

구강상피세포의 냉동보관 방법에 따른
세포생존률 비교

연세대학교 대학원

치의학과

백도영

구강상피세포의 냉동보관 방법에 따른
세포생존률 비교

지도 김 의 성 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2009년 6월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

백 도 영

백도영의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2009년 6월 일

감사의 글

과연 잘 할 수 있을까 걱정도 많이 했었던 실험이었지만 정말 많은 분들의 도움으로 석사 학위 논문이 나오게 되었습니다. 우선 전혀 갈피를 잡지 못했던 저에게 논문의 준비단계에서부터 끝까지 세심한 지도를 하여 주신 김의성 지도 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 옆에 계신 것 만으로도 큰 힘이 되어 주시는 이승중 교수님, 실수 투성이었던 저의 논문을 정성스럽게 고쳐 주신 정한성 교수님께도 깊은 감사를 올립니다.

항상 수련의들에게 깊은 사랑과 관심을 가져 주시며 저희를 이끌어주시는 이찬영 교수님, 노병덕 교수님, 박성호 교수님, 정일영 교수님, 박정원 교수님, 신수정 교수님, 공형규 교수님께 감사드립니다.

매일같이 이것저것 물어봐도 정성스럽게 답해주신 이영은 선생님과 조직학 교실 곽성욱 선생님, 불평 불만 없이 기쁜 마음으로 제 실험을 도와준 윤태선 선생님께도 고마운 마음을 전합니다.

끝으로 항상 저를 믿어주시고 사랑으로 돌봐주시는 부모님, 저에게 격려와 응원을 아끼지 않는 동생 진욱, 힘들 때 마다 웃을 수 있게 해주었던 사랑 하는 차수진에게도 감사의 마음을 전합니다.

차 례

| | |
|---------------------------------------------|-----|
| 그림 차례 | ii |
| 표 차례 | iii |
| 국문 요약 | iv |
| I. 서론 | 1 |
| II. 재료 및 방법 | 5 |
| 1. 실험 대상 및 전 처치 | 5 |
| 2. 실험 방법 | 5 |
| 2-1. Cell counting | 11 |
| 2-2. WST-1 standard curve 및 각 실험군의 WST-1 측정 | 11 |
| 2-3. Clonogenic capacity | 12 |
| III. 결과 | 14 |
| 1. Cell counting | 14 |
| 2. WST-1 standard curve 및 각 실험군의 WST-1 측정 | 15 |
| 3. Clonogenic capacity | 16 |
| IV. 고찰 | 18 |
| V. 결론 | 28 |
| VI. 참고 문헌 | 30 |
| VII. 부록 | 41 |
| 영문 요약 | 43 |

그림 차례

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1. Monolayer epithelial cell that origin of oral, lower gingiva | 5 |
| Figure 2. 1°C/min freezing container“Mr. Frosty” | 7 |
| Figure 3. Schematic diagram of program freezer with pressure vessel | 10 |
| Figure 4. Cell counting by hemacytometer slide and trypan blue | 11 |
| Figure 5. Standard curve of WST-1 using monolayer epithelial cell(YD-38) | 15 |
| Figure 6. Clonogenic capacity of experimental groups | 17 |
| Figure 7. Schematic of physical events in cells during freezing | 21 |

표 차례

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 1. The averages and standard deviations of viable cell number ···· | 14 |
| Table 2. The Median and IQR of optical density of WST-1 ·········· | 16 |
| Table 3. The Median and IQR of the number of colonies ·········· | 17 |

국문 요약

구강상피세포의 냉동보관 방법에 따른

세포생존률 비교

본 연구의 목적은 구강상피세포를 배양한 후 일반적인 세포 냉동 보존법, 저속 냉동 보존법, 급속 냉동 보존법, 2Mpa, 3Mpa 의 압력을 이용한 저속 냉동 보존법으로 6 일간 냉동 보존 시 각 냉동 보존법에 따른 세포의 활성도를 Cell counting, WST-1, Clonogenic capacity 의 방법을 이용하여 비교 평가하기 위함이다. 구강 내 하악 치은에서 기원한 단층의 상피세포를 배양하여 $6 \times 10^6 \sim 7 \times 10^6$ 개의 세포가 확보되면 각각의 실험군당 1×10^6 개의 세포를 다음의 방법으로 6 일간 냉동 보존한다. 세포를 freezing container 에 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, 2MPa 의 압력을 가하고 $-0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ 속도로 4°C 에서 -35°C 까지 서서히 냉동시킨 뒤 -196°C 에 냉동한 2MPa 압력 저속 냉동 보존군, 3MPa 의 압력을 가하고 $-0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ 속도로 4°C 에서 -35°C 까지 서서히 냉동시킨 뒤 -196°C 에 냉동한 3MPa 압력 저속 냉동 보존군으로 나누었다. 보존액은 세포를 분양 받을 때와 같은 Media (10%FBS + 90%RPMI)를 사용하였고 동해방지제로 5% DMSO 를 사용하였다. 6 일 후

냉동되었던 세포를 급속 해빙하여 각각의 Cell counting, WST-1, Clonogenic capacity 값을 측정하여 비교하였다.

1. Cell counting 에서 일반 냉동 보존법, 2Mpa 압력 저속 냉동법, 3Mpa 압력 저속 냉동법이 저속 냉동법과 급속 냉동법에 비해 통계적으로 유의차 있게 높은 세포수를 나타내었다($p < 0.05$). 2Mpa 압력 저속 냉동법은 3Mpa 압력 저속 냉동법, 일반적인 냉동 보존법에 비해 높은 세포수를 나타냈으나 통계적인 유의차는 없었다.

2. WST-1 검색에서는 2Mpa 압력 저속 냉동법이 저속 냉동법과 급속 냉동법에 비해 통계적으로 유의차 있게 높은 흡광도를 나타내었다($p < 0.05$).

2Mpa 압력 저속 냉동법은 3Mpa 압력 저속 냉동법, 일반적인 냉동 보존법에 비해 높은 흡광도를 나타냈으며 3Mpa 압력 저속 냉동법, 일반적인 냉동 보존법이 저속 냉동법과 급속냉동법에 비해 높은 흡광도를 나타냈으나 통계적인 유의차는 없었다.

3. Clonogenic capacity 에서는 2Mpa 압력 저속 냉동법이 저속 냉동법과 급속 냉동법에 비해 통계적으로 유의차 있게 높은 집락수를 나타내었다($p < 0.05$).

2Mpa 압력 저속 냉동법은 3Mpa 압력 저속 냉동법, 일반적인 냉동 보존법에 비해 높은 집락수를 나타냈으며 3Mpa 압력 저속 냉동법, 일반적인 냉동

보존법이 저속 냉동법과 급속냉동법에 비해 높은 집락수를 나타냈으나 통계적인 유의차는 없었다.

위의 결과를 통해 구강상피세포에서 2Mpa 혹은 3Mpa의 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.

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

구강상피세포의 냉동보관 방법에 따른 세포생존률 비교

<지도교수: 김 의 성>

연세대학교 대학원 치의학과

백 도 영

I. 서론

자가치아이식은 이용 가능한 공여치(donor tooth)가 있을 때 소실된 치아를 수복하는 치료의 한 방법으로, 같은 종의 동일 개체 내에서 치아를 원래의 위치에서 다른 위치로 이식하는 것을 의미한다(Guralnick, Shulman 1962). 이러한 자가치아이식은 생리적인 치주 인대가 재생되어 자연치와 유사한 기능을 유지할 수 있고 성장기 환자에서도 자연치와 같은 수준으로 기능이 회복될 수 있으며 비용과 시간의 감소 등의 장점으로 소실된 치아를 수복하는 방법으로 이용되고 있다. 자가치아이식의 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 최소화 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 연구가 있어왔지만 아직 완전한 기전이 밝혀지지 않았다. 이러한 냉동 보존법에서는 냉동속도(cooling rate)에 따라 세포의 생존율이 달라진다. Mazur 등은 얼음 결정 형성과 용질 농도 효과(solution concentration effect) 는 세포의 불활성화를 유발한다고 하였고 적절한 냉동속도(cooling rate)는 각 효과를 최소화 시킬 것이라고 하였다.

