

## 치아 탈구시 이용할 수 있는 용액에서의 MC3T3-E1 세포의 생존력 비교연구

김유리<sup>1</sup>, 이희수<sup>2</sup>

<sup>1</sup>강원대학교 의과대학 해부학교실, <sup>2</sup>강릉원주대학교 치과대학 해부학교실 및 구강과학연구소

접수: 2018년 11월 16일/ 수정접수: 2018년 12월 8일/ 게재 승인: 2018년 12월 10일/ 출간: 2018년 12월 31일

치아 탈구시 응급 상황에서 쉽게 구할수 있는 보관용액의 종류와 온도에 따른 MC3T3-E1 cell의 생존력을 비교 하고자 본 실험을 시행하였다. MC3T3-E1 cell를 4°C와 25°C의  $\alpha$ -MEM과 HBSS, 우유, 녹차, 감잎차, 생수에 30분, 60분, 90분, 120분, 180분에 보관한 후, MTT assay를 시행하여 세포의 생존력을 비교하였다.

실험 결과는 4°C 보관용액의 세포의 생존력은  $\alpha$ -MEM에서 가장 높았고, HBSS, 우유, 감잎차, 녹차, 생수 순으로 낮았다. 25°C 보관용액의 세포의 생존력 또한  $\alpha$ -MEM에서 가장 높았고, HBSS, 우유, 녹차, 감잎차, 생수 순으로 낮았다. 모든 보관용액의 세포의 생존력은 시간에 흐름에 따라 25°C보다 4°C에서 높았다.

본 연구결과로 미루어 보았을 때 뼈모세포인 MC3T3-E1 세포 생존력 보존에 있어서,  $\alpha$ -MEM, 우유, HBSS에서 높은 생존력이 관찰되었으면 실온보다는 4°C에서 높은 생존력을 보였다.

**주제어:** MC3T3-E1 cells, 보관용액, 생존력, 온도, MTT assay

### 서론

치아 탈구는 치아가 치조와로부터 완전히 이탈하는 현상이다. 사회환경의 변화나 기계적 문명의 발달로 인해 외상 받는 기회가 점점 많아지고 있다. 외상에 의해 치아가 손상되어 내원하는 환자들은 소아에서부터 성인에 이르기까지 다양하며, 외상의 원인도 다양하다. 어린이의 외상성 손상은 출생 후 유아기가 기어다니기 시작하는 1~2세 때부터 발생하기 시작하며 바깥 활동이 증가하는 8~10세 사이에

빈번히 일어난다<sup>1)</sup>. 나이가 증가함에 따라 점점 감소하여, 30대 이후에는 드물게 발생하는 것으로 조사된다<sup>2-3)</sup>. 외상의 원인으로는 넘어지는 것이 가장 많고, 물체에 부딪히거나, 교통사고, 스포츠에 의한 사고, 폭력, 아동학대 등이 있으며<sup>4-9)</sup>, 외상의 유형으로는 안면의 타박상과 함께 치아진탕, 아탈구, 치관 파절, 치근 파절, 치아 탈구, 전위 등이 있다<sup>1)</sup>. 그리고 외상에 있어서 남녀 비율은 격렬한 게임이나 접촉이 많은 운동에 노출되기 쉬운 남자의 경우가 여자보다 2배 정도 높다고 보고된 바 있다<sup>10-11)</sup>.

치아가 완전히 탈구되면 즉시 재식하는 것이 가장 바람직하지만, 치과에 내원하여 치료를 받기까지 상당한 시간이 요구된다<sup>11-14)</sup>. 무엇보다 치아의

교신저자: 이희수

강원도 강릉시 지변동 강릉원주대학교 치과대학 해부학교실,  
E-mail: nightnu@gwnu.ac.kr

건조를 방지하고 치아주위조직의 손상, 치주인대 세포의 생존력을 최대한 유지해줌으로써, 치아 재식의 성공률을 높여줄 수 있다<sup>15-16</sup>. 세포조직액의 수분증발을 방지하기 위해 plastic foil로 감싸거나, cryopreservative agent를 이용하거나 보관용액에 담가오는 방법들이 있다. 그 중에서 사고 발생 시 적절한 처치 방법으로서 어디에서나 쉽게 구할 수 있는 보관용액 방법이 많이 연구되어왔다<sup>17-20</sup>.

