

MTT 검색을 이용한 흰쥐 치아
치주인대세포 활성도의 구강 외
노출시간에 따른 평가

연세대학교 대학원
치 의 학 과
전 인 수

MTT 검색을 이용한 흰쥐 치아
치주인대세포 활성도의 구강 외
노출시간에 따른 평가

지도교수 이 승 종

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2004 년 7 월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

전 인 수

감사의 글

지금 현재의 자리에 있을 수 있도록 끊임없는 사랑과 보살핌으로 39 년간 한결같이 부족한 자식을 격려 해주신 사랑하는 부모님께 먼저 감사를 드리고 싶습니다. 또한 이 논문이 완성될 수 있도록 정신적, 물질적으로 도와주신 저를 아는 모든 분들에게 진심으로 고맙다는 말을 전하고 싶습니다.

배울 것이 많은 부족한 제자에게 좋은 논문이 완성될 수 있도록 끊임없는 지도편달과 인내를 보여주신 이승중 교수님께 이 자리를 빌어 다시 한번 깊은 감사를 드립니다. 또한 훌륭한 논문이 되도록 따뜻한 관심과 조언을 아끼지 않은 이찬영 교수님, 노병덕 교수님, 박성호 교수님, 금기연 교수님, 정일영 교수님께도 감사를 드립니다. 바쁘신 와중에도 부족한 내용을 채워주시고 충고를 아끼지 않은 논문심사를 해주신 김의성 교수님, 김진 교수님, 정한성 교수님, 황호길 교수님께도 깊은 감사를 드리며 실험을 도와준 신유석, 박상일, 조성원 선생, 구강병리학 교실원, 구강조직학 교실원, 보존학 교실원, 모든 분들에게 고마움을 다시 한번 전하고 싶습니다.

끝으로 정신적 지주인 사랑하는 아내 김수진, 축구 좋아하는 아들 병규, 분홍색만 좋아하는 딸 효리와 함께 이 기쁨을 나누고 싶습니다.

2004 년 7 월

저자 씀

차 례

그림 및 표 차례	vi
국문요약.....	vii
I. 서 론.....	1
II. 재료 및 방법.....	7
1. 실험동물의 전 처치	7
2. 실험군 분류.....	7
3. MTT 검색	8
4. 냉동 절단법을 이용한 조직학적 관찰.....	8
5. 치아 치근면에 붙어있는 치주조직의 양 측정 및 현미경 관찰	9
6. 실험자료 분석.....	10
III. 결과	11
1. MTT 검색에 의한 흡광도 측정	11
2. 치근면 치주조직의 정량적 측정을 위한 Hematoxylin-Eosin 염색의 흡광도측정	11
3. MTT Crystal 의 조직학적 관찰	16
가. 즉시 처치군의 치근단에서 치경부로의 MTT 염색의 변화 양상 ·	16
나. 60 분 건조군의 치근단에서 치경부로의 MTT 염색의 변화 양상 ·	17
다. 시간경과 (0, 10, 20, 40, 60 분)에 따라 환원된 MTT crystal 결정체 수 및 모양 비교.....	17
4. Hematoxylin-Eosin 으로 염색된 치근면 치주조직의 현미경 관찰	18
IV. 고 찰.....	19
V. 결 론.....	33
참고문헌.....	35
사진부도 설명	46
사진부도.....	47
영문요약.....	53

그림 차례

Fig. 1,2. Optical density of MTT and H-E staining following different extra-oral time (min) in Mx. 1st molar, 2nd molar	15
Fig. 3. Statistical significance from Optical density of MTT and H-E staining following different extra-oral time (min) in Mx. 1st plus 2nd molar	16
Fig. 4,5. Serial section view from apex to cervical portion in the immediate, 60 minute time - lapse group.....	47
Fig. 6,7,8,9,10. Representative view after MTT staining in the immediate, 10 minute, 20 minute, 40 minute, 60 minute time - lapse group	49
Fig. 11. Representative view of the frozen section after MTT staining	51
Fig. 12. Cementocytes & cementoblasts in the frozen section surface.....	52

표 차례

Table 1. Mean and standard deviation of optical density(OD) between MTT and H-E staining in Mx. 1st plus 2nd molar.....	12
Table 2. Mean and standard deviation of optical density(OD) between MTT and H-E staining in Mx. 1st molar	13
Table 3. Mean and standard deviation of optical density(OD) between MTT and H-E staining in Mx. 2nd molar	14

MTT 검색을 이용한 흰쥐 치아 치주인대세포 활성도의 구강 외 노출시간에 따른 평가

본 연구의 목적은 MTT 검색법을 이용하여 흰쥐 상악 대구치를 발거한 후 실온의 건조 상태에서의 시간 변화에 따른 쥐 치아 치근면의 치주인대 세포 활성도를 측정함과 동시에 냉동 절단법을 이용한 조직학적인 관찰 결과를 토대로 하여 MTT 검색법이 유용한지를 검증하고자 하였다.

생후 4 주된 암컷 Sprague-Dawley 계 흰쥐 80 마리를 이용하여 β -APN 전처치 후 상악 제 1 & 2 대구치를 모두 발거하였다. 이들 치아를 즉시 혹은 10, 20, 40, 60 분 동안 실온에서 건조 시킨 후 치아 자체를 MTT 용액에 저장한 다음 흡광도 측정을 이용한 정량적 분석과 동시에 냉동 절단법을 이용하여 조직을 관찰하였다.

MTT 검색에 의한 흡광도 값에 있어 즉시 처치군과 10 분 건조군 사이에는 통계학적인 유의차가 없었다($p>0.05$). 그러나, 즉시 처치군 및 10 분 건조군은 20 분과 40 분 및 60 분 건조군과 비교시 통계학적인 유의차를 보였다($p<0.05$). 또한, 20 분 건조군도 40 분 및 60 분 건조군과의 군 간 비교에서 각각 통계학적인 유의차를 보였다($p<0.05$). 그러나, 40 분 건조군과 60 분 건조군 사이에는 통계학적인 유의차를 보이지 않았다.

조직학적 관찰에서 시간 경과에 따라 crystal 의 모양과 분포 및 수에서 확연히 구별되는 특징적인 양상을 보여주었다. 즉시 및 10 분 건조 군에서는 가시모양의 crystal 이 전 치주인대부위 조직과 치수 내에 밀도 높게 골고루 폭넓게 퍼져 있었으나 20 분 이상 건조 군에서부터는 치주인대와 치수 부위 조직 모두에서 crystal 결정체 수가 급격히 감소하는 양상을 보였다. 또한 crystal 결정체 모양도 시간이 경과될수록 극히 한정된 몇 군데 부위에 cluster 처럼 뭉쳐져 있는 양상을 보였다.

이번 실험의 결과를 종합적으로 분석해보면 MTT 흡광도 측정값과 냉동 절단법을 이용한 시편의 MTT 염색 관찰 소견 결과를 서로 비교했을때 상당히 밀접한 상관 관계가 있음을 보였다. 또한 임상에서 치아 이식이나 재식술의 높은 성공을 위해서는 치주인대의 활성도를 가능한 최대로 보존 해야 하며 그 한계시간은 구강 외 자연 건조시 20 분 이내임을 이번 실험을 통해 알 수 있었다. 또한 이번 실험의 중요한 의미는 치주인대 세포의 활성도 평가에 있어서 MTT 검색법이 배양된 세포가 아닌 치근면에 붙어있는 세포를 직접 평가할 수 있는 새로운 대안의 평가법이 될 수 있는 가능성을 입증해 주었으며 앞으로 이 방법을 응용하여 발거된 치아를 장기간 보관하기 위한 저장액 개발에 관한 지속적인 연구와 개발에 도움을 주리라 생각된다.

핵심되는 말: 치주인대세포, 활성도, MTT 검색법, 냉동 절단법, 흡광도

MTT 검색을 이용한 흰쥐 치아 치주인대세포

활성도의 구강 외 노출시간에 따른 평가

<지도교수 이 승 중>

연세대학교 대학원 치의학과

전 인 수

I. 서 론

치아 재식술은 외상을 받아 치아가 완전 탈구된 경우나 해부학적인 복잡성으로 통법의 치근단 수술이 불가능한 경우에 이용되며, 치아 이식술은 공여치아가 존재하는 경우에 이를 치아 결손부위에 이식함으로써 결손부위를 회복(Lee 등, 2001)하는데 시행되는 치료법이다. 이러한 술식 들이 성공하기 위해서는 치아 발거나 탈구 시 치주조직의 손상 정도와 발거된 치아의 치근면 상에 존재하는 치주인대 세포의 건전성 및 활성도가 치료의 성패를 좌우하는 중요한 요인으로 작용하게 된다(Andreassen 과 Kristerson , 1981). 따라서, 공여 혹은 재식 치아 치근면 치주인대세포의 건전성과 활성도를 높이기 위해서는 발거된 치아의 재식 혹은 이식이 이루어지기까지의 구강 외 노출시간을 최소화 시키는 것이 매우 중요하다 (Hupp 등, 1998). Lee 등(2001)은 22 개의 치아이식에 관한 임상 증례

보고에서 공여치아의 구강 외 노출시간을 최소화 시키기 위해 computer-aided rapid prototyping 으로 제작된 복제된 레진 치아 모델 등을 이용해서 구강 외 시간을 7 분 정도로 단축시켰음을 보고하였다 (Lee 등,2001). 마찬가지로, 외상성 손상으로 인해 치아가 완전 탈구된 경우, 가능한 빠른 시간에 치아 재식술이 이루어지도록 노력해야 한다(Soder 등 1977, Andreasen 과 Hjorting-Hansen 1966a, Andreasen 과 Hjorting-Hansen, 1966b). 그러나 실제 임상에서 이러한 술식이 즉시 이루어지기가 사실상 불가능한 경우가 대부분이다. 특히 외상으로 완전 탈구된 치아의 경우에 재식 되기 전까지의 경과시간과 보관 상태 및 방법 등에 따라 치근면 치주인대세포 건전성과 활성도는 크게 영향을 받게 되며 치료의 예후에 많은 영향을 끼칠 수 있다(Andreasen, 1981, Trope 과 Friedman, 1992, Lin 등, 2000).

이러한 치주인대세포의 활성도를 실험적으로 평가하기 위해 여러 가지 방법이 제시되었다. 이전의 연구에서 Litwin 등(1971)과 Trope 와 Friedman(1992) 그리고 Hiltz 와 Trope (1991)는 다양한 세포 염색을 통해 여러 가지 저장 용액에서의 치주인대세포 활성도를 평가하였다. 그리고 Patil 등(1994)은 다양한 저장용액에 탈구된 치아를 보관한 후 치주인대 세포의 활성도를 평가하는데 fluorescein diacetate 를 이용하여 염색한 다음 살아 있는 세포 수를 광학 현미경과 혈구 계산판 (hemocytometer)으로 직접 세어 활성도를 측정하였다(Patil 등, 1994). Hupp 등(1997)도 탈구된 치아의 잠재적인 치유 능력을 보다 명확히 밝혀내기 위해 발거된 치아를 다양한 저장용액과 시간에 따라 보관한 후 세포의

표식자로서 radioactive DNA precursor 인 H^3 thymidine 을 함유한 배지에 37℃에서 24 시간동안 치주인대 세포를 배양하여 부착시킨 후 이들 치아를 탈회시켜 시편을 관찰 함으로써 치주인대세포 활성도를 평가하였다 (Hupp 등, 1997). 또한, Lekic 등(1998)도 교정치료 목적으로 발치된 소구치를 다양한 건조 시간과 저장 용액에 보관한 후 치근막에서 치주인대세포를 채취하여 배양시켜서 하나의 세포에서 형성된 군집(colony)을 methylene blue 등으로 염색하고 그 군집의 숫자를 세어 치주인대세포의 활성도를 평가하였다(Lekic 등, 1998). 또한, Ashkenazi 등(1999)은 trypsin 과 collagenase 를 이용하여 치근표면으로부터 직접 치주인대세포를 채취하고 배양시켜 이를 다양한 저장 용액에 보관한 후 neutral red 나 trypan blue 등으로 염색하여 치주인대 세포 활성도를 평가하였다(Ashkenazi 등, 1999). 그러나 이러한 모든 방법은 비교적 쉽고 간편하기는 하나 세포의 채취과정에서 치근면의 모든 세포가 채취된다는 뚜렷한 증거가 없으며 비록 세포가 살아있다 하더라도 그 수의 약 70%만이 세포분열능력이 있어 실제 살아있는 세포 수와 치주 조직의 치유 능력과는 차이가 날 수 있다(Hupp 등, 1997). 또한, 이러한 모든 방법들은 치근면에서 채취된 세포를 배양한 것이므로 원래 채취된 세포와는 다른 많은 변수가 작용할 수 있다. Ashkenazi 등(1999, 2000)은 배양 시킨 세포를 이용하여 치주인대 세포의 활성도(viability) 분열능력(mitogenicity), 집락형성능력(clonogenic capacity)같은 살아 있는 세포의 생물학적 상태를 정성적으로는 규명하려 했으나 임상적 결과와 많은 차이를 보였다고 발표하였다(Ashkenazi 등, 1999, 2000).