최근 일본에서는 미소 자장을 이용한 프로그램 냉동고(Cell Alive System)를 이용하여 세포와 냉동 보존액 전체를 동시에 냉동하게 하는 시도가 있었다 (Kawata, 2005, Kaku, 2007). 이 특수한 자장 냉동고를 사용하여 Kawata 는 쥐 치아를 15mA 자기장으로 $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 속도로 -30°C 까지 3 일간 냉동 보관했을 때 급속 냉동을 하는 것보다 좋은 결과를 얻었다고 보고하였다. 하지만 Ahn(2008)등은 쥐 치아를 $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 속도로 -20°C 까지 21.7mA,

60Hz, 1G 의 자기장을 이용하여 프로그램 냉동을 시도하였으나 급속, 저속 냉동한 군 사이에 유의한 차이는 없다고 보고하였다.

또 다른 접근법으로 고압 하에서 냉동시킴으로써 세포의 손상을 줄이고자 하는 방법이 연구되었다. 특히 식품공학 분야에서 고압 하에서 냉동 시킴으로써 세포의 손상을 줄이는 방법들이 연구되어 왔다. Koch 등은(1996) 감자 입방체의, Fuchigami 는 당근의 조직학적 연구에서 식품 고압 냉동 방법 (Pressure Shift Freezing, Pressure Assist Freezing)을 통해 보관 시 일반적인 얼림 방법에 비해 세포의 손상이 적음을 보고한 바 있다.

의학 분야에서도 고압 하에 냉동보관을 통해 세포손상을 줄이려는 시도가 있었다. Pribenszky (2005) 는 쥐를 이용한 생체 내 실험(2005a) 과 소의 난포를 이용한 실험(2005b)에서 고압(High hydrostatic pressure) 전 처치가 냉동보관을 용이하게 하며 생존률을 증가시킨다고 보고 하였다. 또한 이러한 전처치를 통해 냉동시킨 수태지와 황소의 정자가 해빙 된 후 운동력과 번식력이 증가하였다(Kuo,2007; Pribenszky 2005).

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 사용된다(Berridge, 1996). 이 방법은 MTT 와는 다른 약한 붉은 색의 tetrazolium salts(WST-1)을 세포 내 미토콘드리아 탈 수소 효소가 분해하여 진한 붉은 색의 formazan 결정으로 환원시키는 원리를 이용하며 450nm 의 파장에서 흡광도를 측정한다. 이 흡광도는 살아있는 세포에 의해

WST-1 이 환원된 양을 나타내며 생존세포 수와 비례한다. WST-1 검색법은 동위원소를 사용하지 않으며 시약을 녹이기 위한 유기용매를 사용하지 않아 안전하며 동일 계통의 기질인 MTT 가 비 수용성의 formazan 결정으로 환원시키는 데 반해 WST-1 은 수용성 formazan 결정으로 환원시켜 추가적인 단계 없이 측정할 수 있으므로 고감도의 결과를 보장하여 MTT 보다 민감도가 뛰어나다(Alotto, Ariotti, 2002).

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

이에 본 연구의 목적은 구강상피세포를 배양하여 일반적인 세포 냉동 보존법, 저속 냉동 보존법, 급속 냉동 보존법, 2Mpa, 3Mpa 의 압력을 이용한 저속 냉동 보존법으로 6 일간 냉동 보존 시 각 냉동 보존법에 따른 세포의 활성도를 비교 평가 하기 위함이다. 이를 위해 cell counting, WST-1, clonogenic capacity 의 방법을 이용하여 각각의 실험 군에 따른 세포의 활성도를 비교 평가한다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험 대상 및 전 처치

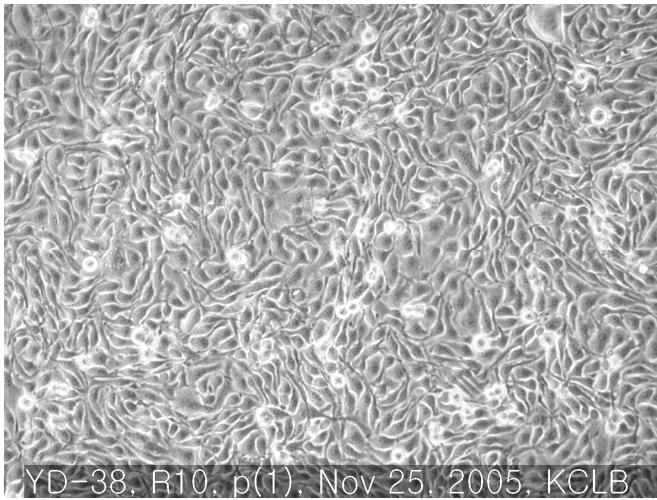


Figure 1. Monolayer epithelial cell that origin of oral, lower gingiva

한국 세포주 은행 (Korean Cell Line Bank)로부터 구강 내 하악 치은 기원의 단층 상피 세포(YD-38) (fig.1)를 분양 받아 세포 배양 후 P1, P2, P3, P4 으로 계대하여 각각의 cell stock 을 5 개씩 만들었다.

2. 실험 방법

실험에 사용한 보관 용액인 media 는 KCLB media 인 RPMI 1640 with L-glutamine (300mg/L), 25mM HEPES and 25mM NaHCO₃, 90%; heat inactivated fetal bovine serum (FBS), 10% 이용하였다. 냉동 시 세포질 내

동해방지제로는 5% dimethylsulfoxide(DMSO, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였다.

<Cell culturing>

먼저 stock 으로 보관되어있던 냉동세포를 37℃ 수욕조에 급속 해동시켰다. 15ml 원통 튜브에 4ml 의 Media(90%RPMI+ 10%FBS)를 1ml 의 세포 부유액과 섞어 원심 분리한 후 냉동보관 시 쓰였던 DMSO 용액을 제거하였다. 다시 Media(90%RPMI+ 10%FBS)를 섞은 후 15 회 pipetting 하여 세포가 고루 분포하도록 하였다. 이후 100mm² petridish 에 Media (90%RPMI+ 10%FBS)와 세포 부유액 혼합액이 10mm² 의 부피가 되도록 하여 incubator 에 보관하였다. Media(90%RPMI+ 10%FBS)는 2~3 일에 한번씩 교체하였다. 세포를 해동하여 incubator 에 배양한지 약 3 일정도 후에 monolayer 가 약 70%정도 덮이는데 이때 세포를 계대하였다. 세포 계대 방법은 먼저 incubator 에 보관되었던 petri dish 를 PBS 5ml 로 2 회 세척 후 trypsin 2ml 를 약 2~3 분 처리 후 petridish 에 부착된 세포를 떨어뜨려 다시 3ml 의 Media (90%RPMI + 10%FBS)와 혼합하여 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층부를 흡입하여 세포만 남겨둔 상태에서 3ml 의 Media(90%RPMI + 10% FBS)를 혼합하여 pipetting 하였다. Media (90%RPMI+ 10%FBS)가 8.5ml 씩 담겨진 2 개의 100mm² petridish 에 세포 부유액을 1.5ml 씩 나누어 담아 계대를 마쳤다. 이와 같이 세포를 배양하여 약 6x10⁶~7x10⁶ 개의 세포가 준비되면 각각의

실험 균의 조건에 따라 냉동보존을 시작하였다. 실험시에는 항상 같은 계대의 세포를 이용하였다.