지금까지 연구된 보관방식으로는 체내와 유사한 pH를 갖고 있는 HBSS (Hank's balanced salt solution)가 가장 좋은 등장성 치아 보관용액으로 알려져 왔다. 그러나 HBSS는 사고 현장에서 쉽게 구할 수 없다는 단점이 있다. 어디서나 쉽게 구할 수 있는 우유가 가장 추천되고 있다. 그 외에도 보관용액으로 타액, 생리식염수, 세포배양액, 달걀흰자 등이 있다. 최근에는 천연 코코넛 즙, 이온음료, 프로폴리스, 분말우유, 항생제 성분이 포함된 상업용 HBSS인 Save-A-Tooth®, Viaspan®과 같은 장기저장액, Likorol®과 Optisol-GS®와 같은 각막보존액 등도 연구되고 있다<sup>18,21-26</sup>.

현대사회에서 생활수준이 높아지면서 건강식품 특히 차에 대한 관심이 많아졌다. 차는 특유한 맛과 향기를 갖는 기호 식품으로 세계 인류의 50%가 즐겨 마시고 있다. 또한 차는 경험적인 약리 효능이 입증되면서 질병치료의 민간요법으로 많이 알려져 왔다. 그 중에서 건강차로 응용해 온 녹차와 감잎차는 폭 넓게 소비되고 있고 임상학적 약리 효능이 탁월한 것으로 알려져 왔다<sup>27-28</sup>.

녹차에 함유되어 있는 polyphenol류는 여러 가지 생리활성과 관련이 있는 것으로 보고되어 왔으며, 이 중에 75%이상 차지하고 있는 catechin 성분이 항산화 작용이 강한 것으로 밝혀지고 있다<sup>29</sup>. 또한 catechin은 자연적인 항산화제로서, 항알레르기, 항균작용, 종양억제작용 및 돌연변이 억제작용, 충치예방효과가 있음이 보고되었고<sup>30</sup>, 녹차의 비타민

C가 항산화작용에 일조한다고 보고되었다<sup>27</sup>.

감나무는 우리나라 중부 이남에서 잘 자라는 과실수 중의 하나로<sup>28</sup>, 당질, 비타민 A,B,C, 및 무기질이 풍부하며 polyphenol류인 catechin, flavonoid, tannin이 다량 함유되어 있다. 이들에 의하여 항산화효과, 효소활성 저해효과, 항암효과 및 고혈압 및 동맥경화 등의 성인병과 충치예방효과가 있는 것으로 보고되었다<sup>31-34</sup>.

치아주위조직(periodontal tissue)은 시멘트질(cementum), 치주인대(periodontal ligament), 치조골(alveolar bone), 치은(gingiva)으로 구성되며, 이들 조직에 의해 치아는 치조골에 단단히 부착하게 된다. 이러한 치아주위조직이 치아손상을 받아 파괴된 경우 재생되기 위해서는 치아주위조직의 형성세포들이 손상부위에 기질을 합성하는 과정이 필요하다. 치주인대에서 유래한 세포들이 치아손상을 받은 치아주위조직을 재생 시킬 수 있는 가능성을 가진다고 보고되고 있다<sup>35-36</sup>. 치주인대는 세포와 아교섬유로 구성된 세포외바탕질, 비아교성 세포외바탕질로 이루어져있고, 세포성분에는 뼈모세포(osteoblast)와 뼈파괴세포, 섬유모세포, Malassez 상피잔존물, 큰포식세포, 미분화중간엽세포 및 시멘트질모세포가 있다. 다양한 중간엽세포를 함유하는 치주인대는 이들 세포 중 일부 적절한 자극에 의해 뼈모세포나 시멘트질모세포로 분화하여 뼈와 시멘트질을 형성 할 수 있다<sup>37</sup>.