Tetrazolium-based colorimetric(MTT) 검색법은 많은 시료를 간단히 빠르고 객관성 있게 판독할 수 있어 배양된 세포를 이용한 세포 독성에 관한 연구에 주로 사용되어 왔다(Mosmann, 1983). 이 방법은 대사과정이 온전한 세포의 미토콘드리아 내에 탈 수소 효소가 노란색 수용성 tetrazolium salt[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide](MTT, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 자주색을 띄는 비수용성의 MTT formazan 결정으로 환원시키는 원리를 이용한 것으로, 570nm 의 파장에서 흡광도를 측정함으로써 대사적으로 왕성한 세포의 농도를 반영하게 된다. 따라서 이 흡광도는 MTT 가 살아있는 세포에 의해 환원된 양을 나타내며 각 well 에 존재하는 생존 세포 수와 비례하게 된다.

발거 후 보관 시간이나 저장 용액에 따른 치주인대세포 활성도의 유지 능력을 정확하게 평가하기 위해서는 치근면 세포 활성도를 직접 평가하는 것이 가장 바람직하므로 배양된 세포가 아닌 발거된 치아 그 자체를 사용해서 MTT 검색법으로 세포 활성도를 평가할 수 만 있다면 실험실에서 짧은 시간에 많은 양을 간편한 방법으로 확인할 수 있으므로 세포 활성도 측정에 큰 도움을 줄 수 있다.

Chevallay 등(2000)은 6 주 동안 배양된 쥐의 섬유모세포를 이용하여 지혈제로 상품화 되었거나 개발된 콜라겐 스폰지 내에서 세포들의 성장 능력과 생합성 및 분해능력 활성도, matrix 재형성 가능성을 알아보는 in vitro 실험에서 섬유모세포의 증식 정도를 modified MTT 분석법을 이용하여 측정하였다. 이 실험을 통해

plastic 상에서 세포를 12 일 동안 배양하면서 측정한 직접적인 세포 수와 MTT 분석법으로 측정한 흡광도 값의 그래프를 서로 비교 했을 때 매우 일치된 curve(곡선)를 형성함을 발견하였다. 따라서 이 방법이 장기간 배양된 세포의 성장능력 정도를 알아보는 데 사용될 수 있다고 보고하였다 (Chevallay 등, 2000). Henze 등(1997)은 porcine model 을 이용해서 다양한 약물 투여에 따른 화상 받은 조직의 재생 능력을 비교하는 in vivo 실험에서 전층 판막으로 조직을 생검(biopsy)한 후 이를 MTT 용액에 1 시간 저장하고 냉동 절단법을 이용하여 시편을 제작한 다음 MTT 염색의 침투정도를 길이 측정하여 각 약물의 효과를 평가하였다.

치과영역에서는 최근에 Eliades 등(2004)은 치과 교정 치료 시에 통상적으로 사용되고 있는 교정용 합금인 스테인레스 스틸 브라켓과 Ni-Ti archwire 에서 유출되는 이온들이 배양된 사람의 치은과 치주인대조직 세포에 미치는 세포 독성을 서로 비교하는 in vitro 실험에 MTT 검색법을 사용하였다(Eliades 등, 2004).

치과분야와 연관되어 이 방법이 아직까지 in vivo 실험에서는 이용된 적이 없었으나, Kim 등(2003)은 예비 실험에서 쥐 치아 크기가 96-well plate 에 담길 정도로 충분히 작다는 것을 착안하여 쥐 치아 모델을 이용해서 MTT 검색법 으로 치주인대세포 활성화 유지 능력을 평가하였는데, 발거 후 즉시 처치한 군과 발거 후 1 시간동안 건조 시킨 군 사이에 통계적으로 유의할만한 차이를 있음을 알아내고 이 방법의 유용성을 보고한 바 있다(Kim 등, 2003). 또한, Kim(2003)은

다양한 보관용액에서 시간 변화에 따른 치근면 치주인대세포 활성화 평가에서 MTT 측정치의 결과와 조직학적 관찰 결과가 상당히 일치됨을 발견하고 MTT 검색법이 치주인대세포 활성화 평가에 유용한 한 방법이 될 수 있음을 보고하였다(Kim, 2003).

이에 본 연구는 지금까지의 실험 결과를 토대로 MTT 검색법을 이용하여 흰쥐 상악 대구치를 발거한 후 실온의 건조 상태에서의 짧은 시간 변화에 따른 쥐 치아 치근면 치주인대 세포 활성도를 MTT 검색법으로 측정하고 동시에 이를 냉동 절단법을 이용하여 조직학적으로 관찰하여 이 결과를 토대로 치주인대세포의 활성화 평가에 이용되는 MTT 검색법의 유용성을 검증하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물의 전 처치

생후 4 주된 평균체중 100gm 내외의 건강한 암컷 Sprague-Dawley 계 흰쥐 80 마리를 이용하였다. 발치를 용이하게 하기 위해 0.4% β -aminopropionitrile (β -APN, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 함유한 Purina 분말과 물을 사료로서 발치 전 3 일간 공급하였다. Ketamine (0.1 ml/100g) 마취 하에 접근이 가장 용이한 좌, 우측 상악 제 1 & 2 대구치를 모두 발거 하였다. 이들 치아를 MTT 검색법과 냉동 절단법을 이용한 조직학적 관찰에 모두 사용하였다. 날카로운 탐침으로 peritomy 를 시행한 후 일관성 있는 결과를 얻기 위해 치아주위 조직에 최소한의 외상을 가하면서 발거를 시행했으며 이때 발치와 주변의 출혈은 면봉으로 조절하고 발치 후에는 파절된 부위가 없는지 현미경 하에서 모든 치근의 건전성을 확인하였다.

2. 실험군 분류

구강 외 노출시간에 따라 5 개 군으로 분류되었다.

즉시 시행군 : 치아 발거 후 즉시 MTT 용액에 담구었다

10 분, 20 분, 40 분, 60 분 건조군 : 치아 발거 후 실온에서 10 분, 20 분, 40 분,

60 분 간 건조(bench dry)시킨 후 MTT 용액에 담구었다

3. MTT 검색

96-well plate 에 MTT 용액 (0.05 mg/ml, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 200 μ l 를 넣고 각 군당 제 1, 2 대구치 각각 12 개 치아를 MTT 용액이 있는 각 well 에 담구었다. 이때 혈액내의 혈구세포 개재 가능성을 최소화하기 위하여 식염수로 치근면을 깨끗이 세척하였다. 그 후 알루미늄 foil 로 96-well plate 를 싸서 3 시간 동안 37℃에서 배양하여 MTT 가 환원되도록 했다. 배양 후 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma Chemical Co., St.Louis, MO, USA) 150 μ l 를 첨가하여 형성된 MTT formazan 결정이 녹도록 15 분간 가볍게 진탕해주었다. 각 well 에서 치아를 제거한 후 ELISA(Benchmark microplate reader; BIO-RAD, California, USA)에 넣고 570nm 파장에서 흡광도(Optical Density)를 측정하였다.

4. 냉동 절단법을 이용한 조직학적 관찰

각 군당 상악 제 1, 2 대구치 각각 10 개 치아를 발거한 후 MTT 검색에서와 같이 치아를 MTT 용액이 있는 각 well 에 담근 후 알루미늄 foil 로 96-well plate 를 싸서 3 시간동안 37℃에서 배양하였다. 그 후 각 well 에서 치아를 제거한 후 Tissue-Tek O.C.T (Optimal Cutting Temperature) Compound[®] (Co. Sakura made in USA)로 포매한 후 -20℃에서 냉동 시킨 다음 광학 현미경 관찰을 위해 즉시 10 μ m 두께로 냉동절단(LEICA[®] CM3050 S Germany)하여 표본을 제작하였으며 일부는 현미경 관찰시 주위 조직과의 뚜렷한 차이를

보여주기 위한 대조염색으로 Nuclear Fast Red 시액을 이용하여 염색하였다. 현미경 상에서 보이는 치근면상의 특징적인 MTT formazan 결정의 형태 및 분포 차이를 광학현미경 하에서 (X 50, 100, 200, 400, 1000) 관찰한 후 현미경과 연결시킨 디지털 카메라(LEICA® DC 300F)로 대표적인 부위를 촬영하였다.

5. 치아 치근면에 붙어있는 치주조직의 양 측정 및 현미경 관찰

실험에 사용된 치아의 치근면에 붙어있는 치주조직의 양을 정량적으로 측정하기 위해 MTT 검색 실험 후 각 군의 well 에서 제거된 치아를 각 군별로 96-well plate 에 치아를 다시 위치시키고 Hematoxylin 350µl 을 넣고 10 분간 염색한 후 흐르는 물에 1 분 정도 수세하였다. 다시 eosin 용액 350µl 을 넣고 10 분간 염색한 다음 95% ethanol 에 30 초간 탈수 시켰다. 염색된 치아를 새로운 well 에 다시 놓고 치아의 탈회 없이 염색된 치주 조직 부위를 깨끗이 탈색시키기 위해 치아에 1% acid alcohol 350µl 를 넣어 1 시간 동안 담가두었다. 치아를 각각의 96-well plate 에서 꺼낸 다음 탈색되어 염색된 well 내의 용액을 ELISA(Benchmark microplate reader; BIO-RAD, California, USA)에 넣고 450nm 파장에서 흡광도를 측정하여 간접적으로 치아에 붙어있는 치주조직의 양을 정량적으로 측정하였다. 또한 현미경 관찰을 위해 동일한 염색 방법인 Hematoxylin-eosin 으로 10 분 동안 염색한 후 Tissue-Tek O.C.T Compound® 로 포매하고 -20℃에서 냉동 절단하여 10µm 두께로 시편을 만들어 염색된 치주조직을 광학 현미경으로 관찰하였다.

6. 실험자료 분석

MTT 및 Hematoxylin-Eosin 검색법 에서 얻은 흡광도(OD)는 one-way ANOVA 로 분석하였으며, 군 간의 비교는 Tukey's Studentized Range(HSD) Test 방법을 사용하였다. 각 군 간의 통계분석법은 95% 신뢰 수준에서 유의성을 평가하였다.