가. 실험군 분류

대조군으로는 한국 세포주 은행에서 배양 때 쓰였고 세포의 stock 을 만들 때 썼던 Freezing container 를 이용한 일반적인 세포보존법을 이용하였다.

1 군: 대조군 (Freezing container 와 Isopropyl alcohol(nalgene " Mr. Frosty") 을 이용한 일반 세포보관법)

1×10^6 /ml 의 cell suspension 1ml 를 2ml 용량의 vial 에 담아 Freezing container(fig2.“Mr.Frosty”,NALGENE[®] Labware)를 이용하여 -70°C 까지 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 냉동속도로 냉동 후 -196°C 의 nitrogen liquid 에 넣어 6 일간 보관하였다.

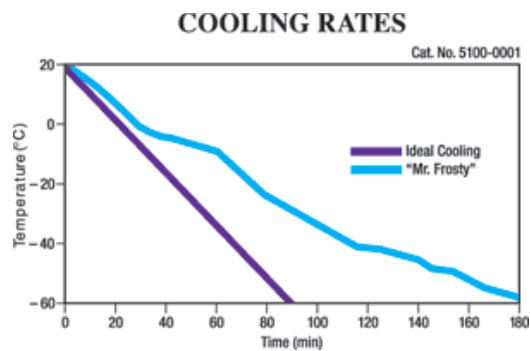


Figure.2 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ freezing container “Mr. Frosty”

2 군: 저속 냉동군

$1 \times 10^6/\text{ml}$ 의 세포 부유액 1ml 를 2ml 용량의 vial 에 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 6 일간 보관하였다

3 군: 급속 냉동군

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

4 군: 2MPa 압력 저속 냉동군

$1 \times 10^6/\text{m}$ 의 세포 부유액 1ml 를 2ml 용량의 vial 에 담아 압력통(fig3. 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 2MPa 로 가하고 4°C 에서 -35°C 까지 $-0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ 로 서서히 냉동시킨 뒤 -196°C 액화질소 냉동고에 넣어 6 일간 보관하였다.

5 군: 3MPa 압력 저속 냉동군

$1 \times 10^6/\text{ml}$ 의 cell suspension 1ml 를 2ml 용량의 vial 에 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 3MPa 로 가하고 4℃에서 -35℃까지 -0.5℃/min 로 서서히 냉동시킨 뒤 -196℃ 액화질소 냉동고에 넣어 6 일간 보관하였다.

나. 냉동군의 해빙 방법

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

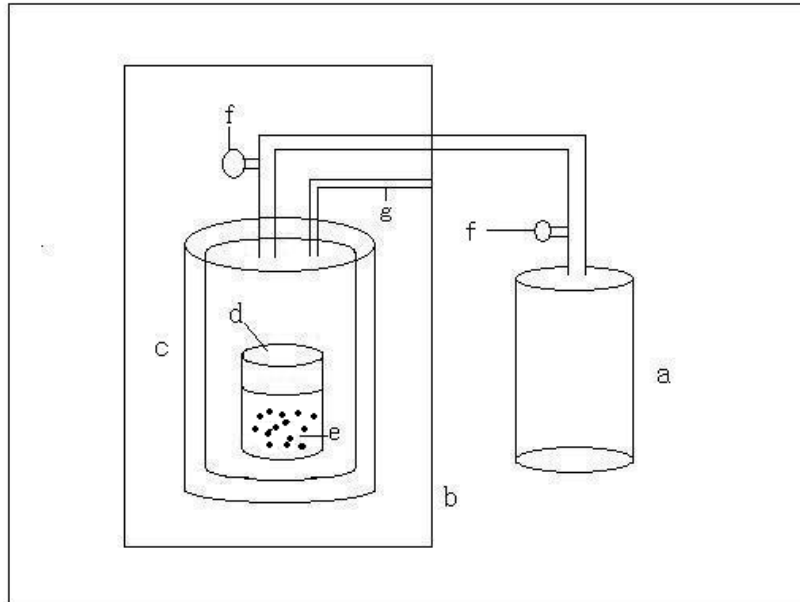


Figure 3. Schematic diagram of program freezer with pressure vessel.

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

2-1. Cell counting

Eppendorf tube 에 각 군의 세포 부유액 50 μl 과 trypan blue 50 μl 를(1:1) 섞은 혼합액을 만들어 5 분간 기다린 뒤 hemocytometer 의 cover glass 를 덮고, 혼합액 10 μl 를 취하여 fig4.과 같이 hemocytometer 의 홈에 위치시킨 후 현미경 100x 배율에서 세포를 관찰하여 계산하였다.

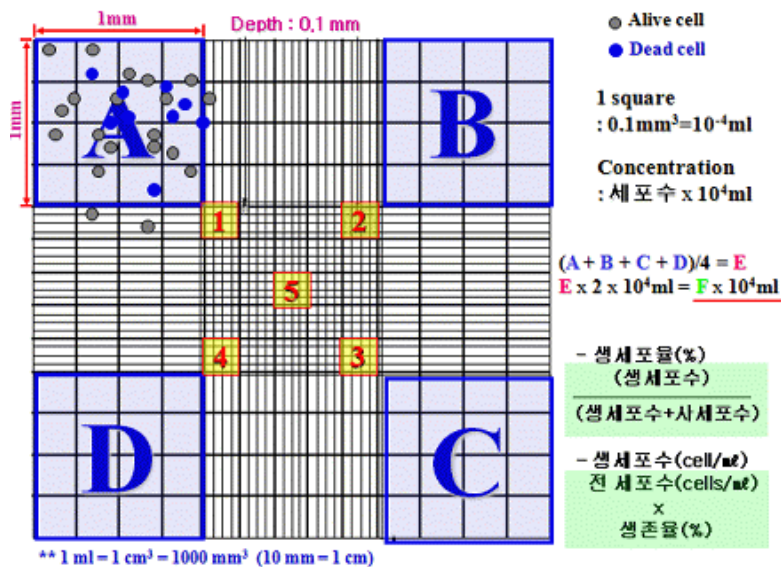


Figure 4. Cell counting by hemacytometer slide and trypan blue

2-2. WST-1 standard curve 및 각 실험군의 WST-1 측정

먼저 WST-1 standard curve 를 완성하기 위해 실험 군과는 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 plate 에 각각 3 개의 well 에 넣는다. 24 시간 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 plate 를 싸서 4 시간 동안 37°C incubator 에 배양하였다. 4 시간 후 Dynatech MRX ELISA microplate reader (Dynatech laboratories, Chantilly, VA, USA)에 넣고 450nm 파장에서 흡광도를 측정하여 각각의 세포 수와 WST-1 의 값을 비교하여 standard curve 를 완성하였다.