위와 같이 뼈를 형성하는 뼈모세포는 Type I collagen을 주로 분비하고 소량의 Type V collagen, proteoglycans, 다양한 비아교질성 단백질을 분비한다. 이 세포는 분화된 세포로서 출생 전 또는 출생 후에 전구뼈모세포와 뼈모세포가 유사분열 할 수 있고 세포막의 바깥층에 알칼리성인산분해효소를 많이 발현한다<sup>38</sup>.

치아가 탈구되었을 때 치주인대에 부착되어 온 뼈모세포의 치조골 형성에도 치아 재식 시 성공 여

부에 영향이 있을 것으로 생각된다.

치아 탈구 시 치아를 담그는 보관용액의 종류나 온도가 치주인대섬유모세포의 생존력에 대한 연구는 많이 진행되어 왔지만, 뼈모세포의 생존력에 대한 연구는 국내외에 보고된 바가 적으므로 본 연구에서는 뼈모세포의 생존력에 대하여 연구해 보고자 한다.

일반적으로 세균의 독성 물질들은 37°C에서 가장 활성화되기 때문에 이보다 낮은 온도에서 치주인대세포가 높은 생존력을 가진다고 보고되었다<sup>21)</sup>.

따라서 본 연구에서는 냉장고 온도 4°C와 실온 25°C에서 보관용액으로서 대조군으로  $\alpha$ -MEM과 실험군으로 HBSS, 우유, 녹차, 감잎차, 생수를 사용하여, 30분, 60분, 90분, 120분, 180분 후, MC3T3-E1 세포의 생존력을 알아 보기위해 MTT assay 시행하였고, 각 보관용액의 pH와 삼투압을 측정하여 그 영향을 비교하였다.

## 실험재료 및 방법

### MC3T3-E1세포의 배양

뼈모세포양세포주(osteoblast-like cell line)인 MC3T3-E1 세포를 배양접시에서 10% Fetal bovine serum(FBS, Gibco, USA), 1% penicillin (100unit/ml)-streptomycin (100 $\mu$ g/ml)(Gibco, USA)가 포함된  $\alpha$ -minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM, Gibco, USA)에 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양하였다.

### 보관 용액

냉장고 온도 4°C와 실온 25°C의 두 가지 온도에서 시간은 30 분, 60 분, 90 분, 120분, 180 분으로 설정하고, 10% FBS함유  $\alpha$ -MEM, HBSS, 우유(P사), 녹차(D사), 감잎차(H사), 생수(N사)를 사용하

여 세포를 배양하였다. 녹차와 감잎차는 티백으로 제조회사의 방법에 따라 80°C인 생수 100ml에 1분 동안 우려냈다.

### 삼투압 측정

10% FBS함유  $\alpha$ -MEM, HBSS, 우유, 녹차, 감잎차, 생수 각각의 5 $\mu$ l의 삼투압 측정을 시행하였다. 삼투압은 OSMOMETER FISKE 110 (Fiske Associates Inc., USA.)으로 3회 자동 측정하였다.

### pH 측정

10% FBS함유  $\alpha$ -MEM, HBSS, 우유, 녹차, 감잎차, 생수 각각의 20 $\mu$ l의 pH 측정을 시행하였다. pH는 ORION 3 STAR pH Benchtop (Thermo Electron corporation, USA)으로 측정하였다.

### MTT assay를 이용한 세포생존율 측정

세포의 생존력을 알아보기 위하여 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay를 시행하였다. 먼저, 각 well당 1 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml 세포를 96well 배양접시에 세포를 분주하고, 10% FBS함유  $\alpha$ -MEM 배양액 200  $\mu$ l를 넣은 후, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 공기 세포 배양기에서 24시간 동안 배양하여, 바닥에 세포가 부착하도록 하였다. 배양 24시간 후 세포가 배양접시 바닥에 완전히 부착된 상태를 확인한 후 배양액을 제거하고, 냉장고 온도 4°C와 실온 25°C의 두 가지 온도에서 대조군은 10% FBS함유  $\alpha$ -MEM 배양액 200  $\mu$ l를 주입하고, 실험군은 HBSS, 우유, 녹차, 감잎차, 생수를 각각 200 $\mu$ l씩 주입하였다. 그 후 각각 30분, 60분, 90분, 120분, 180분 동안 배양한 후, 보관용액을 제거하고, 배양액에 5mg/ml의 농도로 녹인 MTT용액(Sigma, USA)을 well당 20 $\mu$ l씩 첨가하여 4 시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 공기 세포 배양기에서 반응시켰다. 세포배양 후 배양액을 제거하고