III. 결 과

1. MTT 검색에 의한 흡광도 측정

MTT 검색에 의한 전체 시편의 흡광도(OD)값은 Table 1에 정리되어 있다. 즉시 처치군(2.694)과 10 분 건조군(2.872) 사이를 제외하곤 시간이 흐를수록 감소된 값을 보였는데 건조 시간이 20 분(2.210)경과 후부터 감소 폭이 증가하다가 특히, 40 분(1.310)과 60 분(0.970) 경과 건조 군에서는 급격한 감소를 보였다. 통계 처리시 MTT 검색에 의한 흡광도(OD)값은 즉시 처치군(2.694)과 10 분 건조군(2.872) 사이에는 통계학적인 유의차가 없었으나, 즉시 처치군(2.694) 및 10 분 건조군(2.872)은 20 분(2.210), 40 분(1.310) 및 60 분 건조군(0.970)과 비교 시 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$). 또한 20 분 건조군(2.210)도 40 분(1.310) 및 60 분 건조군(0.970) 과의 비교에서 각각 통계학적인 유의차를 보였다($p < 0.05$). 그러나, 40 분 건조군(1.310)과 60 분 건조군(0.970) 사이에는 통계학적인 유의차를 보이지 않았다. (Fig 1-3)

2. 치근면 치주조직의 정량적 측정을 위한 Hematoxylin-Eosin 염색의 흡광도 측정

구강 외 노출시간에 관계없이 실험에 사용된 상악 제 1 대구치의 Hematoxylin-Eosin 염색에 의한 흡광도(OD)의 전체적인 평균값은 1.067 이었고 상악 제 2 대구치는 0.790 이었다. 치근의 수나 지름에 있어 상대적으로 큰 상악 제 1

대구치가 제 2 대구치에 비해 더 큰 흡광도(OD)값을 보였다. 그러나 동일 치아 부위의 각 군(즉시 처치군, 10, 20, 40, 60 분 건조군)간에 평균 흡광도(OD)값은 약간의 차이는 있었으나, 통계학적인 유의차는 보이지 않았다. (Table 2 - 3)

Table 1. Mean and standard deviation of optical density(OD) between MTT and

H-E staining in Mx. 1st plus 2nd molar

M1 + M2	MTT Mean & SD	H-E Mean & SD	MTT/H-E Mean & SD	
0 min	2.670 ± 0.442	1.039± 0.195	2.694 ± 0.219	1
10 min	2.547± 0.389	0.941± 0.220	2.872 ± 0.540	1
20 min	2.057± 0.559	0.954± 0.197	2.210 ± 0.531	2
40 min	1.124± 0.612	0.853± 0.227	1.310 ± 0.450	3
60 min	0.841± 0.307	0.874± 0.235	0.970 ± 0.245	3

1, 2 & 3: Statistically significant at the 95% level of confidence (p <0.05)

Table 2. Mean and standard deviation of optical density(OD) between MTT

and

H-E staining in Mx. 1st molar

M1	MTT	H-E	MTT/H-E	
	Mean & SD	Mean & SD	Mean & SD	
0 min	2.693 ± 0.463	1.171 ± 0.113	2.300 ± 0.334	1
10 min	2.619 ±0.442	1.076 ±0.206	2.557 ± 0.830	1
20 min	2.261 ± 0.594	1.074 ± 0.125	2.119 ± 0.566	1
40 min	1.336 ± 0.687	0.987 ± 0.108	1.352 ± 0.547	2
60 min	0.842 ± 0.325	1.029 ± 0.180	0.756 ± 0.241	2

1, 2 : Statistically significant at the 95% level of confidence (p <0.05)

Table 3. Mean and standard deviation of optical density(OD) between MTT
and
H-E staining in Mx. 2nd molar

M2	MTT Mean & SD	H-E Mean & SD	MTT/H-E Mean & SD	
0 min	2.664 ± 0.439	0.886 ± 0.169	3.088 ± 0.468	1
10 min	2.470± 0.331	0.790 ± 0.138	3.186 ± 0.442	1
20 min	1.854 ± 0.460	0.833 ± 0.183	2.300 ± 0.627	2
40 min	0.913 ± 0.462	0.720 ± 0.160	1.268 ± 0.499	3
60 min	0.840 ± 0.303	0.719 ± 0.175	1.184 ± 0.327	3

1, 2 & 3: Statistically significant at the 95% level of confidence (p <0.05)

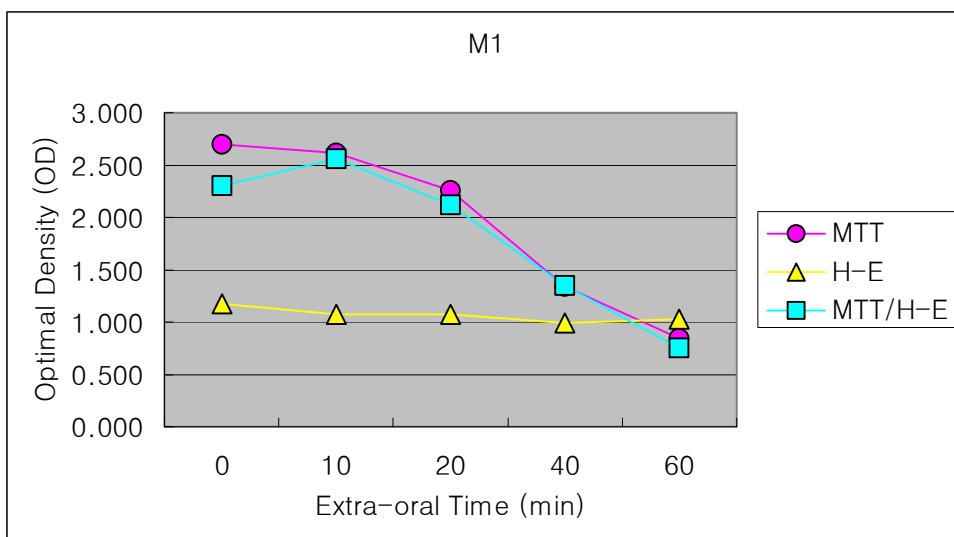


Fig 1. Optical density of MTT and H-E staining following different extra-oral time (min) in Mx. 1st molar

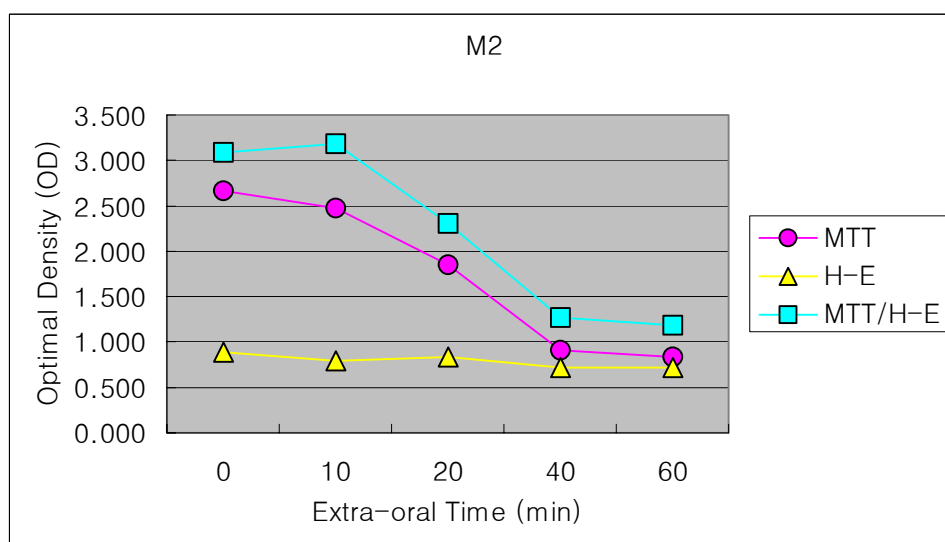
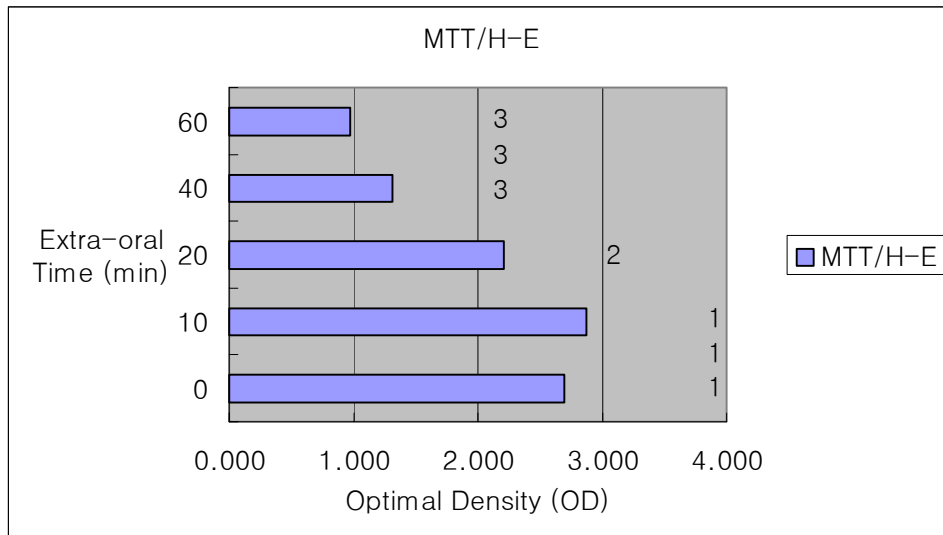


Fig 2. Optical density of MTT and H-E staining following different extra-oral time (min) in Mx. 2nd molar



1, 2 & 3: Statistically significant at the 95% level of confidence ($p < 0.05$)

Fig 3. Statistical significance from Optical density of MTT and H-E staining following different extra-oral time (min) in Mx. 1st plus 2nd molar

3. MTT Crystal 의 조직학적 관찰

가. 즉시 치치군의 치근단에서 치경부로의 MTT 염색의 변화 양상

: 치근단에서 치경부로 갈수록 치주인대 부위의 MTT 염색의 정도는 거의 변화가 없었으나, 치수 내에서는 조금 다른 양상을 보였다. 즉, 치근단 부위에서는 치주인대 부위 조직에서와 거의 비슷한 정도의 MTT 염색 정도를 보였으나 치경부로 갈수록 MTT 염색이 약해지는 경향을 보였다(Fig. 4).

나. 60 분 건조군의 치근단에서 치경부로의 MTT 염색의 변화 양상

: MTT 염색에 의한 crystal 은 치주인대조직 내에서는 극히 일부에서만 관찰되었고 치수 내에서도 별 차이 없이 비슷한 양상을 보였다(Fig. 5).

다. 시간경과 (0, 10, 20, 40, 60 분)에 따라 환원된 MTT crystal 결정체 수 및 모양 비교

: 시간경과에 따라 crystal 의 모양과 분포 및 수에서 확연히 구별되는 특징적인 양상을 보여주었다. 즉시(Fig. 6) 및 10 분 건조 군(Fig. 7)에서는 가시모양의 crystal 이 전 치주인대부위 조직과 치수 내에 밀도 높게 골고루 폭넓게 퍼져 있었으며 치수내가 상대적으로 약간 더 높은 밀도의 분포 양상을 보였다. 그리고 20 분 이상 건조 군에서부터는 치주인대 부위의 crystal 결정체 수가 급격히 감소하는 양상을 보였고 치수 내도 약간의 차이는 있으나 치주인대 부위와 비슷한 양상을 보였다(Fig. 8, 9, 10). 또한 crystal 결정체 모양도 시간이 경과 될수록 crystal 이 극히 한정된 몇 군데 부위에 cluster 처럼 뭉쳐져 있는 양상을 보였다. 특히, 즉시 처치 군에서 MTT 염색에 의한 crystal 결정체를 저배율($\times 100$)에서 고배율($\times 1000$)로 연속 관찰시 특징적으로 많은 가시 같은 형태의 crystal 이 나선 형태로 전 치주인대부위 조직과 치수 내에서 골고루 산재해 있는 모습을 관찰할 수 있었다(Fig. 11). 전체적인 crystal 의 분포를 살펴보면 치주인대 내에서 치근면에 인접한 부위와 치조골에 인접한 부위가 중간부위보다 좀 더 높은 밀도의 crystal 분포를 보였다. 또한 즉시 및 10 분

치치 군에서 대조염색(Nuclear Fast Red)으로 염색 후 관찰한 일부 시편에서 치근단 1/3 정도의 세포성 백아질로 추정되는 부위에서 특징적인 백아질 세포와 백아질모세포를 명확히 관찰할 수 있었다(Fig. 12).