각 실험 군의 처리가 끝난 뒤에 96-well plate 에 5×10^4 개의 cell 을 각 실험군당 3 번씩 well 에 넣었다. 24 시간 뒤 96-well plate 를 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 plate 를 싸서 4 시간 동안 37°C incubator 에 배양하였다. 4 시간 후 Dynatech MRX ELISA microplate reader (Dynatech laboratories, Chantilly, VA, USA)에 넣고 450nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

2-3. Clonogenic capacity

각각의 군당 2 개의 petridish (100mmx20mm)에 10ml media (10%FBS + 90%RPMI)를 넣고 10^3 개의 세포를 골고루 분포하도록 하였다. 10 일 뒤 상층부의 media 를 제거 후 5ml의 PBS 로 2회 세척하여 4% formalin 5ml 를 dish 에 넣고 10 분 간 고정 시켰다. Formalin 을 제거 후 Giemsa stain 과

PBS를 1:1로 mix한 solution 5ml를 넣고 물로 wash 후 건조하여 푸른색으로 염색된 colony 수를 측정하였다.

3. 통계처리

대조군과 각 실험군에서 cell counting 에서 얻은 값은 One way ANOVA 를 사용하여 분석하였으며 사후 검정으로는 Tukey test 를 이용하였다. WST-1 검색 및 Clonogenic capacity 검색을 통한 colony 수는 Kruskal-Wallis One Way ANOVA 를 사용하여 분석하였으며 사후 검정으로는 Dunn's method 를 이용하였다.

II. 결과

1. Cell counting

1 군, 4 군, 5 군은 각각 2 군과 3 군에 비해 통계적으로 유의차 있게 높은 값을 나타냈으며($p < 0.05$) 4 군은 1 군과 5 군에 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%, 2Mpa 압력 저속냉동은 약 37%, 3Mpa 압력 저속냉동은 24%의 세포 생존율을 나타냈다.

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

| 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 2MPa pressure) | 5.569 ^a | 0.095 |
| Group5(Slow freezing under 3MPa pressure) | 5.391 ^a | 0.055 |

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

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

WST-1 의 standard curve 는 가로축이 세포 수를 나타내며 세로축이 WST-1 의 optical density 를 나타낸다. Fig.5 의 standard curve 에서 보듯이 세포가 증가함에 따라 optical density 가 증가하는 양상을 나타낸다.

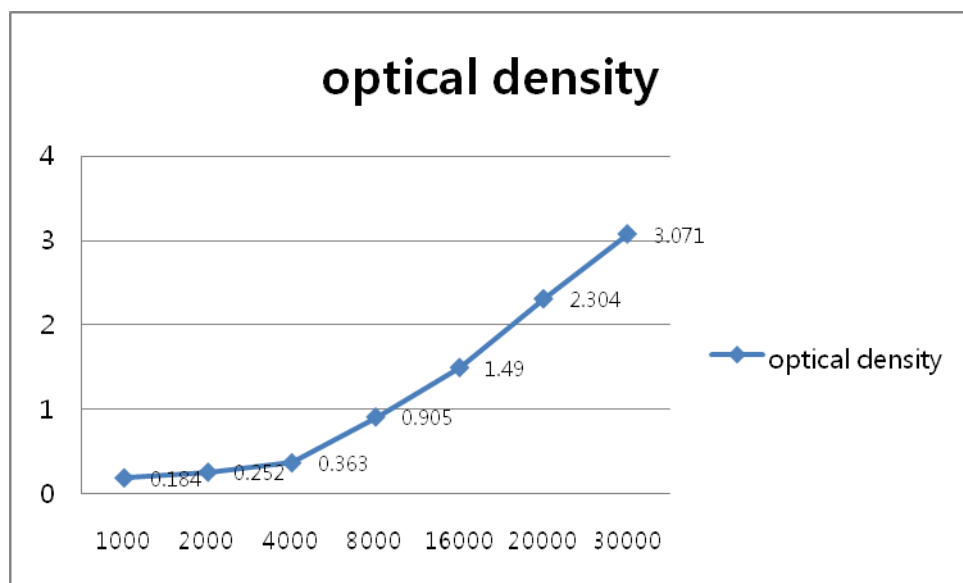


Figure 5. Standard curve of WST-1 using monolayer epithelial cell (YD-38) 6 일 동안 냉동 보관했던 각 실험 군의 WST-1 값을 측정 하였다. 2 회의 실험에서 측정된 WST-1 값은 총 6 개로 이의 중앙값(median)은 표 2 와 같다. 4 군이 2 군과 3 군에 비해 통계적으로 유의차 있게 높은 값을 나타내었다($p < 0.05$). 4 군은 1 군과 5 군에 비해 높은 값을 나타냈으나 통계적인 유의차는 없었다. 또한 1 군과 5 군이 2 군과 3 군에 비해 높은 값을 나타냈으나 통계적인 유의차는 없었다.

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 2MPa pressure) | 1.083 ^a | 0.478 |
| Group5(Slow freezing under 3MPa pressure) | 0.544 ^{ac} | 0.218 |

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

3. Clonogenic capacity

Fig 6 와 같이 colony 가 형성된 부위는 Giemsa 에 염색이 되어 counting 이 가능하였다. 형성된 colony 수는 4 군이 2 군과 3 군에 비해 통계적으로 유의차 있게 높은 값을 나타내었다($p < 0.05$).

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

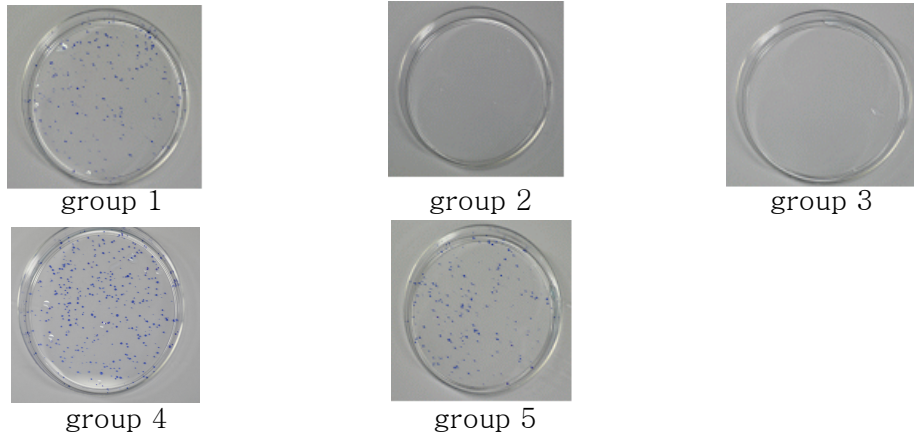


Figure 6. Clonogenic capacity of experimental groups

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 2MPa pressure) | 262 ^a | 312.5 |
| Group5(Slow freezing under 3MPa pressure) | 140 ^{ac} | 116 |

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

IV. 고찰

미성숙치아의 자가 치아 이식은 결손치의 치료에 있어서 다른 치료에 비해 좋은 결과를 나타낸다(Czochrowska et al. 2002; Jonsson and Sigurdsson 2004). 그러나 자가치아 이식을 위한 이상적인 상황이 항상 존재하는 것은 아니다. 예를 들어 치근형성이 자가 치아 이식에 적당하게 이루어졌으나 수여부가 너무 작아 공간을 얻기 위해 교정적인 치료가 필요할 때가 있다. (Andreasen,1992). 다른 예로 교정적인 목적으로 소구치를 발치 하는 경우 외상으로 인한 불확실한 예후를 지닌 전치부에 유용하게 쓸 수 있지만 외상의 시기와 교정의 시기가 일치하지 않는 경우가 대부분이라 발치한 치아는 쓰지 못하는 경우가 많다. 이런 경우 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. 오래 전부터 냉동보존(cryopreservation)이 세포의 장기간 유지에 이용 되었는데 이러한 냉동 보존 시 세포의 냉동으로 인한 손상(cryoinjury)의 기전을 명확히 하는 것이 중요하다. 여러 관점, 특히 냉동속도(cooling velocity)와 동해 방지제(cryoprotectants)에서 이러한 문제를 접근하는 많은 연구들이 있다(Mazur, 1976).