0.04 N 염산이 포함된 isopropanol (Sigma, USA) 을 well당 100 $\mu$ l 씩 첨가한 후 Microplate Reader (Bio-Tek, USA)로, 540 nm의 파장에서 측정하였다. 본 실험은 각 군마다 3 회 반복하여 시행하였다.

### 통계분석

실험군간의 평균값을 비교하기 위하여 Student's T-test를 실시하였다. 통계적인 비교를 위해 통계적 유의성의 표준 값은  $p < 0.05$ 로 설정하였다. 모든 결과는 평균  $\pm$  표준편차로 표시하였다.

### 실험 결과

#### 삼투압 측정

OSMOMETER FISKE 110를 이용하여, 실험에 이용된 보관용액 10% FBS함유  $\alpha$ -MEM, HBSS, 우유, 녹차, 감잎차, 생수를 측정하였다 (Table 1).

측정결과  $\alpha$ -MEM 287 mosmol/kg, HBSS 268 mosmol/kg, 우유 304 mosmol/kg로 체액과 유사하였고, 녹차, 감잎차, 생수는 저장성 용액으로 삼투압이 매우 낮아 측정이 되지 않았다.

### pH 측정

pH는 ORION 3 STAR pH Benchtop (Thermo Electron corporation, USA)를 이용하여, 실험에 이용된 보관용액 10% FBS함유  $\alpha$ -MEM, HBSS, 우유, 녹차, 감잎차, 생수를 측정하였다 (Table 2).

측정결과  $\alpha$ -MEM pH 7.5, HBSS pH 7.8, 우유 pH 6.6, 녹차 pH 6.6, 감잎차 pH 6.6, 생수 pH 6.7로 세포 생존범위를 나타내었다.

### MTT assay를 이용한 온도에 따른 보관용액별 뼈모세포의 생존력 비교

#### 1) 4 $^{\circ}$ C에서 보관군

세포의 생존력은 4 $^{\circ}$ C, 30분에서 우유가 가장 높았고,  $\alpha$ -MEM, 감잎차, HBSS, 녹차, 생수 순이었으나, 우유와  $\alpha$ -MEM 사이의 차이에서 유의도가 없었고, HBSS와 감잎차 사이의 차이에서도 유의도가 없었다. 4 $^{\circ}$ C, 60분에서는 HBSS에서 세포생존력이 가장 높았고, 우유,  $\alpha$ -MEM, 감잎차, 녹차, 생수 순의 세포생존력을 보였다. 4 $^{\circ}$ C, 90분에서는  $\alpha$ -MEM이 세포생존력이 가장 높았고, HBSS, 우유, 감잎차, 녹차, 생수 순의 세포생존력을 보였다. 4 $^{\circ}$ C, 120분에서는  $\alpha$ -MEM에서 가장 높은 세포

**Table 1. Measurement of the osmolality for the storage media. (unit mosmol/kg)**

	$\alpha$ -MEM	HBSS	Milk	Green Tea	Persimmon Leaf Tea	Mineral Water
osmolality	287	268	304	-	-	-

The osmolality in  $\alpha$ -MEM, HBSS, and milk were similar in body fluid. The osmolality in green tea, persimmon leaf tea and water was impossible to measure.

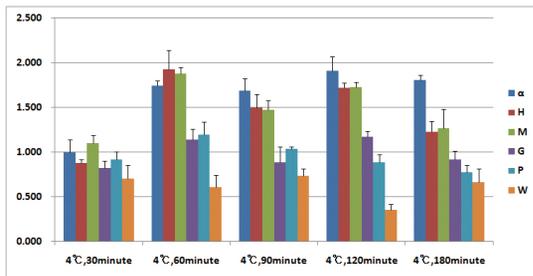
**Table 2. Measurement of the pH for the storage media.**

	$\alpha$ -MEM	HBSS	Milk	Green Tea	Persimmon Leaf Tea	Mineral Water
pH	7.5	7.8	6.6	6.6	6.6	6.7

The range of pH for cell viability was from 6.6 to 7.8.

