

수종의 저장용액에서의 치은섬유모세포 생존율의 비교연구

이희수 · 임유선

강릉원주대학교 치과대학 해부학 및 조직학 교실

Comparative study on survival rate of human gingival fibroblasts stored in different storage media

Hee-Su Lee · You-Sun Lim

*Department of Anatomy and Histology, College of Dentistry
Gangneung-Wonju National University*

ABSTRACT

Objectives : To Compare the degree of survival rate of gingival fibroblasts, which is concerned with teeth adherence based on the type of avulsed tooth's storage solution.

Methods : Different media gingival fibroblasts were stored in Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), Hank's balanced salt solution(HBSS), milk, saline, and green tea in for 1, 2, 3 hours. And, MTT assay was conducted to compare survival rate of human gingival fibroblasts.

Results : 1. The survival rate of gingival fibroblasts in DMEM and HBSS was higher than thoes in other storage media(Milk> Saline> Green tea). 2. The survival rate of gingival fibroblasts in milk, saline and green tea decreased as time passed. 3. Because of low osmotic pressure, green tea showed decrease of survival rate of gingival fibroblasts.

Conclusion : DMEM and HBSS were the most effective storage media for gingival fibroblast. Among milk, saline, green tea, milk is most effective storage media for keeping gingival fibroblasts. Milk is recommended for storage media of avulsed tooth for keeping viability of cells.(J Korean Soc Dent Hyg 2012;12(4):733-739)

keywords : Avulsed Teeth, Gingival Fibroblast, Storage Solution

색인 : 저장용액, 치아탈구, 치은섬유모세포

1. 서론

치아의 부착은 치아 표면에 부착되어 있는 접합상피(junctional epithelium)로부터 치근과 섬유부착관계를 이루고 있는 치은결합조직까지를 포함하는 부위이다¹⁾. 즉 접합상피는 안쪽고유판(internal basal lamina)에 의해서 치아의 법랑질(enamel)에 부착되며 치주인대섬유들은 백악질(cementum)에 부착되는 부위로 치아 경조직과 구강점막의 연조직 간의 결합부위를 일컫는다. 치은결합조직은 치은섬유모세포(gingival fibroblast)로 이루어져 있으며, 치은섬유모세포는 치아부착에도 관여하는 세포이다.

치아 탈구란 외부의 충격으로 심각한 치아 외상을 받아 치아가 치조와에서 완전히 탈구된 것으로, 탈구된 치아를 재식 시 고려해야 할 일차적 목표는 치아 및 주위 지지조직을 최대한 보호하는 것이다. 재식술의 성공은 즉시 재식하는 것이 가장 좋은 결과를 갖으며 적어도 30분 내에 재식술이 이루어지는 것이 예후에 좋다²⁾. 또한 치아재식의 성공률을 높이기 위해 치주인대세포와 그 주위지지조직의 보존이 중요하다고 알려져 있다³⁾. 이를 위해서는 그 주위조직의 세포액의 기화를 막기 위해 plastic foil로 감싸거나 cryopreservative agent를 이용하는 방법과 탈구된 치아를 보관하는 저장용액(storage media) 등이 다양하게 연구되어지고 있으며⁴⁾, 저장용액의 평가에서 중요한 것은 저장용액의 삼투압과 온도, 필수영양소의 함유, pH, 세균 독소의 유무이다⁵⁾.

Hank's balanced salt solution(HBSS)은 많은 실험에서 3시간에서 72시간까지 탈구된 치아를 가장 효과적으로 저장할 수 있는 용액이라 알려져 왔으나⁶⁻⁸⁾, 사고 현장에서 쉽게 구할 수가 없다는 단점을 가지고 있다. 우유는 등장성 용액으로 일상생활에서 폭넓게 사용되고 있으며 세균이 적고 적절한 삼투압과 pH를 유지할 수 있어 3시간에서 48시간까지 그 효과가 지속될 수 있다는 연구도 있다⁷⁻¹⁰⁾.