-5℃까지는 세포와 보존액이 얼지 않고 과냉각된 상태로 존재하며 -5℃~-15℃사이에서는 세포 외부 보존액에 얼음이 형성 되나 세포질 내로의 얼음 결정 성장을 세포막이 방해하여 세포 내부는 여전히 과냉각된 상태로 존재한다. 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 속도로 제거되지 않는다. 따라서 세포는 과냉각 상태가 증가 하게 되고 결국 세포 내 얼음형성을 통해 평형을 얻게 된다 (Mazur 1990). Muldrew 와 McGann (1994)은 실험 모델에서 삼투압 파괴 이론으로 이를 설명하였다. 즉 냉동/해빙(freezing/thawing)동안 세포막을 통한 물의 흐름이 세포 내 얼음형성(intracellular ice formation)을 유발하여 세포에 손상을 줄 수 있다고 하였다. Diller and Cravalho(1970)은 세포 내 얼음 형성 온도와 세포 내 얼음 형성의 동태를 novel 현미경을 통해 관찰하였다. 대부분의 경우에서 세포 내 얼음 형성을 거쳤던 세포들은 사멸했다. (Farrant 1977; Fujikawa 1980; Muldrew and McGann 1994)

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. Lovelock(1957) 등은 높아진 용질의 농도와 세포 수축이 세포막의 지질-단백질 복합체 (lipid

-protein complexes)에 해로운 효과를 가져와 그러한 구조를 약화시키며 지질과 인지질의 손실을 가져온다고 하였다. Mazur (1972)는 이러한 용질의 농도에 따른 세포 손상을 “용질효과(solution effects)”라고 명명 하였다. Steponkus and Wiest (1979)는 “최대 세포 면적 이론(Maximum cell surface area hypothesis)”를 제안했다. 세포 수축이 비가역적인 막의 융합을 일으켜 세포막의 영역이 감소하여 등장성 상태로 되돌아 갔을 때 원래 정상 부피를 회복하기 전 세포가 분해된다고 하였다.

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(fig.7). 따라서 용질효과를 최소화시키며 세포 내 얼음형성이 일어나지 않을 때 적절한 냉동속도가 결정된다. 적절한 냉동 속도는 세포의 타입과 종류에 따라 다르다. Rapatz and Luyet (1968)은 인간의 적혈구 세포에서 냉동속도가 1000°C/min 에서 생존율이 가장 높다고 하였고 Thorpe (1976) 은 인간의 림프구에서 10°C/min 의 냉동속도에서 생존율이 높다고 하였다. Leibo(1978) 은 쥐의 난자 세포는 1°C/min 의 냉동 속도에서 생존율이 가장 높다고 보고한 바 있다. 포유류 조직 세포에서는 특별한 경우를 제외하고 일반적으로 1°C/min 의 냉동속도가 추천된다. 본 실험에서 구강 상피 세포가 저속 냉동과 급속냉동에서 좋지 않은 결과를 보이는 것은 적절한 냉동속도(optimal cooling rate)보다 너무 느리거나 너무 빠른 속도로 냉동이 일어났기 때문이라고 생각된다.

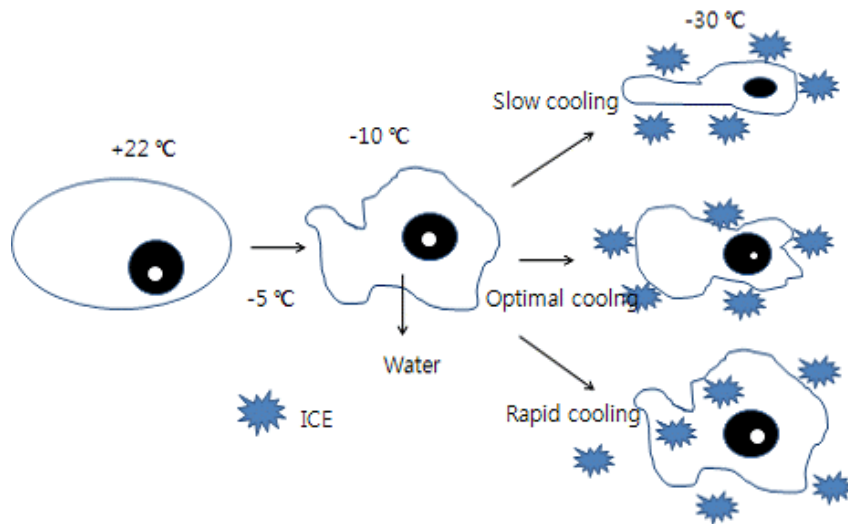


Figure 7. Schematic of physical events in cells during freezing.

냉동 보존 시 충분한 냉각을 통해 모든 액체 상태의 물이 결국 얼음이나 결정으로 변환되어야 한다. -45°C 이하가 되어야만 얼지 않은 작은 파편들이 자극 없이 얼음으로 변환될 수 있다(P. Mazur1984).

매우 낮은 온도에서 세포가 견디는 능력은 일반적인 생각보다 높다. 오히려 세포가 얼리고 녹일 때 두 번 지나야만 하는 온도의 중간지점(intermediate zone of temperature) ($-15^{\circ}\text{C} \sim -60^{\circ}\text{C}$)에서가 보다 치명적이다. -130°C 이하에서는 액체상태의 물의 존재 없이 물리적인 결정 상태로만 존재하여 확산이 일어나지 않는다. 또한 -196°C 에서는 열적 에너지가 없어 어떠한 화학 반응도 일어나지 않아 안정된 상태가 유지된다. (P. Mazur1984)

이에 본 실험에서는 "Mr. Frosty"라는 제품을 이용하여 1°C/min 의 냉동 속도를 적용 후 -75°C까지 얼린 후 -196°C의 nitrogen liquid 에 보관하여 YD-38 을 분양 받을 때와 동일한 조건으로 stock 을 형성 하였다.

쥐 치아를 이용하여 치주인대세포의 활성도를 연구한 실험들에서 프로그램 냉동 속도 조절기를 이용한 저속 냉동은 냉동으로 인한 손상을 줄일 수 있다는 연구가 있다(Kawasaki, 2004). Andreasen(1992)은 -35°C까지 -0.5°C/min 속도로 저속 냉동, -100°C까지 -6°C/min 속도로 냉동한 뒤 -196°C까지 급속 냉동할 것을 권하였고, Kawata(2005)와 Kaku(2007)는 쥐 치아를 자기장으로 -0.5°C/min 속도로 -30°C까지 3 일간 냉동 보관했을 때 좋은 결과를 얻었다고 하였으므로 본 실험에서도 프로그램 냉동속도 조절기를 사용하여 -35°C까지는 -0.5°C/min 속도로 저속 냉동하였다. -35°C 이하 온도에서는 세포 내부에 얼음결정이 생기지 않고(Ashwood-smith, 1980) 세포 외부의 냉동환경에 반응해서 세포가 수축하기 때문에 -196°C까지 빠르게 냉동할 수 있다고 (Ashwood-smith, 1980, Farrant, 1977) 보고되고 있으므로 -35°C 이하부터 -196°C까지는 액체 질소 통을 사용하여 급속 냉동을 시행하였다. 본 실험에서 저속 냉동 군의 cell counting, WST-1, clonogenic capacity 가 일반 냉동 보존군에 비해 낮은 경향을 보이는 것은 냉동 속도가 쥐 치아의 치주인대 세포와 달리 YD-38 세포에 적합하지 않게 느리게 작용하여 심한 부피 수축이 일어나고 장기간 높은 용질 농도에 노출되어 세포에 많은 손상을 주었을 것이라 생각된다.