4. Hematoxylin-Eosin 으로 염색된 치근면 치주조직의 현미경 관찰

: 실험에 사용된 거의 모든 치아에서 치근 주위에 어느 정도 균일한 두께의 치주인대 조직을 관찰할 수 있었으며 치아에 붙어있는 치주 조직 양을 현미경으로 비교 관찰한 결과 모든 군의 치아에서 비슷한 정도의 치주조직 양을 볼 수 있었다.

IV. 고 찰

탈구된 치아의 재식 시 치주인대의 생활력은 장기간의 성공을 결정하는 가장 중요한 요소이다(Andreassen 과 Kristerson , 1981). 그러므로 탈구된 치아들은 치주인대 건조로 인한 세포 기능 저하를 막기 위해서 가능한 한 빨리 재식 하거나 재식 전까지 치주인대 세포의 건강을 유지토록 하는 것이 추천 된다(Blomlof, 1981). 따라서 탈구된 치아가 구강 외에 노출된 건조 시간에 따라 치주인대 조직의 세포에 얼마만큼의 손상이 일어날 수 있는지를 이해하는 것은 외상을 받은 치아의 치료계획을 설정하는데 중요한 고려사항이 될 수 있다.

그러므로 이번 실험의 주요 목적은 발거 후 실온의 상태에서 구강 외 노출시간의 차이에 따른 쥐 치아 치근면의 치주인대 세포의 활성도를 MTT 검색법을 이용하여 측정하고 동시에 실제로 건조된 시간 변화에 따라 MTT 로 염색된 치아의 치근을 냉동 절단법을 이용해서 절단한 후 현미경으로 관찰함으로써 MTT 검색법에 의한 측정치가 실제 치근면의 치주인대 세포 활성도 평가에 얼마나 높은 정확성을 갖는지 여부를 검증하기 위해 진행하였다.

이번 실험의 결과는 MTT 검색법 으로 측정한 값과 실제로 냉동 절단법을 이용해서 절단한 치근면의 관찰 결과를 비교 하였을 때 상당히 밀접한 상관관계가 있음을 보임으로써 이 방법이 치주인대 세포의 활성도 평가에 충분히 사용될 수 있음을 입증해 주었다. 따라서, 이 실험의 의의는 기존의 치주 손상 연구에서 채취할 수 있는 세포수가 한정 되어 배양된 세포를 이용할 수밖에

없었던 치주인대 세포 활성화 측정법에 있어 새로운 대안을 제시 할 수 있을 것으로 생각된다.

본 실험에 사용된 MTT-검색의 원리는 살아있는 세포의 미토콘드리아에서 formazan dye 를 형성함으로써 MTT 를 감소시키는 살아있는 세포의 능력에 초점을 맞춘 것으로 MTT 에 반응한 세포는 여전히 활성도가 있음을 나타내고 손상 받은 세포는 반응하지 않은 채로 남게 되어 빠르게 세포의 활성도를 확인할 수 있는 진단법이다(Mosmann, 1983). Tetrazolium-based colorimetric(MTT) 검색법은 96-well plate 를 사용하고 검사 결과를 ELISA reader(multiwell microplate reader)를 이용하여 세포독성 및 세포증식 정도를 객관적으로 검색하는 방법으로 많은 시료를 빨리 처리할 수 있어 sulforhodamin B(SRB)검색법과 더불어 널리 사용되고 있다(Mosmann, 1983, Papazisis 등, 1997).

기존의 치근막 손상 연구는 치주조직 재생에 중요한 섬유모세포의 다양한 특성을 밝혀내기 위해서 다양한 *in vivo* 및 *in vitro* 모델을 사용하였다(Bordin 등, 1984). *In vitro* 방법은 조절된 환경에서 세포의 기능과 분화를 연구할 수 있는 기회를 부여함으로써 *in vivo* 방법보다 더 효과적인 방법으로 생물학적인 기전을 이해하는데 도움을 준다. 그러나, Narayanan 과 Page (1983)는 충분히 많은 수의 세포를 얻기 위한 오랜 기간 성장과 반복적인 계대배양은 *in vitro* 에서의 인위적 구조의(artifacts) 가능성과 세포의 선택적 효과(selection effects)를 증가시킨다고 발표하였다(Narayanan 과 Page, 1983). 또한, McCulloch 와 Knowles(1991)는 실제로 중요한 형질(phenotypic)과 성장능력 (proliferative)의

변화가 여러 번의 반복적인 배양으로 인해 선택된 세포 집단에서 일어날 가능성이 있으므로 원래 채취한 세포(original cell) 집단의 특성을 그대로 반영시키지 못하는 문제점이 있을 수 있다고 보고하였다(McCulloch 와 Knowles, 1991). 그리고 배양시킨 세포를 이용한 다양한 in vitro 분석법은 탈구된 치아의 저장 용액에 대한 효능 비교와 구강 외 노출시간에 대한 영향을 평가하는데 사용되고 있으며 또한 이들 분석법은 in vivo 에서의 세포 생존(cell survival)에 대한 유용한 표식자로 이용되어 왔다. 하지만 이들 방법을 이용한 많은 기존의 여러 보고서(Hupp 등, 1997, Morris 등, 1981) 는 다양한 세포 활성화 측정 결과와 임상적 성공률사이에 별 상관관계가 없음을 보여주고 있다(Hupp 등, 1997, Morris 등, 1981). 이와 같이 재식 치아의 임상적 성공과 in vitro 분석법 사이에 커다란 차이가 존재하는 이유는 실제 치근면의 상태를 그대로 재현시키지 못하는 실험상의 문제가 크다고 생각된다. 따라서 발거 후 구강 외에서 짧은 시간 변화에 따른 세포의 활성화 차이나 다양한 저장 용액에서의 활성화 유지능력 정도 등을 정확히 평가하기 위해서도 훨씬 더 민감한 세포 활성화 분석법이 개발되어야 한다.

본 연구는 최근에 소개된 냉동 절단법을 이용하여 만든 시편에서 MTT 로 염색된 치근면을 광학현미경을 통해 살아있는 세포내의 미토콘드리아의 탈 수소 효소에 의한 formazan 결정을 관찰하는 것이었다. 따라서 조직이 살아있는 상태에서 최소한의 변형 없이 세포 구조를 유지토록 하는 방법이 필요하였다.

그러나, 통상의 석회화된 조직에서 사용되었던 고정과 탈회방법은 절편제작은 쉬우나 결과적으로 효소 활동(enzyme activity)과 면역학적인 반응성(immuno-reactivity)의 감소를 초래하며 조직으로부터 수용성 물질의 소실이나 변위를 일으킨다고 한다(Munckhof 등, 1994, Fukase, 1997). 이러한 문제점은 고정이나 탈회 과정 없이 직접 경조직 절편을 형성함으로써 방지할 수 있다. 따라서 이번 연구에 사용된 냉동 절단법은 통상적인 냉동절단기 장비를 이용하여 광학현미경을 통해 별 어려움 없이 조직학이나 enzyme histochemistry 연구도 가능하게 하며, 면역조직화학 염색법, in situ hybridization, & electron microprobe x-ray micro-analysis 와 같은 다양한 실험에서도 응용 시킬 수 있을 것으로 사료된다.

Carter 등(1994)은 치아와 치아지지조직의 조직학적인 시편 제작을 위해 탈회시키지 않은 뼈의 냉동 절단용 heavy-duty freezing microtome 을 사용해서 쥐 하악을 냉동 절단하였으며 광학 현미경과 전자현미경적 관찰을 통해 시편의 세포와 세포 외 구조가 잘 보존되었음을 확인하였으며 면역조직화학 분석에서도 이 절단법이 적합하며 에나멜의 조직학적인 특성도 잘 나타내주었다고 보고하였다(Carter 등, 1994).

이번 실험에서 쥐 치아의 발치를 용이하게 하기 위해 사용된 0.4% β -aminopropionitrile 은 amine oxides 의 작용을 억제 시켜서 콜라겐 α -chain 상의 lysyl-derived aldehyde groups 의 형성을 방해하여 반응력이 있는 알데히드군을 감소시킴으로써 콜라겐 분자와의 교차결합이 많이 일어나지 않게 함으로써

콜라겐 섬유의 인장력을 감소시킨다(Bornstein, 1970). Barrington 과 Meyer(1966)는 0.4% β -aminopropionitrile 의 생물학적인 영향 효과에 관한 동물 실험에서 0.4% β -APN 처치를 끊은지 3 일 후에 치주인대는 정상 상태로 되돌아오며, 결과적으로 치주인대세포 또는 콜라겐 섬유에 비가역적인 변화는 전혀 일어나지 않음을 보고하였다(Barrington 과 Meyer, 1966). Cho 와 Garan(1984a,1984b)는 이러한 사실을 근거로 하여 β -APN 처치한 후 발치를 시행 하였을 때 치아가 건전하며 치조골 내에서도 균일한 두께의 치주인대가 잔존한다고 보고하였다(Cho 와 Garan, 1984a, Cho 와 Garan, 1984b).

본 실험의 MTT 검색 결과를 살펴보면 20 분 건조군(2.210)은 즉시 처치 군(2.694)과 10 분 건조군(2.872) 과의 비교에서 통계학적인 유의차가 있음을 보였는데, 이는 Lindskog 와 Blomlof(1982)가 건조 보관의 임계시간(critical time)이 18-30 분 사이라고 보고한 결과와 일치하였다(Lindskog 와 Blomlof, 1982). 또한, Andreasen(1981)이 생리식염수 내에 18 분 동안 저장된 치아는 발치 후 즉시 재식된 치아와 비교시 치근흡수에 있어 별 차이가 없음을 보고한 결과와 비교할 때 치주인대 건조로 인한 악영향을 막는 것이 무엇보다 중요하며(Andreasen, 1981) 만약, 치아가 그 즉시 재식 될 수 없다면 치주인대로부터 조직액의 증발을 억제 시키는 것이 최우선 치료법임을 보고한 Blomlof(1981)의 실험 결과와도 일치하였다(Blomlof, 1981).