녹차(Camella sinensis; family Theaceae)는 세계적으로 통틀어 물에 이어 두 번째로 흔히 소모되는 음료이다¹¹⁾. 녹차 추출물은 polyphenol의 일종인 catechin이 주요성분이다. 최근 연구에는 치주질환관련 병원성 세균

에 대한 효과도 있는 것으로 보고되고 있다¹²⁾.

이와 같이 탈구된 치아를 담그는 저장용액의 종류나 시간이 세포의 생존율에 중요한 영향을 미칠 수 있고 또한 치아재식의 성공 여부를 결정하게 된다.

따라서 이 연구는 실험군으로는 주변에서 흔히 구할 수 있는 우유, 녹차, 생리식염수와 치아탈구 시 가장 이상적 용액으로 알려진 HBSS를 이용하고, 대조군으로는 치은섬유모세포의 배양액으로 이용되는 DMEM을 이용하여 1, 2, 3시간이 지남에 따라 치은섬유모세포(gingival fibroblast)의 생존율을 MTT assay를 이용해 세포 생존율을 비교하였고, 각 저장용액의 pH와 삼투압을 측정하여 그 영향력을 비교 분석하였다.

2. 연구대상 및 방법

2.1. 저장용액

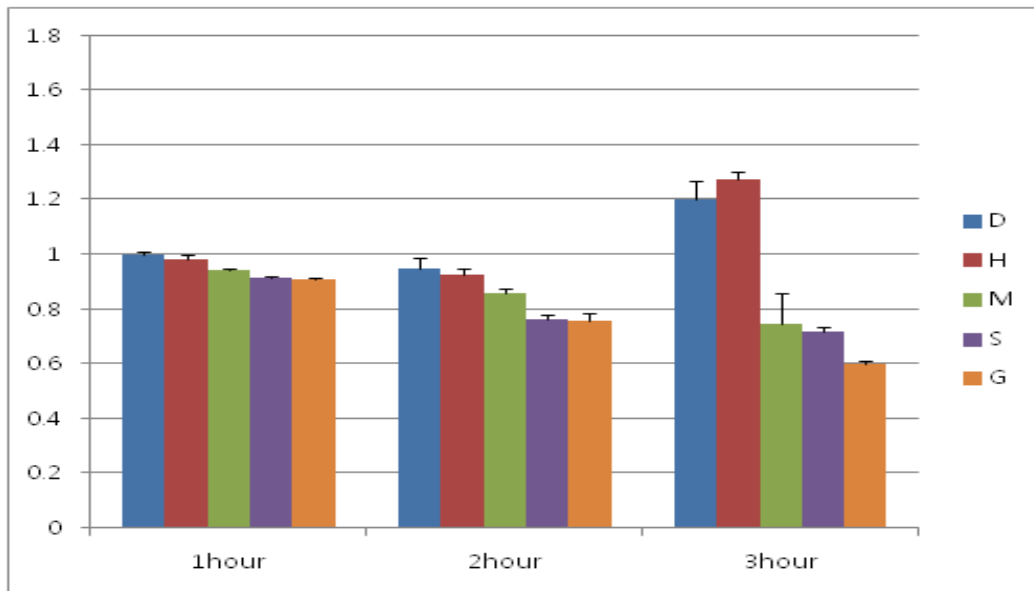
대조군으로는 10% Fetal Bovine Serum(FBS)과 1% penicillin이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 사용하였으며, 실험용액은 HBSS, 우유, 녹차, 생리식염수를 저장용액으로 사용하였다. 녹차는 80℃의 100ml물에 녹차티백을 1분 정도 담근 후 빼낸 용액을 사용하였다.

2.2. pH 및 삼투압 측정

10% FBS와 1% penicillin이 함유된 DMEM과 HBSS, 우유, 녹차, 생리식염수를 Orion 3 start pH benchtop (thermo electron corporation)와 Fiske[®] 110 Osmometer (Fiske Associates Inc., USA)를 이용하여 3회 자동 측정하였다.

2.3. 치은섬유모세포의 배양

교정용 목적으로 발치 후 얻어진 주변에 건강한 치은 조직을 10% FBS와 1% penicillin이 함유된 DMEM으로 37℃, 100% 습도, 5% CO₂ incubator에서 배양하여 치은섬유모세포를 얻었다. 치은섬유모세포들이 증식하여 배양접시바닥을 완전히 덮으면 3-5일 간격으로 계대배양하였다.