냉동 시 세포의 생존율은 영하에 노출된 총 시간과는 무관하고 세포를 얼리는 방법에 있어 손상 정도가 차이가 난다. 세포를 -196°C 까지 얼릴 때 빠른 얼림과 천천히 녹이는 방법과 천천히 얼림과 빨리 녹이는 방법은 0°C 에서 -75°C 까지 비슷한 시간이 걸리나 전자가 세포에 손상이 더 많이 가게 된다. 이는 냉동속도가 빠르면 세포 내 크기가 매우 작은 얼음 결정체가 형성되고(Nei, 1978, Shimada, 1977) 세포 내 작은 결정이 응집하여 큰 결정을 형성하는 재결정화 현상이 일어나 세포가 손상을 받게 되기 때문이다(Mazur, 1984, 1972). 반면 Gao(2000)는 급속 해동을 하면 재결정화 현상을 막을 수 있으므로 많은 세포를 살릴 수 있다고 보고하여 본 실험에서는 급속 해동을 시행하였다.

몇 십 년 전부터 식품 공학 분야에서 고압이 식품의 수명을 줄이는 효소뿐 아니라 미생물을 비활성 시키는데 중요한 역할이 있다는 것이 소개되어 왔다(Knorr 1993). 식품을 냉동할 때 기존의 냉동 과정에서는 세포 표면에서 동결이 시작되어 내부로 갈수록 빙결정이 대형화하는 경향이 있고 표면 얼음이 성장함에 따라 내부의 얼지 않은 물 분자가 이동해 세포의 탈수가 일어나 얼음 결정의 크기는 크고 다양한 직경을 갖게 된다. 반면 210Mpa 고압 하에서는 물의 상변이 온도가 0°C 에서 -21°C 로 낮아지므로(Schluter, 2004) 고압을 준 상태에서 0°C 이하의 온도로 떨어뜨리면 과냉각 상태로 존재하다가 빠른 속도로 압력이 해소되면서 결정이 작고 균일하게 동시에 형성된다(Zhu 2004, 2005, Schluter 2004).

고압(High Hydrostatic Pressure)이 세포막의 수동 수송과 능동 수송을 포함한 세포 내 생화학적 반응과 세포의 단백질 운곽을 변화시키는 것이 증명되었다(Abe et al 1999, Aldridge and Bruner 1985, Huang 2007). 여러 다양한 스트레스 자극에 반응하여 heat shock protein (HSP) 가 형성되는데 고압에 의해서도 이러한 HSP 가 발생한다. 다양한 종류의 세포에서 압력에 의해 HSPs 의 합성이 증가한다. 압력에 의해 *Escherichia coli* (Welch et al.,1993), 효모 (Domitrovic et al.2006,Miura,2006), 포유류 세포 (Kaarniranta,1998)등에서 heat shock protein s(HSPs)의 합성이 증가한다는 보고가 있다. Kaarniranta(1998)는 고압이 후전사 활성화를 유도해 HSPs 70 의 생산을 유도한다고 하였고, Elo(2003)는 고압이 HSPs 90 β 의 생산을 유도한다고 하였다. HSPs 는 일종의 molecular chaperone 으로서 접힘, 세포 내 수송, 다른 단백질과의 합성 및 분해 등을 용이하게 함으로써 스트레스에 저항하는 역할을 한다. 이 HSPs 은 세포질 내 단백질의 형태와 구조를 완전하게 유지하는데 중요한 기능을 (Parsell, 1993)가지며 세포질 내 단백질을 세포 표면으로 이동시켜 면역반응을 유발하는 항원 전달체 기능도 가지고 있다 (Pelham, 1988).

Kaarniranta(1998)는 HSP 70 mRNA 안정되는 과정에서 후전사 조절이 다른 부가적인 heat shock gene 조절을 제공하며 이것이 아마도 stress 에 저항하는데 중요한 역할을 한다고 하였다. 사람의 혈액 종양세포를 이용한 연구에서 HSPs 70 은 세포의 분화를 촉진시키며 세포사멸을 억제할 뿐만 아니라

유발하는 약제에 대해서도 세포가 내성을 갖도록 한다는 보고도 있다 (Kwak, 1988). 또한 HSPs 는 스트레스 상황뿐만 아니라 정상적인 포유류 배아의 발달에도 중요한 역할을 한다. Esfaniari (2007)은 항원에 의해 HSP 기능이 방해 받았을 때 blastocyst 의 발달이 눈에 띄게 저해되고 세포의 사멸이 증가한다고 하였다. 이번 실험에서 2Mpa 와 3Mpa 의 압력 저속 냉동 보존법이 저속 냉동 보존법과 급속 냉동 보존법에 비해 세포의 활성화도 평가에서 더 좋은 결과를 나타냈다. 특히 저속 냉동 보존법과 같은 냉동 속도를 사용하였음에도 세포의 활성화도가 높은 수치를 나타내었다. 이는 고압이 적절한 냉동 속도에 비해 느린 냉동 속도 에서 발생하는 세포 내 수축 및 이에 따른 용질 효과를 감소 시킨 것으로 생각된다. 고압을 통해 발생된 HSPs 이 세포 내 수송을 용이하게 하고 다른 단백질과의 합성을 통해 스트레스에 저항하여 세포의 생존율이 증가한 것으로 생각된다.

의학 분야에서도 이러한 고압을 이용하여 냉동시의 세포손상을 방지하려는 연구들이 있어 왔다. Du 등은 돼지의 난모 세포에 치사량에 가까운 고압(20MPa)을 적용 시켰을 때 스트레스 저항성이 증가함을 보고하였다. 또한 이런 방법에 의해 쥐와 소의 배아 및 돼지의 정액에 있어서도 냉동 보존시의 생존률이 증가하였다(Pribenszky et al ,2005, Kuo 2007). 치사에 가까운 스트레스에 의해 유발되는 molecular chaperones(HSPs)은 냉동 보존 치료 시 에도 항상성을 유지하게 하여 세포를 보호하는 역할을 담당한다. (Y Du, 2008, Reproduction)

반면 어느 정도의 압력을 가해야 세포의 생존도가 높게 유지되는지에 대해서는 아직 불분명하다. 발현되는 protein 의 타입과 양, 비율은 스트레스를 받는 세포의 종류뿐 아니라 sublethal shock 의 강도와 타입에 따라 다르게 결정된다. 다른 종류의 스트레스에 대해서도 비슷한 반응을 보일 수 있으며 ‘교차 보호’의 가능성도 있다. 또한 생존률을 높이는 데 필요한 압력의 정도와 기간은 보관 대상의 종과 생식체, 분화 정도에 따라 다르다. 예를 들어 쥐와 소의 배아는 60-80MPa 에서 60 분간의 압력에도 저항성이 있지만 돼지의 난모 세포는 30 분간 60MPa 의 압력을 받을 경우 회복할 수 없는 손상을 입게 된다. 2000 년 takahashi 등은 쥐의 간을 고압 하에 영하의 온도에서 보관한 실험에서 30MPa, 20MPa, 10MPa, 5MPa 에 5 시간 보관한 경우 30 MPa, 20MPa 에서는 24 시간 뒤 모든 간이 죽었지만 5MPa 의 경우 2 주 후 까지도 살아있음을 보고하였다(takahashi, 2000). 이전 Lee 의 실험에서 쥐 치아의 치주 인대 세포를 압력 저속 냉동 보관 시 3Mpa 의 압력하에 시행하였었다. 이 실험에서는 저속 냉동군과 냉장군(4℃)보관 시 보다 3Mpa 의 압력하에서 저속 냉동한 군이 MTT, WST-1 값이 통계적으로 유의성 있게 높았고 급속 냉동군과는 유의차가 없었지만 조금 높은 값을 나타내었다. 이 경우에도 HSPs 가 발현으로 인한 냉동보존에 따른 스트레스 저항성이 높아진 것으로 생각된다. 본 실험에서도 저속 냉동군과 급속 냉동군에 비해 2Mpa 및 3Mpa 의 압력 저속 냉동군이 세포 활성화도에 있어 좋은 경향을 나타내었다. 이는 아마도 6 일간 적용한 2Mpa 및 3Mpa 의 압력이 이 세포에 HSPs 의 발현을 유도 하였기 때문으로 생각된다.