Andersson(1990)은 장기간의 follow-up 연구에서 외상 후 15 분 내에 재식된 사람의 21 개 치아를 평균 5 년에 걸쳐 방사선 상으로 관찰하였는데 7 개는

관찰기간동안 어떤 흡수도 보이지 않았으며 8 개는 얇은 흡수와를 보였고 6 개는 시간이 흐름에 따라 미약한 진행성 치근흡수를 보임으로써 결론적으로 탈구된 치아가 15 분 내에 재식 된다면 장기간의 예후는 양호함을 보고한 바(Andersson, 1990) 본 실험 결과와 비교시 20 분 이내 재식이 이루어진다면 치근면 치주인대 세포의 활성도가 유지되어 예후가 양호할 것으로 생각된다

상악 제 1 대구치와 제 2 대구치 사이에 단위 면적으로 환산된 MTT 검색에 의한 흡광도 측정치 비교에서 상악 제 2 대구치에서 약간 더 높은 수치를 보였는데 그 이유를 생각해보면 쥐의 상악 제 1 대구치는 치근이 5 개이고 치근의 이개도가 제 2 대구치에 비해 크므로 발치 시에 좀 더 많은 외상을 받아 치근면의 치주인대 세포가 손상을 받았을 가능성이 높으며 상대적으로 제 2 대구치는 제 1 대구치에 비해 치근이 4 개이고 치근 이개도가 거의 없어 발치가 상대적으로 손쉬워서 손상 받았을 가능성이 적음이 하나의 이유가 될 수 있으며 또 다른 이유로는 이번 실험에 사용된 생후 4 주된 쥐 치아의 상악 제 1, 2 대구치는 치근 형성이 완전히 덜 된 상태에서 3-4 일 정도 상대적으로 늦게 맹출(Schour & Massler, 1949) 되는 제 2 대구치의 치근단 공이 제 1 대구치에 비해 형성이 제대로 안된 상태로서 넓기 때문에 MTT 용액이 치근단 공과 분지를 통해 근관 내로 더 많이 침투되었을 것으로 추측 된다.

또한, 흥미로운 것은 상악 제 1 대구치에서는 단위면적으로 환산된 MTT 흡광도 측정치에서 20 분 건조군이 10 분 건조군과 비교시 통계학적인 유의차를 보이지 않았으나 상악 제 2 대구치에서는 MTT 흡광도 측정치에서 20 분 건조군이 10 분

건조균과 비교시 통계학적인 유의차를 보인 것으로 이것도 역시 쥐 치아의 발육상태와 연관이 있는 것으로 생각된다. 즉 치근단공이 제대로 형성 안된 제 2 대구치에서 치수내의 살아있는 세포가 제 1 대구치에 비해 상아질이나 백아질에 의해 보호 받지 못하고 건조에 노출되었을 가능성이 더 높기 때문으로 해석된다.

40 분(1.310)과 60 분 건조(0.970) 처치 군에서 급격히 감소된 MTT 측정치의 결과는 Modeer(1984)가 치근막 세포에 관한 연구에서 30 분 정도의 짧은 건조 보관 상태 에서도 심한 세포 손상이 초래되었음을 보고한 결과와 일치하였다.(Modeer, 1984), 또한, Andreasen(1981)이 green vervet monkey 를 이용한 실험에서 하악 측절치를 발거 한 다음 0, 18, 30, 60, 90, 120 분 동안 건조 또는 다양한 저장액에 저장 보관 시킨 후 재식한 경우 30 분 건조군 에서 부터 염증성 치근흡수가 흔히 관찰되었으며 대체성 치근흡수는 30 분 경과 후부터 증가되어 60 분 경과 후에 매우 두드러졌고 60 분 건조시간 후에는 치근표면에는 살아있는 세포가 거의 남아있지 않았으며, 120 분 후에는 살아있는 세포가 전혀 관찰되지 않았다는 보고와도 유사한 결과를 보인 것으로 생각된다(Andreasen, 1981). Lekic 등(1998)은 탈구된 치아에서 치주인대 세포의 *in vitro* 집락 형성 분석법(clonogenic capacity)은 재식 후 치근 표면에 부착되고 재 군집되는 치주인대 progenitor cells 의 능력과 연관 있음을 발표하였는데 특히, 세포 활성도의 급격한 소실에 대한 임계시간(critical period)은 치아 저장 후부터 15 분 이내에서 시작된다고 보고하였다(Lekic 등, 1998). 다른 많은 연구들(Soder 등, 1977, Lekic 등, 1996) 도 발치 후 15 분이 초과되면 살아있는 세포 수에 있어

급격한 감소가 일어나며 2 시간 정도에서는 살아있는 세포는 치주인대 내에서 전혀 존재하지 않는다고 보고하고 있다.

본 연구에서 10 분 건조 처치군(2.872)이 즉시 처치군(2.694)에 비해 통계학적인 유의차는 없으나, 약간 더 높은 MTT 측정치를 보였는데, 이는 세포에 ischemia 나 hypoxia 가 발생되면 survival program 의 일환으로 세포내의 미토콘드리아에 있는 inner membrane 이 손상 받으면서 mitochondrial permeability transition(MPT)(Bernardi, 1996, Lemasters, 1997)이 일어나 membrane lysosomal enzymes 의 intracellular release & activation 이 일어나서 생기는 일시적인 현상일 수 있다. 그러나, 이것이 지속되게 되면 비가역적인 손상이 일어난다고 알려져 있다. 비가역적인 손상이 일어나면 미토콘드리아의 심한 부종, plasma membrane 에 광범위한 손상, lysosomes 의 부종을 초래해서 괴사 (coagulation)나 apoptosis 과정을 거쳐 세포는 사멸하게 된다(Cotran 등, 1999).

이번 실험에서 처음 시도된 Hematoxylin-Eosin 검색에 의한 정량적 측정법은 치근면에 붙어있는 치주조직의 양을 정량적으로 측정하기 위해 처음에는 질량이나 표면적 등을 이용하여 구하려 했으나 기술적으로 불가능 하였고 CT scan 또한 여러 가지 문제로 측정이 어려워서 MTT 검색법을 응용하여 사용하게 되었다. 또한 상악 제 1 대구치와 제 2 대구치 각각에서 발치시에 치아의 치근면에 붙어있는 치주조직의 양을 정량적인 객관적 수치로 표시하기가 사실상 어렵고 같은 치아 부위라 할지라도 치근의 길이와 지름에 있어 제각기 다 다르므로

정확한 측정이 어려운 문제점을 보완하기 위해 처음 시도된 방법이다. 측정 결과를 살펴보면 실험에 사용된 치아는 상악 제 1 대구치와 제 2 대구치였는데 이들 치아에서 상악 제 1 대구치는 제 2 대구치에 비해 치아 크기도 훨씬 크고 치근의 수도 5 개로 제 2 대구치에 비해 1 개 더 많으므로 더 높은 흡광도(OD) 값을 보일 것으로 추측되었다. 따라서 H&E 검색법을 사용하여 이를 검증하고자 하였는데 실제로 Hematoxylin-Eosin 염색에 의한 흡광도 측정에서 상악 제 1 대구치(1.067)와 제 2 대구치(0.790) 사이에 통계학적인 유의차($p < 0.05$)가 있었으며 상악 제 1 대구치에서 더 큰 흡광도(OD)값을 보였다. 그러나 동일한 치아를 사용한 각 군 간에는 통계학적인 유의차를 보이지 않았다. 이러한 결과는 치주조직의 정량적 측정을 위한 H&E 염색에 의한 검색법의 객관성을 평가하는데 있어서 중요한 근거가 될 수 있으므로 의미 있는 결과라 사료된다. 앞으로 이 측정 방법의 객관성과 정확성을 입증하기 위해 보다 더 많은 연구와 검증이 필요하리라 생각된다.

실제 임상에서 탈구시 치수는 보통 괴사되고 부착 조직은 손상 받게 된다. 그러나, 치수괴사는 근관 공간이 감염되지 않은 채로 있는 한 심각한 부작용을 초래하지는 않는다(Trope 등, 1992). 미성숙 치아에서는 괴사된 치수 조직에 혈관이 재생(revascularizing) 되거나, 성숙된 치아 경우처럼 만약에 혈관 재생(revascularization)이 가능치 않다면 근관 치료를 함으로써 감염은 어느 정도 방지될 수 있다(Skoglund 와 Tronstad , 1981). 하지만 치아가 외상을 받은 경우에 부착 치주조직의 손상은 피할 수 없으나, 만약에 손상이 적고 감염되지

않았다면 치유가 일어날 것이다(Andreasen 등, 1995). 또한, 건조로 인한 치주조직 손상은 빠른 재식이나 적절한 저장 보관 액에 치아를 보관함으로써 어느 정도 피할 수 있을 것이다(Andreasen 1981)(Blomlof, 1981). 그러나, 외상이나 다른 형태의 오염에 의해서 기인된 치근표면상의 세균은 잠재적으로 해로운 결과를 초래하게 된다.

하지만, 본 실험은 보통 외상성 손상 시 치주인대 손상과 동반되어 나타나는 세균성 오염(이런 경우 염증성 치근흡수가 일어남)이 아닌 단지 치아이식이나 재식 시에 일어날 수 있는 건조(drying)라는 변수에 의한 치주인대 세포의 손상으로 한정시켜서 실제 탈구된 치아 상황에 그대로 적용하기에는 약간의 무리가 있을 수 있으나, 탈구된 치아의 건조시간에 따른 치주인대 세포 활성도를 관찰하기에는 좋은 실험 모델이라고 생각된다.

한편, 조직학적인 관찰 결과를 살펴보면 건강한 치아 치근면에서 MTT 염색은 거의 모든 세포 형태에서 푸른색을 보여주었으며, 진한 푸른색 염색 부위의 고배율 확대시 푸른색 formazan dye 의 세포질내 위치(intracytoplasmatic location)를 나타내주었다. 즉시 처치군과 10 분 건조군 에서는 치근단에서 치경부로 갈수록 치주인대 부위 MTT 염색의 정도는 거의 변화가 없었으나, 치수 내에서는 조금 다른 양상을 보였는데, 치근단 부위에서는 치주인대 부위 조직에서와 거의 비슷한 정도의 MTT 염색 정도를 보였으나 치경부로 갈수록 MTT 염색이 약해지는 모습을 보였다. 이것은 아마도 생후 4 주된 쥐를 사용하여 근침이 완전히 형성되지 않았기 때문에 MTT 용액이 치근단 공이나 분지를 통해

침투되는 깊이에 한계가 있었을 것으로 해석되며 대부분 치근단 1/2 정도까지 침투되었다. 또한, 치경 부에서는 치근의 지름이 커짐에 따른 삭제 날의 절단능력(cutting efficiency)의 한계로 인해 깨끗한 치아절단면 및 치주인대 부위의 MTT 염색 관찰이 어려웠다.

그러나 40 분 이상 건조된 처치 군에서는 치주인대조직 섬유모세포 유사세포(fibroblast-like cell) 들의 괴사로 인해 살아있는 세포에서만 발견되는 MTT 염색 crystal 을 극히 일부에서만 관찰할 수 있었다. 치수 내에서는 큰 차이는 없으나 약간 더 많은 crystal 결정체를 치근단 1/3 및 중간부위에서 발견할 수 있었는데 그 이유는 수분증발에 의한 건조가 치아외벽(상아질과 백아질)에 의해 어느 정도 보호된 것과 남아있는 nutrient source 가 치주인대부위보다는 유리하기 때문에 세포들이 좀더 오래 견딜 수 있는 환경 때문이 아니었나 추측된다.

한편 즉시 처치 군과 10 분 건조군에서 MTT 염색에 의한 crystal 결정체를 동일 시편에서 저배율($\times 100$)에서 고배율($\times 1000$)로 연속 관찰시 특징적으로 많은 가지 같은 형태의 crystal 이 치주인대부위와 치수 내에서 관찰되었고 전 치주인대부위와 치수 내에 골고루 산재해 있는 모습을 관찰할 수 있었다. 이는 건강한 치주인대와 치수 내에서 살아있는 세포들의 고른 분포를 뜻한다고 해석된다. 그러나, 치주인대 내에서의 MTT 염색에 의한 전체적인 crystal 의 분포를 살펴보면 치근면에 인접한 부위와 치조골에 인접한 부위가 중간부위보다 좀 더 높은 밀도의 crystal 분포를 보였다. 이것은 이 부위에 치주조직의 재생과

연관이 높은 세포 분열 능력이 왕성한 섬유모세포 유사세포(fibroblast-like cell)들이 특히 많이 분포되어 있음을 암시한다(Cho 등, 1992, McCulloch 1993). 또한, 치아에 공급되는 혈관 분포와도 상관이 있을 것으로 사료된다. 또 다른 소견으로 대조염색(Nuclear Fast Red)으로 염색된 일부 시편에서는 치근단 1/3 부위에 세포성 백아질이 축적되어 있었으며 이 부위에서 특징적인 백아질 세포나 백아질 모세포를 명확히 관찰할 수 있었다.