D: DMEM H: HBSS M: milk S: saline G: green tea

Fig. 1. Comparative on survival rate of gingival fibroblasts in storage media by MTT assay

2.4. MTT assay를 이용한 세포생존율 측정

배양된 치은섬유모세포를 $1 \times 10^4 / \text{ml}$ 의 농도로 96well-Plate에 $200 \mu\text{m}$ 씩 분주하여 24시간 동안 배양 후 치은섬유모세포가 96well-Plate 바닥에 완전히 부착된 상태를 확인하고 배양액을 제거하고, 각각의 저장용액을 $200 \mu\text{l}$ 씩 각 well에 주입한다.

그 후 실험군에 설정에 맞게 실온에서 1, 2, 3시간 동안 각각 보관한 후 저장용액을 제거하고 MTT용액 $20 \mu\text{l}$ 와 DMEM $180 \mu\text{l}$ 를 주입하고 배양기에서 4시간 동안 반응 시켰다.

세포반응 후 첨가된 용액을 제거하고, $100 \mu\text{l}$ 의 isopropanol을 첨가하여 형성된 MTT formazan결정이 녹도록 15분간 가볍게 진탕한 후, microplate reader(BIO-TAK, AC, USA)로 540nm 파장에서 흡광도(Optical Density)를 측정하였다.

2.5. 통계분석

실험군간에 평균값을 비교하기 위하여 Student's T-test를 시행하였으며, 통계적인 비교를 위하여 통계적 유의성의 기준값은 $p < 0.05$ 로 설정하였다.

3. 연구성적

3.1. MTT assay를 이용한 저장용액에서의 치은섬유모세포생존율

3.1.1. 1시간 군

치은섬유모세포의 생존력 지수를 저장용액간의 비교를 보면 1시간 군의 DMEM이 1.000일 때, HBSS 0.983, 우유 0.943, 녹차가 0.91, 생리식염수 0.915이었다. 분산분석 결과 세포의 생존력 보존능력은 DMEM이 가장 높았고 HBSS, 우유, 생리식염수, 녹차 순으로 나타났다(Fig. 1).

3.1.2. 2시간 군

1시간 군의 DMEM이 1.000일 때, 2시간 군의 DMEM 0.949, HBSS 0.926, 우유 0.859, 녹차 0.758, 생리식염수 0.764이었다. 분산분석 결과 세포의 생존력 보존능력은 1시간의 DMEM이 가장 높았고 그 다음으로는 2시간의 DMEM, HBSS, 우유, 생리식염수, 녹차 순으로 나타났다(Fig. 1).

Table 1. Viability of gingival fibroblast cells maintained in each experimental medium

	DMEM	HBSS	Milk	Saline	Green tea
pH	7.8±0.12	7.87±0.11	6.67±0.19	6.65±0.14	6.62±0.21
Osmolarity (mOsmol/kg)	323±0.15	268±0.1	304±0.15	313±0.12	—

3.1.3. 3시간 군

1시간 군의 DMEM이 1,000일 때, 3시간 군의 DMEM은 1,202, HBSS 1,275, 우유 0.747, 녹차 0.601, 생리식염수 0.719이었다. 분산분석 결과 세포의 생활력 보존 능력은 HBSS가 가장 높았고 3시간의 DMEM 순으로 나타났다. 그 다음으로는 1시간의 DMEM, 우유, 생리식염수, 녹차 순으로 나타났다(Fig. 1).

3.2. 각 저장용액에서 pH와 삼투압 측정

모든 저장 용액에서 세포의 생존유지의 적정 pH인 6.6~7.8 범위 내에 있었으며, 삼투압은 녹차를 제외한 저장용액에서 세포조직액과 유사한 230~400mOsmol/kg로 적정 삼투압을 갖고 있었다. 녹차는 너무 낮은 삼투압으로 인하여 측정이 불가하였다(Table 1).

