃/min의 속도로 -20℃까지 냉동 후 -196℃로 급속 냉동한 자기장군, -0.3℃/min의 속도로 -20℃까지 냉동 후 -196℃에 급속 냉동한 저속 냉동군으로 나누었다. 보존액은 F medium을 사용했으며 동해방지제로 10% dimethyl sulfoxide (DMSO)를 사용하였다. 치근면을 단위면적으로 표준화하기 위해 MTT 측정값을 Eosin 염색 후 530 nm에서 측정한 흡광도 값으로 나누었다. TUNEL 검사 시 각 조직슬라이드에서 400배 크기의 현미경 시야에서 임의로 세 부분을 지정하여 정상 세포수와 양성 세포수를 세어 그 비율을 계산하여 각 실험군 당 평균치를 구하였다. 통계 분석을 위해 one way ANOVA를 시행하였으며 사후검정으로 Scheffe와 Tukey HSD방법을 썼으며 결과는 다음과 같다.

MTT검색에 의한 흡광도를 Eosin염색 후 측정한 흡광도로 나눈 값에서는 자기장군은 즉시 발치군보다 낮은 세포활성을 보였고 ($p < 0.05$) 액화질소군, 저속 냉동군과는 통계적으로 유의성 있는 차이를 보이지 않았다. 그러나 자기장군은 액화질소군, 저속 냉동군과 함께 냉장군보다는 높은 세포 활성도를 보였다 ($p < 0.05$). TUNEL 검사 결과도 자기장군은 즉시 발치군보다 치주인대의 세포사멸도가 높았으나 ($p < 0.05$) 저속 냉동군과 액화 질소군과는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 자기장군은 냉장군보다 세포사멸도가 낮았으며 냉장군은 모든 군 중에서 세포 사멸도가 가장 높았다 ($p < 0.05$).

주요어: TUNEL, MTT, 냉동보존, 저속 냉동, 자기장, 치주인대세포