조직학적 관찰시 시간경과에 따라 crystal 의 모양과 분포 및 수에서 확연히 구별되는 특징적인 양상을 보여주었는데 즉시 처치 군과 10 분 건조 군에서는 가시모양의 crystal 이 치주인대와 치수 내에 골고루 널리 퍼져 있었으며 치수내가 약간 더 높은 밀도를 갖는 양상을 띄는 반면에, 시간이 경과할수록 치주인대 부위의 crystal 결정체는 급격히 감소하는 양상을 띄었다. 치수 내도 약간의 차이는 있으나 치주인대 부위와 비슷한 양상을 보였으며 crystal 결정체 모양도 시간이 경과될수록 crystal 이 극히 한정된 몇 군데 부위에 cluster 처럼 뭉쳐져 있는 양상을 보였는데, 이는 시간이 경과함에 따라 cell surviving program 의 일환으로 세포가 비가역적인 손상을 받으면서 세포내의 미토콘드리아에 있는 inner membrane 의 심한 부종과 더불어 막간의 협착이 일어나면서 생겨난 현상일 것으로 추정된다.

지금까지의 대부분의 실험실과 생체 연구는 기간에 있어서 시간(hours)보다는 날(days) 동안 치주인대 세포의 생활력(vitality)를 유지할 수 있는 보관 용액의 효과나 시간 단위의 구강 외 노출 시간에 관한 효과에 대해 주로 연구되어져

왔다(Litwin 등, 1971, Trope 과 Friedman, 1992). 그러나, 본 연구는 시간(hour)단위 보다는 실제 임상에서 일어날 수 있는 분(minute)단위의 짧은 시간에 따른 치주인대 조섬유세포의 활성도를 조사하는데 초점을 맞추었다.

이번 실험에서는 1 시간 이상 건조 탈구된 치아의 표면 상에는 살아있는 치주인대세포는 전혀 남아있지 않다고 보고 되고 있기 때문에(Soder 등, 1977, Andreasen 과 Kristerson, 1981) 60 분 이상 건조군은 실험에서 제외시켰다.

또한, 발거 된 쥐 치아의 전 치근이 통째로 사용되었는데 이것은 탈구된 치아에 남아있는 치주인대 세포의 활성도를 분석하는데 있어 훨씬 더 현실적인 접근법이라 생각된다.

본 연구의 결과를 종합적으로 생각해보면, MTT 흡광도 측정값과 실제로 냉동절단법을 이용해 절단한 치근면의 MTT crystal 관찰 소견을 서로 비교하였을 때 상당히 일치된 결과를 보임으로써 MTT 검색법은 치아 재식술이나 이식술의 치료 성패를 결정짓는 치주조직의 재생에 중요한 치주인대 내의 살아있는 세포를 객관적으로 평가하는데 응용될 수 있음을 보여 주었다. 또한 임상에서 치아 이식이나 재식술의 높은 성공을 위해서는 치주인대의 활성도를 가능한 최대로 보존함이 중요한데 그것의 한계시간은 구강 외 자연 건조시 20 분 이내임을 이번 실험 결과에서 보여주었다.

그리고 이번 실험은 MTT 검색법이 치주인대세포의 활성도 평가에서 문제점으로 제시된 배양된 세포가 아닌 치근면에 붙어있는 세포를 직접 평가할 수 있는 기존의 평가법의 문제점을 보완해주는 새로운 대안이 될 수 있는

가능성을 열어 주었고 앞으로 이 방법을 이용하여 발거된 치아의 치주인대 세포를 오랫동안 보관할 수 있는 저장액 개발이나 미래의 치아은행 운영을 위한 성공적 결실을 위해 Schwartz(1983, 1985)에 의해 제시된 프로토콜과 이를 이용한 실제 임상에서 적용가치가 있는 냉동 보관법에 관한 지속적인 연구와 개발에 많은 도움을 주리라 생각된다.

V. 결 론

흰쥐 80 마리의 상악 제 1 & 2 대구치 발거 후 실온 건조 상태에서 짧은 시간 변화에 따른 쥐 치아 치근면의 치주인대 세포 활성도를 MTT 검색법으로 측정함과 동시에 냉동 절단법을 이용한 조직학적 관찰을 통해 MTT 검색법의 유용성을 검증하였다.

MTT 검색에 의한 흡광도 값에 있어 즉시 처치군과 10 분 건조군 사이에는 통계학적인 유의차가 없었다. 그러나, 즉시 처치군 및 10 분 건조군과 20 분 40 분 및 60 분 건조군 사이, 20 분 건조군과 40 분 및 60 분 건조군 과의 사이에서 각각 통계학적인 유의차를 보였다($p < 0.05$). 그러나 40 분 건조군과 60 분 건조군 사이에는 통계학적인 유의차를 보이지 않았다.

실험에 사용된 상악 제 1 대구치의 Hematoxylin-Eosin 염색에 의한 흡광도의 평균 측정값은 상악 제 1 대구치가 제 2 대구치에 비해 더 큰 흡광도 값을 보였다. 그러나 동일 치아의 각 군 간에 평균 흡광도 값은 약간의 차이는 있었으나 통계학적인 유의차는 보이지 않았다.

조직학적 현미경 관찰에서 시간경과에 따라 환원된 MTT crystal 의 모양과 분포 및 수에서 확연히 구별되는 특징적인 양상을 보여주었다.

치아에 붙어있는 치주 조직 양의 비교를 위한 Hematoxylin-Eosin 염색의 현미경 관찰에서 시간 경과에 따른 치주조직 양에 있어 군 간에 차이가 관찰되지 않았다.

이번 실험의 결과를 종합적으로 분석해보면 MTT 흡광도 측정값과 냉동 절단법을 이용한 시편의 MTT 염색 관찰 소견 결과를 서로 비교 했을때 상당히 밀접한 상관 관계가 있음을 보였다. 또한 임상에서 치아 이식이나 재식술의 높은 성공을 위해서는 치주인대의 활성도를 가능한 최대로 보존함이 중요한데 그것의 한계시간은 구강외 자연 건조시 20 분 이내임을 이번 실험 결과에서 보여주었다.

이번 실험의 중요한 의미는 MTT 검색법이 치주인대 세포의 활성도 평가에서 배양된 세포가 아닌 치근면에 붙어있는 세포를 직접 평가할 수 있는 새로운 대안이 될 수 있는 가능성을 입증해 주었으며 앞으로 이 방법을 응용하여 발거된 치아의 치주인대 세포를 장기간 보관하기 위한 저장액 개발이나 치아은행 운영을 위한 냉동 보관법에 관한 지속적인 연구와 개발에 도움을 주리라 생각된다.

참고문헌

Andersson L, Bodin I : Avulsed human teeth replanted within 15 minutes- a long-term clinical follow-up study. Endod Dent Traumatol 6 : 37-42.1990

Andreasen JO : Effect of extra-alveolar period and storage media upon periodontal and pulpal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. Int J Oral Surg 10: 43-53, 1981.

Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM : Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 4. Factors related to periodontal ligament healing. Endod Dent Traumatol;11:76-89,1995.

Andreasen JO, Hjorting-Hansen E: Replantation of teeth. I. Radiographic and clinical study of 110 human teeth replanted after accidental loss. Acta Odontol Scand 24: 263-286,1966a.

Andreasen JO, Hjorting-Hansen E: Replantation of teeth. II. Histological study of 22 replanted anterior teeth in humans. Acta Odontol Scand 24: 287-306,1966b

Andreasen JO, Kristerson L: The effect of limited drying or removal of the periodontal ligament. Periodontal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. Acta Odontol Scand 39: 1-13,1981.

Ashkenazi M, Marouni M, Sarnat H: In vitro viability, mitogenicity and clonogenic capacity of periodontal ligament cells after storage in four media at room temperature. Endod Dent Traumatol16:63-70,2000.

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 Traumatol15:149-156,1999.

Barrington EP, Meyer J : Recovery of the rat dental organ from experimental lathyrisms. J Periodontol 37:453-467,1966.

Bernardi P : The permeability transition pore. Control points of a cyclosporine A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. *Biochim Biophys Acta*;1275:5, 1996.

Blomlof L: Milk and saliva as possible storage media for traumatically exarticulated teeth prior to replantation. *Swed Dent J Suppl*8;1-26,1981.

Bordin S, Page RC, Narayanan AS : Heterogeneity of normal human diploid fibroblasts: isolation and characterization of one phenotype. *Science* ;223: 171-173,1984.

Bornstein P : The cross-linking of collagen and elastin and its inhibition in osteolathyrism. Is there a relation to the aging process?. *Am J Med* 49: 429-435,1970

Carter DH, Sloan P, Aaron JE : The cryomicrotomy of rat dental tissues: a technique for histological and immunohistochemical analysis. *Histochem J*. Feb;26(2): 103-9, 1994.

Chevallay B, Abdul-Malak N, Herbage D: Mouse fibroblasts in long-term culture within collagen three-dimensional scaffolds : Influence of crosslinking with diphenylphosphorylazide on matrix reorganization, growth, and biosynthetic and proteolytic activities. J Biomed Mater Res,49, 448-459,2000.

Cho MI, Garant PR: The effect of beta-aminopropionitrile on the periodontal ligament: I. Ultrastructure of fibroblasts and matrix. J Periodontal Res 19:247-260, 1984a

Cho MI, Garant PR: The effect of beta-aminopropionitrile on the periodontal ligament: II. Radioautographic study of collagen secretion from fibroblasts. Anat Rec 209: 41-52, 1984b.

Cho MI, Matsuda N, Lin W-L, Moshier A, Ramakrishnan PR : In vitro formation of mineralized nodules by periodontal ligament cells from the rat. Calcif Tissue Int;50:459-467.1992.

Cotran R, Kumar V, Collins T : Robbins pathologic basis of Disease. Saunders ;6:5-25, 1999.

Eliades T, Pratsinis H, Kleetsas D, Eliades G, Makou M : Characterization and cytotoxicity of ions released from stainless steel and nickel-titanium orthodontic alloys. Am J Orthod Dentofacial Orthop; Vol. 125, number 1:24-9, 2004.

Fukase Y : Immunohistochemical staining of human teeth, and production of monoclonal antibodies against cementum. J Osaka Dental Univ 31:1-9,1997

Henze U, Lennartz A, Hafemann B, Goldmann C, Kirkpatrick CJ, Klosterhalfen B : The influence of the C1-inhibitor BERINERT[®] the protein-free haemodialysate ACTIHAEMYL20%[®] on the evolution of the depth of scald burns in a porcine model^{*}.: Burns, Vol.23,NO.6,473-477,1997.

Hiltz J, Trope M: Vitality of human lip fibroblasts in milk, Hanks balanced salt solution and Viaspan storage media. Endod Dent Traumatol7: 69-72,1991.

Hupp JG, Mesaros SV, Aukhil I, Trope M : Periodontal ligament vitality and histological of teeth stored for extended periods before transplantation. Endod Dent Traumatol 1998;14:79-83

Hupp JG, Trope M, Mesaros SV, Aukhil I: Tritiated thymidine uptake in periodontal ligament cells of dogs' teeth stored in various media for extended time periods. Endod Dent Traumatol 13: 223-227,1997.