4. 총괄 및 고안

치아의 외상으로 인해 완전 탈구된 치아의 재식 시 치아주위조직의 생활력 유지는 완전 탈구 후 재식 때까지 경과시간이 길수록⁹⁾, 건조 상태로 오래 방치될수록¹³⁾에 후가 불량하다. 선학들은 치아와 치조골에 있는 치주인대세포에 대한 실험을 원숭이^{14,15)}나 개¹⁶⁾ 및 쥐¹⁷⁾를 이용하여 인위적으로 치아를 탈구시킨 후 재식하여 관찰하기도 하였다. 사람에 대해서는 in vitro 실험을 통한 치주인대섬유모세포의 저장용액에 대한 생존율 평가 실험^{6-8,10,24)}이 많이 시행되어 왔지만, 치아부착에 관여하는 다른 치아주위지지조직에 대한 연구는 아직 미흡한 상태이다.

본 연구는 치아부착에 관여하는 치은섬유모세포(gingival fibroblast)가 저장용액과 저장용액 온도의 변화에 대한 생존율을 비교하였다. 저장용액으로는 주변에서 흔히 구

할 수 있는 우유, 녹차와 치아 탈구 시 가장 이상적으로 추천되는 HBSS를¹⁸⁾ 실험저장용액으로 설정하였으며 치은섬유모세포의 배지액인 DMEM용액을 대조군으로 사용하였다.

세포의 생존유지에 있어서 삼투압과 pH는 중요한 인자이다. 세포의 성장은 주로 230~400mOsmol/kg과 6.6~7.8 pH에서 일어난다고 알려져 있다¹⁹⁾. 세포막의 탈락을 방지하기 위해서는 등장성인 용액을 사용해야 한다. 삼투압이 낮은 저장용액은 세포막에 비가역적인 손상을 주게 되는데 Bloml f²⁰⁾는 NaCl을 타액에 첨가함으로써 삼투압을 높여 식염수와 유사한 수준까지 세포의 생존력이 향상됨을 보고하였다.

HBSS는 International Academy of Dental Traumatology (IADT)에서 치아완전탈구용액으로 추천되는 표준용액¹⁸⁾으로 무기이온과 glucose 등을 포함하고 있다²¹⁾. 이 용액은 세포의 지속적인 생존에 유리한 결과를 다른 많은 연구에서 볼 수 있다¹⁹⁾.

본 실험에서도 3시간 군의 HBSS가 모든 실험용액 중 치은섬유모세포의 생존율이 가장 높게 나타났다. 다만 1, 2시간 군에서는 DMEM에서 생존율이 높게 나타난 것은 치은섬유모세포의 저장환경을 다른 것으로 바꾸는 것 보다는 처음 배양되었던 DMEM에서의 생존율이 가장 높게 나온 것 같다. 하지만 HBSS는 사고현장에서 쉽게 구할 수 없다는 단점이 있다.

본 연구에서 우유와 생리식염수는 등장액으로 녹차에 비해 우수한 세포생존율을 보이나 생리식염수보다는 우유에서 더 높은 생존율을 보였다. 즉 비슷한 삼투압을 가진 등장액이라도 저장용액의 구성 성분이 세포 생존에 중요함을 의미한다. Alacam 등²²⁾은 식염수는 Ca^{2+} , Mg^{2+} 같은 대사용 필수 이온이 결여되어 있으나 우유에는 이외에도 필수영양소가 있어서 세포보호 효과를 갖는다고 하였다. Bloml f 등¹⁴⁾은 원숭이의 치아를 발거한 후 우

유와 식염수에 각각 1시간에서 3시간 동안 보관 후 조직 염색을 시행한 결과 생리식염수는 완전탈구 후 저장시간이 매우 짧을 때는 비교적 우수한 저장용액으로 추천될 수 있으나 장시간 보관 시 우유에 비하여 보관 능력이 떨어졌다고 보고하였으며, 우유에는 아미노산, 탄수화물, 비타민 등과 같은 중요한 영양물질이 함유되어 있으며 멸균처리되어 조직에 해로운 성분이 적기 때문이라고 주장하였다. 따라서 우유가 저장용액으로 좋은 이유는 pH buffer system 작용, 등장성 용액, growth factor와 필수 영양소 함유²³⁾로 인한 세포 보호효과, 세포독성을 가진 세균이 없기 때문이라고 할 수 있다.