세포의 장기간 보존을 위해 앞으로 냉동 보존 시 적절한 냉동 속도를 찾는 것과 함께 HSPs 의 발현과 함께 고압에 따른 손상이 최소화되는 적절한 압력을 찾는 것이 필요할 것으로 생각된다.

V. 결론

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

1. Cell counting 에서 일반적인 냉동 보존법, 2Mpa 압력 저속 냉동법, 3Mpa 압력 저속 냉동법이 저속 냉동법과 급속 냉동법에 비해 통계적으로 유의차 있게 높은 세포수를 나타내었다($p < 0.05$). 2Mpa 압력 저속 냉동법은 3Mpa 압력 저속 냉동법, 일반적인 냉동 보존법에 비해 높은 세포수를 나타냈으나 통계적인 유의차는 없었다.

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

3. Clonogenic capacity 에서는 2Mpa 압력 저속 냉동법이 저속 냉동법과 급속 냉동법에 비해 통계적으로 유의차 있게 높은 집락수를 나타내었다($p < 0.05$). 2Mpa 압력 저속 냉동법은 3Mpa 압력 저속 냉동법, 일반적인 냉동 보존법에 비해 높은 집락수를 나타냈으며 3Mpa 압력 저속 냉동법, 일반적인 냉동 보존법이 저속 냉동법과 급속냉동법에 비해 높은 집락수를 나타냈으나 통계적인 유의차는 없었다.

위의 결과를 통해 구강상피세포에서 2Mpa 혹은 3Mpa의 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.

VI. 참고 문헌

이영은, 이승중. 압력 저속 냉동이 쥐 치아 치주인대세포에 미치는 영향. 연세대학교; 2009.

Abe F, Kato C, Horikoshi K. Pressure regulated metabolism in microorganisms. Trends Microbiol 1999;7 Suppl 11:447-453.

Ahn HJ, Kim ES, Kim J, Kim DW, Kim KY, Lee CY, Lee SJ. Evaluation of viability of periodontal ligament cell in rat teeth using slow cryopreservation method with magnetic field. J of Korean Academy of Conservative Dentistry 2008;33 Suppl 4:332-340.

Aldridge BE, Bruner LJ. Pressure effects on mechanisms of charge transport across bilayer membranes. Biochem Biophys Acta 1985;817 Suppl 2:343-354.

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 2002;3 Suppl 1:3-10.

Andreasen JO, Schwartz O. Atlas of replantation and transplantation of teeth. 1st ed. Mediglobe SA, Fribourg, Switzerland; 1992.

Andreasen JO. Interrelation between alveolar bone and periodontal ligament repair after replantation of mature permanent incisors in monkeys. J Periodont Res 1981;16 Suppl 2:228-235.

Ashwood-smith MJ. Low temperature preservation of cells, tissues and organs. Pitman Medicals 1st ed. ; 1980. p.19-45.

Berridge MV, Tan AS, McCoy KD, Wang R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. Biochemica 1996;4:15-20.

Carlson MA. Technical note: assay of cell quantity in the fibroblast populated collagen matrix with a tetrazolium reagent. Eur Cell Materials. 2006;12:44-8.

Czochrowska EM, Stenvik A, et al."Outcome of tooth transplantation: survival and success rates 17-41 years posttreatment." Am J Orthod Dentofacial Orthop 2002;121 Suppl 2:110-9;quiz 193.

Diller KR, Cravalho EG. A cryomicroscope for the study of freezing and thawing processes in biological cells. *Cryobiology* 1971;7 Suppl 4:191-9.

Domitrovic T, Fernandes CM, Boy-Marcotte E, Kurtenbach E. High hydrostatic pressure activates gene expression through Msn2/4 stress transcription factors which are involved in the acquired tolerance by mild pressure precondition in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 2006;580 Suppl 26:6033-8.

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* 2008;10 Suppl 3:325-30.

Du Y, Pribenszky C, Molnar M, Zhang X, Yang H, Kuwayama M, Pedersen AM, Villemoes K, Bolund L, Vajta G. High hydrostatic pressure: a new way to improve in vitro developmental competence of porcine matured oocytes after vitrification. *Reproduction* 2008;135 Suppl 1:13-17.

Elo MA, Sironen RK, Karjalainen HM, Kaarniranta KK, Helminen HJ, Lammi MJ. Specific induction of heat shock protein 90 beta by high hydrostatic pressure. *Biorheology* 2003;40:141-6.

Esfandiari N, Falcone T, Goldberg JM, Agarwal A, Sharma RK. Heat-shock proteins modulate the incidence of apoptosis and oxidative stress in preimplantation mouse embryos. *Fertility and Sterility* 2007;87 Suppl 5:1214-7.

Farrant J. Water transport and cell survival in cryobiological procedures. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1977;278 Suppl 959:191-205.

Fujikawa S. "Freeze-fracture and etching studies on membrane damage on human erythrocytes caused by formation of intracellular ice." *Cryobiology* 1980;17 Suppl 4:351-62.

Fuchigami M, Miyazaki K, Kato N, Teramoto A. Histological changes in high-pressure-frozen carrots. *Journal of Food Science* 1997; 62 Suppl 4:809-12.

Gao D, Critser JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J* 2000;41 Suppl 4:187-96.

Guralnick WC, Shulman LB. Tooth transplantation. *Dent Clin North Am* 1962;6:499-511.

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* 2008;70:1391.

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* 2004;125 Suppl 6: 668-75.

Kaarniranta K, Elo M, Sironen R, Lammi MJ, Goldring MB, Eriksson JE, Sistonen L, Helminen HJ. Hsp 70 accumulation in chondrocytic cells exposed to high continuous hydrostatic pressure coincides with mRNA stabilization rather than transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:2319-24.

Kaku M, Kamata H, Kawata T. Cryopreservation of PDL cells by use of program freezer with magnetic field for tooth banking. *Dentistry in Japan* 2007;43:82-6.

Kawasaki N, Hamamoto Y, Nakajima T, Irie K, Ozawa H. Periodontal regeneration of transplanted rat molars after cryopreservation. *Archives of Oral Biology* 2004;49:59-69.

Kawata T. Tooth transplantation by teeth bank—approach to human—Hiroshima. Department of Orthodontics, Hiroshima University School of Dentistry.; 2005.

Knorr D. Effects of high-hydrostatic pressure processes on food safety and quality. *Food Technology* 1993;47:156-61.