Kim ES: Evaluation of periodontal ligament cell viability in rat teeth using MTT assay. Ph D Thesis, Yonsei university, Seoul, 2003

Kim HK, Kim ES, Choi IB, Kim J, Lee SJ : The verification of the MTT assay on the viability of periodontal ligamental cells in rat molars through the histologic examination. J of korean academy of conservative dentistry vol.28,No. 5, 2003.

Laureys W, Beele H, Cornelissen R, Dermaut L : Revascularization after cryopreservation and autotransplantation of immature and mature apicoectomized teeth. Am J Orthod Dentofacial Orthop ;119:346-352, 2001.

Lee SJ, Jung IY, Lee CY, Choi SY, Kum KY: Clinical application of computer-aided rapid prototyping for tooth tranplantation. Dent Traumatol 17: 114-119, 2001.

Lekic P, Kenny D, Barrett E: The influence of storage conditions on the clonogenic capacity of periodontal ligament cells : implications for tooth replantation. Int Endod J31:137-140, 1998.

Lekic P, Kenny D, Moe HK, Barrett E, McCulloch CAG : Relationship of clonogenic capacity to plating efficiency and vital dye staining of human periodontal ligament cells; implications for tooth replantation. J Periodontal Res 31:294-300,1996.

Lemasters JJ, et al : The mitochondrial permeability transition in toxic, hypoxic and reperfusion injury. Mol Cell Biochem ; 174:159,1997

Lin DG, Kenny DJ, Barrett EJ, Lekic P, McCulloch CAG: Storage conditions of avulsed teeth affect the phenotype of cultured human periodontal ligament cells. J Periodont Res 2000; 35:42-50

Lindskog S, Blomlof L : Influence of osmolarity and composition of some storage media on human periodontal ligament cells. Acta Odontol Scand 40: 435-41,1982.

Litwin J, Lundquist G, Soder PO: Studies on long-term maintenance of teeth and viable associated cells in vitro. Scand J Dent Res ;79:536-9, 1971.

McCulloch CAG : Basic considerations in periodontal wound healing to achieve regeneration . Periodontol 2000; 1:16-25,1993.

McCulloch CAG, Knowles G : Discrimination of two fibroblast progenitor population in early explant cultures of hamster gingiva. Cell Tissue Res;264:87-94, 1991.

Modeer T, Dahllof, Otteskog P : Effect of drying on human periodontal ligament repair in vitro. J Int Assoc Dent Child;15:15-20,1984

Morris ML, Moreinis AR, Prestup A : Factors affecting healing after experimentally delayed tooth transplantation. J Endod;7:80-4,1981.

Mosmann T : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 65: 55-63,1983.

Narayanan AS, Page RC : Connective tissues of the periodontium : a summary of current work. Coll Rel Res;3:33-64, 1983

Papazisis, K. T., Geromichalos, G. D., Dimitriadis, K. A. and Kortsaris, A. H. : Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. J. Immunol. Methods;208: 151, 1997.

Patel S, Dumsha TC, Sydiskis RJ : Determining periodontal ligament cell vitality from exarticulated teeth stored in saline or milk using fluorescein diacetate. Int Endod J;27(1):1-5:1994.

Schour J, Massler M : The teeth. In : *The Rat in Laboratory Investigation*. 2nd edn, eds E.J. Farris and J. Q. Griffith. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1949

Schwartz O: Cryopreservation as long-term storage of teeth for transplantation or replantation. Int J Oral Maxillofac. Surg 15:30-32, 1986.

Schwartz O, Andreasen JO: Cryopreservation of mature teeth before replantation in monkeys (1).Effect of different cryoprotective agents and freezing devices. Int J Oral Surg 12:425-436, 1983.

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.

Skoglund A, Tronstad L : Pulpal changes in replanted and autotransplanted immature teeth of dogs. J Endod;7:309-16, 1981.

Soder PO, Otteskog P, Andreasen JO, Modeer T: Effect of drying on viability of the periodontal membrane. Scand J Dent Res 85: 174-186,1977.

Trope M, Friedman S: Periodontal healing of replanted dog teeth stored in Viaspan, milk and Hank's balanced salt solution. Endod Dent Traumatol 8 : 183-188.1992.

Trope M, Yesilsoy C, Koren L, Moshonov J, Friedman S : Effect of different endodontic treatment protocols on periodontal repair and root resorption dog teeth. J Endod;18(10):492-6, 1992.

Van Den Munckhof RJM, Vreeling-Sinderarova H, Schellens JPM, Frederiks WM : Localization of uric acid oxidase activity in core and matrix of peroxisomes as detected in unfixed cryostst sections of rat liver unfixed. J Histochem Cyto-chem; 42: 177-183,1994.

사진부도 설명

Fig 4. Serial section view from apex to cervical portion in the immediate group

Fig 5. Serial section view from apex to cervical portion in the 60 minute time –
lapse group

Fig 6. Representative view after MTT staining in the immediate group

Fig 7. Representative view after MTT staining in the 10 minute time – lapse
group

Fig 8. Representative view after MTT staining in the 20 minute time – lapse
group

Fig 9. Representative view after MTT staining in the 40 minute time – lapse
group

Fig 10. Representative view after MTT staining in the 60 minute time – lapse
group

Fig 11. Representative view of the frozen section after MTT staining

Fig 12. Cementocytes & cementoblasts in the frozen section surface

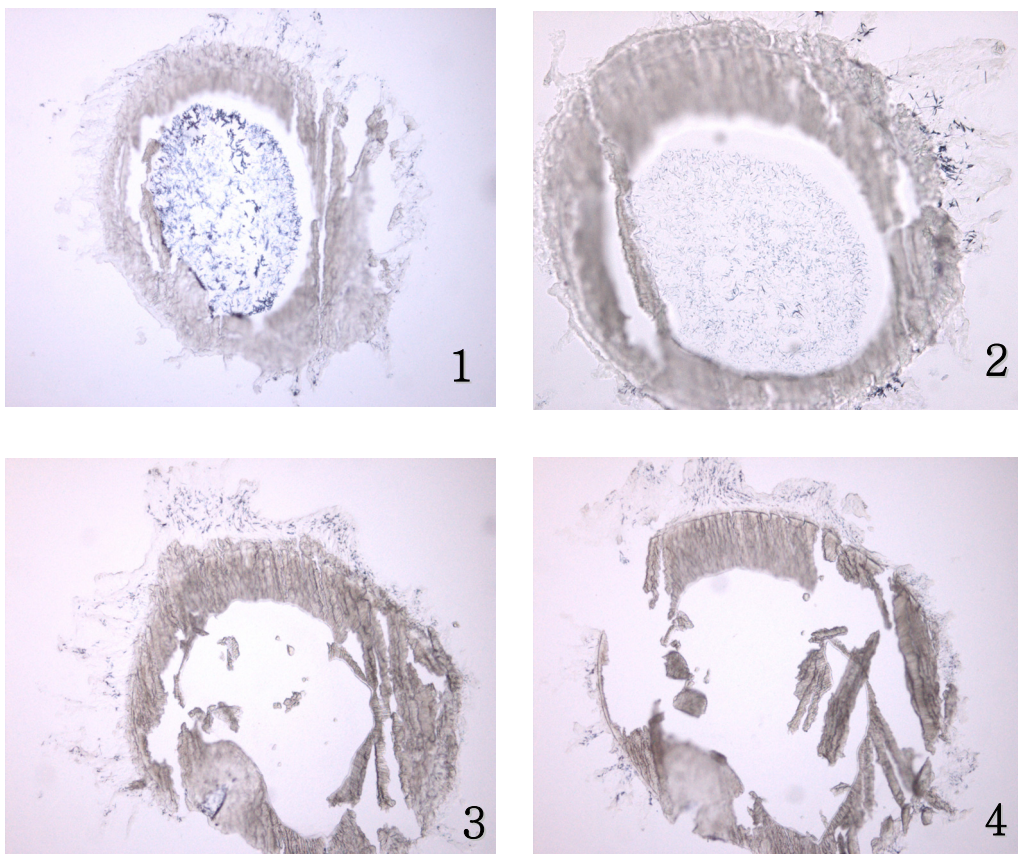


Fig 4

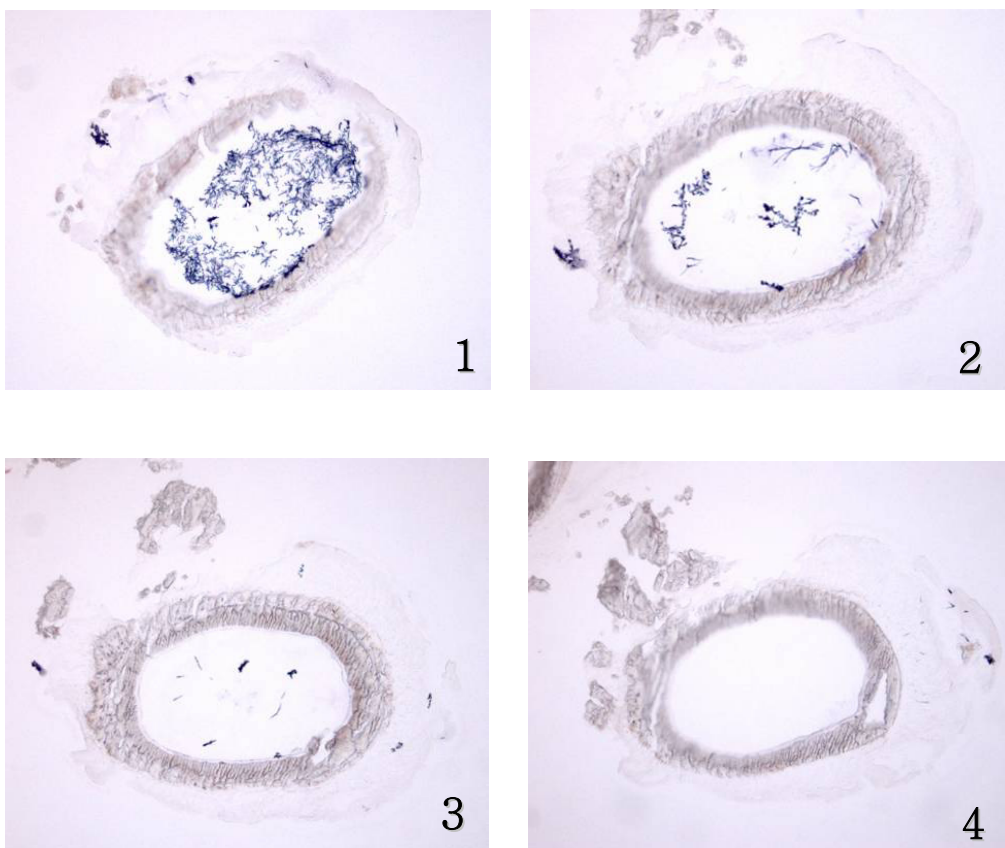


Fig 5

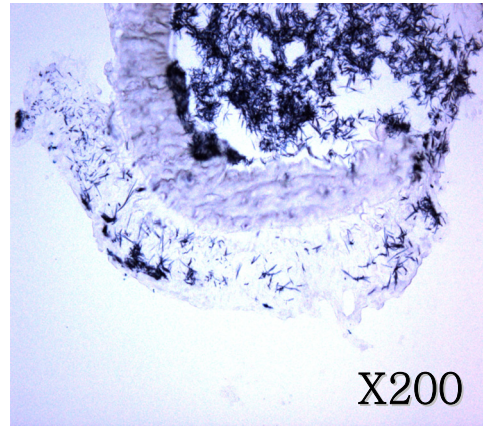
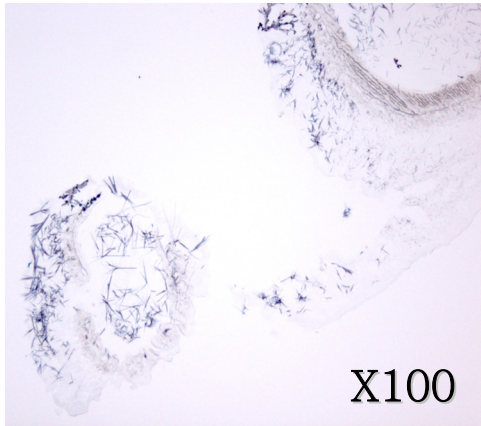