생존력이 나타났고, 우유, HBSS, 녹차, 감잎차, 생수순의 세포생존력을 보였다. 4°C, 180분에서는  $\alpha$ -MEM에서 가장 높은 세포생존력을 보였고, 우유, HBSS, 녹차, 감잎차, 생수 순의 세포생존력을 보였다 (Fig. 1).

보관용액별 전체적인 분석결과  $\alpha$ -MEM, HBSS, 우유에서 높은 세포생존력이 나타났다,  $\alpha$ -MEM이 시간에 흐름에 따라 세포 생존력이 가장 높은 것을 알 수 있었으며, HBSS와 우유는 시간대 별로 세포생존력이 유사함을 알 수 있었다. 또한, 삼투압이 낮은 녹차와 감잎차, 생수는 낮은 세포생존력을 보였다.



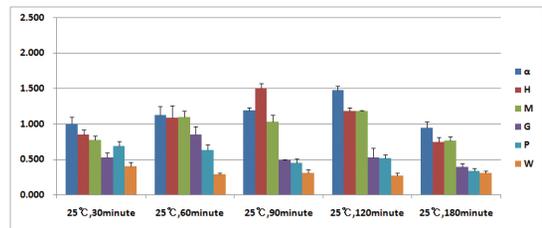
**Figure 1.** Comparison on the viability of MC3T3-E1 cells in storage media of 4°C by MTT assay.  $\alpha$  :  $\alpha$ -MEM, H : HBSS, M: milk, G ; green tea, P : persimmon leaf tea, W : mineral water. The viability of osteoblast of 4°C storage media was the highest in  $\alpha$ -MEM.

**2) 25°C에서 보관군**

세포의 생존력은 25°C, 30분에서  $\alpha$ -MEM이 가장 높았고, HBSS, 우유, 감잎차, 녹차, 생수순의 세포생존력을 보였다. 25°C, 60분에서  $\alpha$ -MEM이 가장 높은 생존력을 보였고, 우유, HBSS, 녹차, 감잎차, 생수 순의 세포생존력을 보였다. 25°C, 90분 HBSS에서 가장 높은 세포생존력을 보였고,  $\alpha$ -MEM, 우유, 녹차, 감잎차, 생수 순의 세포생존력을 보였다. 25°C, 120분에서  $\alpha$ -MEM에서 가장 높은 세포생존력을 보였고 높았고, HBSS, 우유, 녹차, 감잎차, 생수 순의 세포생존력을 보였다. 25°C, 180

분  $\alpha$ -MEM에서 가장 높은 세포생존력을 보였고, 우유, HBSS, 녹차, 감잎차, 생수 순으로 낮은 세포생존력을 보였다 (Fig. 2).

보관용액별 전체적인 분석결과  $\alpha$ -MEM, HBSS, 우유에 높은 세포생존력을 나타냈고,  $\alpha$ -MEM이 시간에 흐름에 따라 세포 생존력이 가장 높아지는 것을 알 수 있었으며, HBSS와 우유는 시간대 별로 매우 유사함을 알 수 있었다. 또한, 삼투압이 낮은 녹차와 감잎차, 생수는 낮은 세포생존력을 보였다.



**Figure 2.** Comparison on the viability of MC3T3-E1 cells in storage media of 25°C by MTT assay.  $\alpha$  :  $\alpha$ -MEM, H : HBSS, M: milk, G ; green tea, P : persimmon leaf tea, W : mineral water. The viability of osteoblast of 25°C storage media was the highest in  $\alpha$ -MEM.

**총괄 및 고찰**

치아의 외상에 의해 완전 탈구된 치아의 치료법은 재식술을 들 수 있는데 이는 치조와에서 이탈된 치아를 가능한 한 빠른 시간 내에 재식립하는 술식이다. 이 술식이 성공하기 위해서 치아를 적절한 용액에 보관하여 세포의 생존력을 유지해야한다.