Koch H, Seyderhelm I, Wille P, Kalichevsky MT, Knorr D. Pressure-shift freezing and its influence on texture, color, microstructure and rehydration behaviour of potato cubes. *Nahrung-Food* 1996;40 Suppl 3: 125-31.

Kuo YH, Pribenszky Cs, Huang SY. Higher litter size is achieved by the insemination of high hydrostatic pressure-treated frozen-thawed boar semen. *Theriogenology* 2008;70:1395-96.

Kwak HJ, Jun CD, Pae HO, Yoo JC, Park YC, Choi BM, Na YG, Park RK, Chung HT, Park WJ, Seo JS. The role of inducible 70-kDa heat shock protein in cell cycle control, differentiation and apoptotic cell death of the human myeloid leukemic HL-60 cells. *Cell Immunol* 1988;187:1-12.

Leibo SP, McGrath JJ, et al. "Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilized mouse ova as a function of cooling rate." *Cryobiology* 1978;15 Suppl 3:257-71.

Lovelock JE. "The denaturation of lipid-protein complexes as a cause of damage by freezing." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1957;147 Suppl 929:427-33.

Mary C, Phelan. *Basic Techniques in Mammalian Cell Tissue Culture*. *Current protocols in cell biology* 2007;1 Suppl 36:1-18

Mazur P, Leibo SP, Chu EH. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Exp Cell Res* 1972;71 Suppl 2:345-55.

Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 1984;247:125-42.

Mazur P. "Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos." *Cell Biophys* 1990;17 Suppl 1:53-92.

Miura T, Minegishi H, Usami R, Abe F. Systematic analysis of HSP gene expression and effects on cell growth and survival at high hydrostatic pressure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Extremophiles* 2006;10:279-84.

Muldrew K, McGann LE. "The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury." *Biophys J* 1994;66(2 Pt 1): 532-41.

Nei T. Structure and function of frozen cells freezing patterns and post-thaw survival. *J Microsc* 1978;112:197-204.

Parsell DA, Lindquist S. The function of heat shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Ann Rev Genet* 1993;27:437-96.

Pelham HR. Heat shock proteins: coming in from cold. *Nature* 1988;332:776-7.

Pribenszky C, Molnar M, Cseh S, Solti L. Improving post-thaw survival of cryopreserved mouse blastocysts by hydrostatic pressure challenge. *Anim Reprod Sci* 2005;87(1 Suppl 2):143-50.

Pribenszky C, Molnar M, Ulrich P ,et al. Pressure assisted cryopreservation. *Reprod Dom Anim* 2005;40:228-344.

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* 1968;5 Suppl 1:18-25.

Schluter O, Urrutia Benet G, Heinz V, Knorr D. Metastable states of water and ice during pressure-supported freezing of potato tissue. *Biotechnol Prog* 2004;20:799-810.

Shimada K. Effects of cryoprotective additives on intracellular ice formation and survival in very rapidly cooled HeLa cells. *Contrib Inst Low Temp Sci Ser B* 1977;19:49-69.

Steponkus PL, Wiest SC. Freeze-thaw induced lesions in the plasma membrane. In: Lyons JM, Graham DG, Raison JK, eds. *Temperature Stress in Crop Plants: The Role of the Membrane*. New York: Academic Press;1979. p.231-53.

Takahashi T, Kakita A, Takahashi Y, Sakamoto I, Yokoyama K, Fujiu T, Yamashina S, Tamaki T, Takazawa Y, Muratsubaki R. Functional integrity of the rat liver after subzero preservation under high pressure. *Transplantation Proceedings* 2000;32:1634-6.

Thorpe PE, Knight SC, et al. "Optimal conditions for the preservation of mouse lymph node cells in liquid nitrogen using cooling rate techniques." *Cryobiology* 1976;13 Suppl 2:126-33.

Welch TJ, Farewell A, Neidhardt FC, Bartlett DH. Stress response of *Escherichia coli* to elevated hydrostatic pressure. *J Bacteriol* 1993;175:7170-7.

Zhu SM, Le Bail A, Ramaswamy HS, Chapleau N. Characterization of ice crystals in pork muscle formed by pressure shift freezing as compared with classical freezing methods. *Journal of Food Science* 2004;69 Suppl 4: 190-7.

Zhu SM, Ramaswamy HS, Le Bail A. Ice crystal formation in gelatin gel during pressure shift versus conventional freezing. *Journal of Food Engineering* 2005;66 Suppl 1:69-76.

부록 <Raw data>

1. Cell counting

| | Conventional cryopreservation | Slow freezing | Rapid freezing | Slow freezing under 2MPa pressure | Slow freezing under 3MPa pressure |
|------|-------------------------------|---------------|----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | 5.334 | 5.021 | 4.930 | 5.677 | 5.450 |
| | 5.301 | 5.079 | 4.602 | 5.498 | 5.380 |
| | 5.494 | 4.699 | 4.477 | 5.531 | 5.342 |
| Mean | 5.376 | 4.933 | 4.670 | 5.569 | 5.390 |
| SD | 0.103 | 0.205 | 0.234 | 0.095 | 0.055 |

2. Optical density of WST-1

| | Conventional cryopreservation | Slow freezing | Rapid freezing | Slow freezing under 2MPa pressure | Slow freezing under 3MPa pressure |
|--------|-------------------------------|---------------|----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | 0.742 | 0.048 | 0.031 | 1.923 | 0.810 |
| | 0.684 | 0.020 | 0.008 | 1.092 | 0.465 |
| | 0.571 | 0.027 | 0.005 | 1.074 | 0.589 |
| | 0.543 | 0.007 | 0.02 | 0.986 | 0.499 |
| Median | 0.627 | 0.024 | 0.014 | 1.083 | 0.544 |
| IQR | 0.156 | 0.024 | 0.019 | 0.478 | 0.218 |

3. Number of colonies (number of cells seeded :1x10³)

| | Conventional cryopreservation | Slow freezing | Rapid freezing | Slow freezing under 2MPa pressure | Slow freezing under 3MPa pressure |
|--------|-------------------------------|---------------|----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | 224 | 0 | 0 | 427 | 204 |
| | 192 | 0 | 0 | 407 | 195 |
| | 102 | 0 | 0 | 117 | 82 |
| | 83 | 0 | 0 | 92 | 85 |
| Median | 147 | 0 | 0 | 262 | 140 |
| IQR | 115.5 | 0 | 0 | 312.5 | 116 |

4. Comparison temperature of inside the Program freezer and inside the Pressure bottle

| | Inside the Program freezer | Inside the Pressure bottle |
|-----------------|----------------------------|----------------------------|
| Before pressing | 21.9°C | 22.6°C |
| After pressing | 21.5°C | 27.8°C |
| 10 min | 2.3°C | 15.8°C |
| 20 min | -2.1°C | 8.5°C |
| 40 min | -12.0°C | -3.5°C |
| 60 min | -22.3°C | -14.9°C |
| 80 min | -32.0°C | -24.6°C |
| 100 min | -40.1°C | -35.3°C |
| 120 min | -35.4°C | -38.9°C |
| 140 min | 2.2°C | -21.0°C |

Abstract

Comparison of viability of oral epithelial cells stored by different freezing method

Do-young Baek, D.D.S.

Department of Dentistry, the Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor *EuiSeong Kim*, D.D.S., M.S.D., Ph.D.)

This study examined the influence of the storage method 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 2Mpa or 3Mpa. 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 2Mpa pressure and slow freezing

under a 3Mpa 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 2Mpa 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 2Mpa pressure showed significantly higher values than slow freezing preservation and rapid freezing preservation ($p < 0.05$).

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