녹차의 대표적인 추출물은 polyphenol의 일종인 catechin이 주성분이다. Hwang²⁴⁾은 녹차와 치주인대세포의 생존을 실험에서 시중에서 파는 티백녹차가 HBSS와 우유에 비해서는 낮은 생존율을 보인다 하였다. 녹차는 너무 낮은 삼투압을 가지고 있는 저장성용액의 성질과 화학물질을 포함하기 때문이라 하였으나 1시간 이내의 짧은 시간 동안에는 수돗물보다 더 효율적이라고 하였다.

본 연구에서 녹차는 우유와 식염수에 비해 생존 세포수와 활성이 급격히 감소함을 알 수 있었다. 이는 체내의 환경에 크게 못 미치는 녹차의 삼투압이 중요하게 작용하여 세포를 팽윤시키고 세포막을 약화시켜 세균과 세균 효소 및 세균 독소에 의한 세포막의 파괴가 촉진되었기 때문으로 생각된다. Hirasawa 등¹²⁾에 의해 녹차의 catechin이 치주질환의 세균에 대한 항균효과를 관찰한 결과 최소억제농도가 1mg/ml이었다는 보고가 있었다. 즉, 본 연구에서도 녹차가 항균물질인 catechin을 가지고 있어 짧은 시간 동안에는 세포 생존 유지에 효과적이라고 생각된다.

Oswald 등²⁵⁾과 Andreassen과 Hjorting-Hansen²⁶⁾은 재식의 성공은 완전탈구 후부터 재식을 시행할 때까지의 경과 시간에 달려 있다고 보고하였으며 Heithersay¹⁵⁾는 구강 외에 노출된 시간이 2시간 이내이면 생활력 있는 조직이 재형성될 가능성이 많다고 주장하였다.

본 연구에서도 저장용액에서 DMEM과 HBSS를 제외한 모든 용액이 시간이 경과될수록 치은섬유모세포의 생존율이 점진적으로 저하되었다. DMEM과 HBSS만 치은섬유모세포의 생활력이 상승한 것은 세포의 배지액으로

세포성장이 이루어진 것으로 생각된다.

치아가 완전 탈구되어 치은섬유모세포의 생활력유지에 중요한 여러 요소 중 이번 실험에서는 저장용액과 경과 시간에 대해 연구하였으며 연구결과에 의하면 완전 탈구된 후 재식 시까지의 경과 시간이 짧을수록, 저장성 용액보다는 등장성 용액에 탈구치아를 보관하는 것이 치은섬유모세포의 생존을 보존능력이 높았다.

이상의 연구 결과를 종합해 본 결과 저장용액 중 DMEM과 HBSS가 치은섬유모세포의 생존에 가장 우수한 저장용액이나 이는 사고현장에서 쉽게 구하기 어렵기 때문에, 일상생활에서 쉽게 구할 수 있고 치은섬유모세포의 생존을 보존에도 유리한 우유를 추천하는 바이다. 아울러 치아부착에 관여하는 다른 세포의 실험과 조직학적 평가가 필요하며, 주변에서 흔하게 구할 수 있는 다른 저장용액들에 대한 비교연구가 필요한 것으로 사료된다.

5. 결론

완전 탈구된 치아의 예후에는 치아주위조직의 상태가 중요하다. 이번 실험의 결과를 종합하여 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 저장용액 모두 치은섬유모세포의 생존율은 DMEM과 HBSS가 가장 높았으며 우유, 식염수, 녹차 순으로 높았다.
2. 모든 저장용액에서 치은섬유모세포는 DMEM과 HBSS를 제외하고는 시간이 경과될수록 생존율이 낮아졌다.
3. 녹차는 낮은 삼투압으로 인해 시간이 지남에 따라 치은섬유모세포 생존율이 급격히 감소하였다.