Fig 6

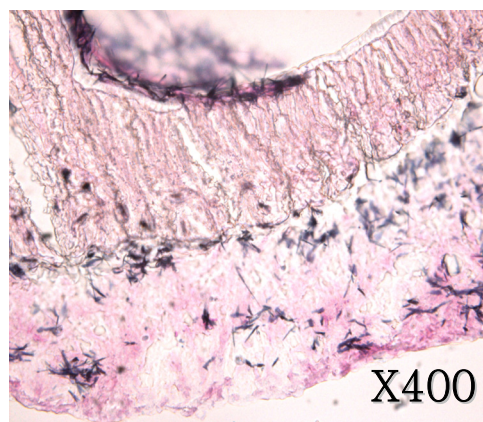
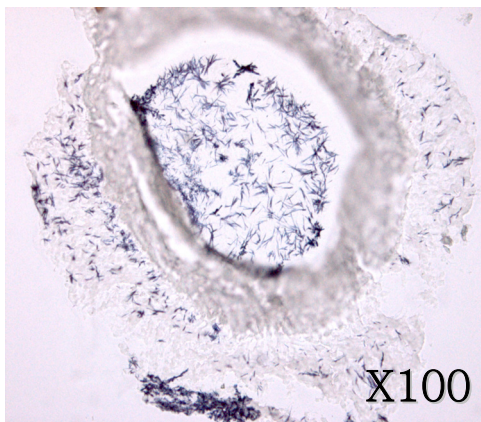


Fig 7

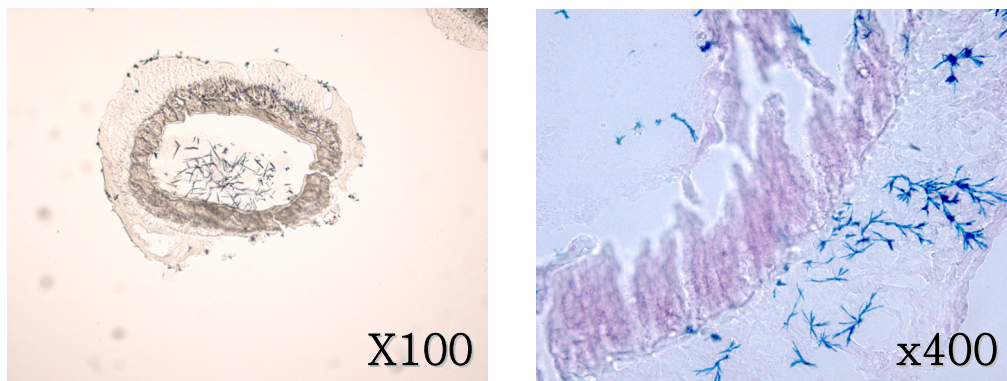


Fig 8

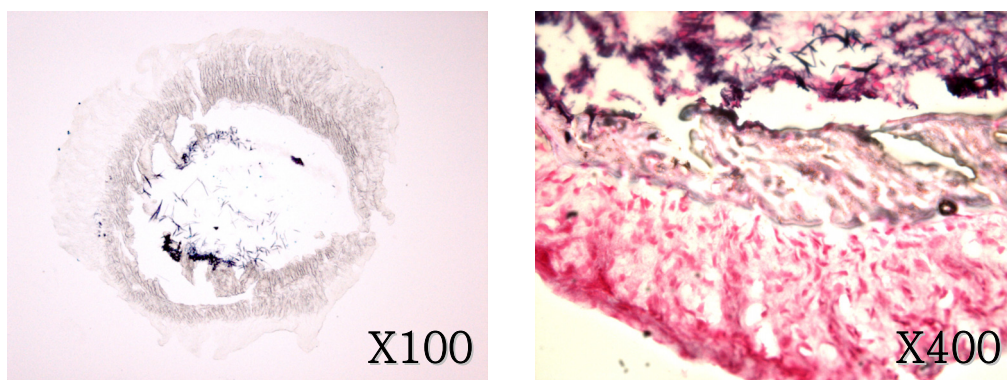


Fig 9

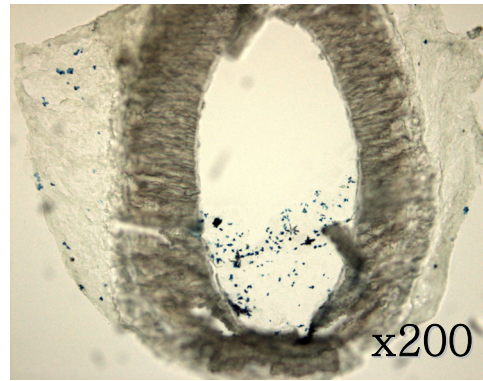
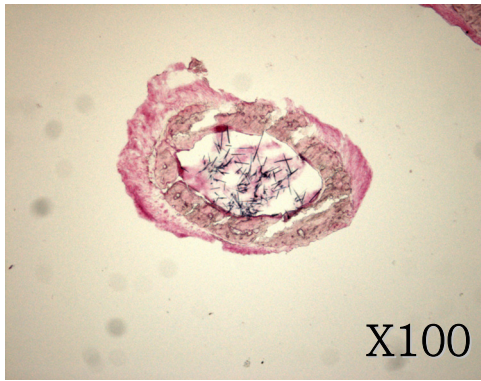


Fig 10

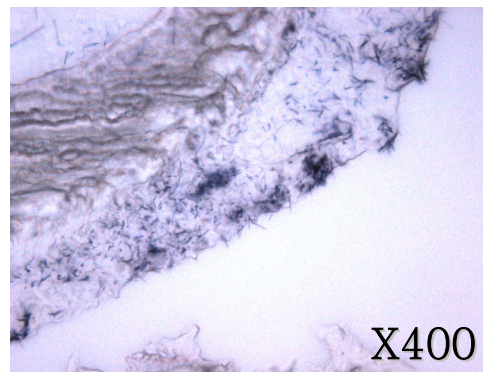
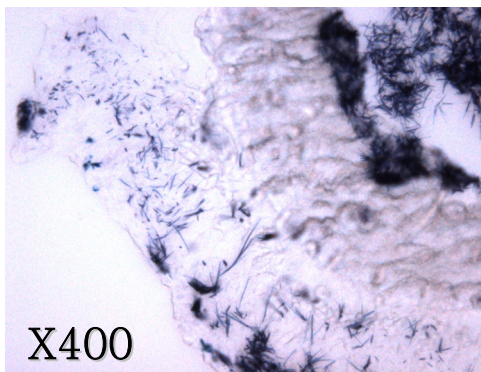


Fig 11

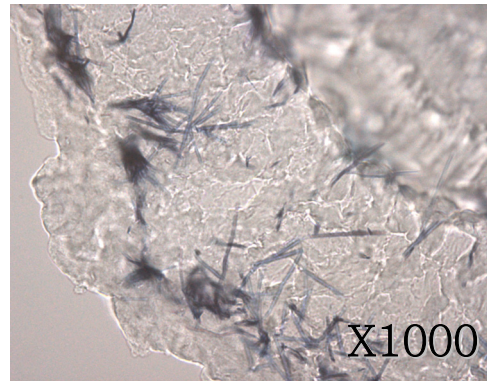
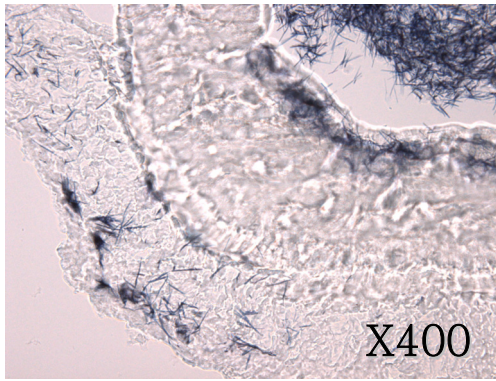


Fig 11

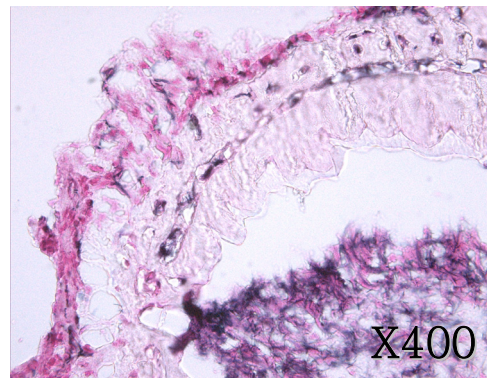
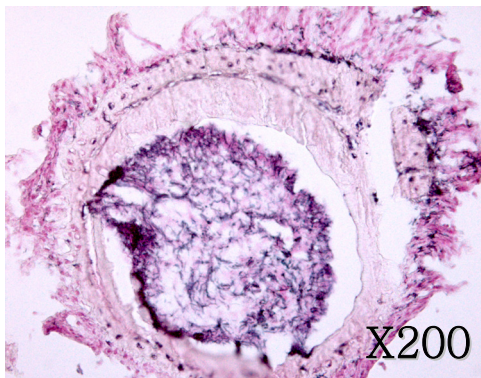


Fig 12

Abstract

Evaluation of periodontal ligament cell viability in rat teeth according to various extra-oral dry time using MTT assay and a histologic verification

In Soo Jeon

Department of Dentistry

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Seung-Jong Lee)

The purpose of this study was to verify the usefulness of MTT analysis as a tool of measurement of the periodontal ligament cell viability from the extracted rat molar directly on the exact time of time-lapse and simulatly compared with histologic observation of frozen sections and by comparing MTT assay values with the direct histological examination of frozen sections of rat tooth root surface, the appropriateness of using MTT assay values in evaluating the PDL cell viability was verified.

A total of 80 Sprague-Dawley white female rat of 4 week-old with a body weight of 100 grams were used. The maxillary left and right, first and second molars were atraumatically extracted under ketamine anesthesia. Twenty-four teeth of each group(divided as five groups depending upon the time-lapse after extraction such as immediate, 10, 20, 40 and 60 minutes)were immersed in 200 μ l of MTT solution(0.5mg/ml) in each well of 96-well plate . Another 10 teeth of each group were treated as same as above and 10 μ m thick frozen sections from maxillary first and second molars were prepared, and then observed with optical microscope.

The value of optical density obtained after MTT analysis was divided by the value of hematoxylin-eosin staining for the standardization. This divided value showed significant difference between groups with less than 10 minute time-lapse and subsequent groups ($p < 0.05$). Histological findings of periodontal ligament cell, after being stained with MTT solution and being cryosectioned, also showed significant difference in crystal shape and crystal number between groups with less than 10 minute time-lapse and subsequent groups. Optical density after hematoxylin-eosin staining showed significant difference between

first and second molar, but didn't show meaningful difference between same molar in each group ($p < 0.05$).

These data indicate that MTT analysis is one of the efficient methods for the evaluation of the periodontal ligament cell viability and it will be helpful for the improvement of storage solutions and method, which determines the viability of periodontal ligament cell.

Key words: periodontal ligament cell, viability, MTT analysis, cryosection