참고문헌

1. Carranza FA Jr, Glickman's Clinical Periodontology. 7th ed. Philadelphia:W. B. Saunders Co;1990: 231-233.
2. Flanagan VD, Myers HI. Delayed reimplantation of second molars in the syrian hamster. Oral

- Surg Oral Med Oral Pathol 1958;11(10):1179-1188.
3. Courts FJ, Mueller WA, Tabeling HJ. Milk as an interim storage medium for avulsed teeth. *Pediatr Dent* 1983;5(3):183-186.
4. Bloml f L, Andersson L, Lindskog S, Hedstr m KG, Hammarstr m L. Periodontal healing of replanted monkey teeth prevented from drying. *Acta Odontol Scand* 1983;41(2):117-123.
5. 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* 1994;27(1):1-5.
6. Hiltz J, Trope M. Vitality of human lip fibroblasts in milk, Hank's balanced salt solution and Viaspan storage media. *Endod Dent Traumatol* 1991;7(2):69-72.
7. Huang SC, Remeikis NA, Daniel JC. Effects of long-term exposure of human periodontal ligament cells to milk and other solutions. *J Endod* 1996;22(1):30-33.
8. 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* 1999;15(4):149-156.
9. Bloml f L, Otteskog P. Viability of human periodontal ligament cells after storage in milk or saliva. *Scand J Dent Res* 1980; 88(5):436-440.
10. Souza BD, L ckemeyer DD, Felipe WT, Sim es CM, Felipe MC. Effect of temperature and storage media on human periodontal ligament fibroblast viability. *Dent Traumatol* 2010;26(3):271-275.
11. Yang CS, Maliakal P, Meng X. Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002;42:25-54.
12. Hirasawa M, Takada K, Makimura M, Otake S. Improvement of periodontal status by green tea catechin using a local delivery system: A clinical pilot study. *J Periodontal Res* 2002; 37(6):433-438.
13. Courts FJ, Muller WA, Tabeling HJ. Milk as an interim storage medium for avulsed teeth. *Pediatr Dent* 1983;5(3):183-186.
14. Bloml f L, Lindskog S, Hedstrom KG, Hammarstrom L. Vitality of periodontal ligament cells after storage of monkey teeth in milk or saliva. *Scand J Dent Res* 1980;88(5):441-445.
15. Heithersay GS. Replantation of avulsed teeth. *Aust Dent J* 1974;20:63-72.
16. Lee JT. Effect of storage methods on periodontal ligament cell viability in dog[Master's thesis]. Seoul:The graduate school of KyungHee Univesity; 1991.
17. Kim JK, Kim ES, Kim J, Lee SJ. Evaluation of periodontal ligament cell viability in rat teeth after frozen preservation using in-vivo MTT assay. *J Kor Acad Cons Dent* 2006;31(3): 192-202.
18. Flores MT, Andersson L, Andreasen JO, et al. Guidelines for the management of traumatic dental injuries. II. Avulsion of permanent teeth. *Dent Traumatol* 2007;23(3):130-136.
19. Khademi AA, Saei S, Mohajeri MR, et al. A new storage medium for an avulsed tooth. *J Contemp Dent Pract* 2008;9(6):25-32.
20. Bloml f L. Storage of human periodontal ligament cells in a combination of different media. *J Dent Res* 1981;60(11):1904-1906.
21. Harkacz OM Sr, Carnes DL Jr, Walker WA 3rd. Determination of periodontal ligament cell viability in the oral rehydration fluid gatorade and milks of varying fat content. *J Endod* 1997;23(11):687-690.

22. Alacam T, Gorgul G, Omurlu H, Can M. Lactate dehydrogenase activity in periodontal ligament cells stored in different transport media. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;82(3):321-323.
23. Jin HS. Functional properties of milk. *Korean Dairy Techno* 1999;17(1):50-57.
24. Hwang JY. The use of green tea extract as a new storage medium for avulsed tooth[Master's thesis]. Seoul:The graduate school of KyungHee Univesity;2011.
25. Oswald RJ, Harrinton GW, Van Hassel HJ. A postreplantation evaluation of air-dried and salivastored avulsed teeth. *J Endod* 1980;6(5):546-551.
26. Andreasen JO, Hjorting-Hansen E. Replantation of teeth. I. Radiographic and clincal study of 110 human teeth repalnted after accidental loss. *Acta Odontol Scand* 1966;24(3):263-286.