본 연구에서는 뼈모세포의 생존력을 위한 보관용액으로는 가장 이상적으로 추천되는 HBSS와 응급상황에서 쉽게 구할 수 있는 우유, 녹차, 감잎차, 생수를, 대조군으로 세포배양액인 10% FBS가 함유된  $\alpha$ -MEM을 사용하였다. 탈구된 치아의 보관 환경은 용액의 구성성분, 온도, pH, 삼투압, 세균의 유무, 필수 영양소 등 여러 요소가 관여하는데<sup>18,22</sup>, 이 중에서도 삼투압과 pH는 세포생존력에 있어 중

요한 인자이다.

Blomlöf 등<sup>40)</sup>은 원숭이의 치아를 우유와 타액, 식염수에서 보관한 후 치주인대세포를 관찰한 결과 타액이나 식염수는 보관시간이 짧을 때는 비교적 우수한 효과를 보였으나, 장시간 보관 시에는 우유에 비해 보관 능력이 떨어졌다고 보고하였다. 타액에서 시간이 지나면서 우유에 비하여 치주인대세포의 효소 활성도가 급격히 감소하였는데 이는 타액 내에는 효소, 박테리아 등의 유해물질이 많이 존재하기 때문이라고 하였다.

Blomlöf<sup>41)</sup>은 NaCl을 타액에 첨가함으로써 삼투압을 높여 식염수와 유사한 수준까지 생존력이 향상됨을 보고 하였다. 그러므로 체내와 유사한 삼투압을 유지하기 위해서는 등장성 용액을 사용해야 한다.

현 등<sup>42)</sup>은 시간 별 치주인대세포 생존력을 비교한 결과 2분 후에 94.06%로 가장 높았고, 5분 후 88.75%, 30분 후에는 72.31%, 120분 후에는 65.87%로서 시간 경과에 따라 생존하는 치주인대세포가 감소하는 것으로 나타났다고 보고하였고, 김 등<sup>43)</sup>은 15분 정도 경과까지는 보관용액의 종류에 상관없이 비슷한 치주인대세포 생존력을 보였으나, 30분 이상 경과하면서 생존력이 급격하게 감소하는 것으로 나타났고, 3시간 이후에는 생존 세포가 거의 관찰되지 않았다고 보고하였다. 이를 착안하여 본 연구에서는 실험시간을 임상적으로 중요하다고 알려진 시점인 30분-3시간으로 설정하였다.

치주인대세포의 생존력을 유지하기 위해  $\alpha$ -MEM, DMEM, HBSS, 우유, 생리식염수, 타액 등과 같은 용액들이 보고되었으나<sup>18,22,42)</sup>, 응급상황에서 구하기 쉽고, 가격이 저렴하며, 세포 생존력이 높은 우유를 보관용액으로 추천하고 있다. Courts 등<sup>44)</sup>에 의하면 우유는 섬유모세포의 생존력과 증식력을 유지시켜줄 뿐 아니라 타액이나 수돗물 및 공기 중에 방치하였을 경우에 비하여 손상 받은 섬유모세포의 회복 능력도 우수하고 염증성 치근 흡

수도 적게 일어난다고 하였다. 이는 우유의 삼투압 농도가 체내의 혈장액이나 조직 배양액과 유사한 반면, 타액의 삼투압 농도는 매우 낮아 세균의 독작용이 증가되기 때문인 것으로 연구되었으며, Blomlöf<sup>43)</sup>은 인간의 치주인대세포를 Eagle 용액과 우유에 보관한 경우 Eagle 용액에 보관한 군에서 치주인대세포를 많이 관찰하였는데, 이는 Eagle 용액 자체가 세포 배양액으로 제조되었고 항생제가 포함되어 있기 때문이라 보고하였다. 또한, 조 등<sup>22)</sup>은  $\alpha$ -MEM에서 가장 많은 치주인대세포가 활성화 상태로 존재하였는데, 이는 보관환경을 다른 것으로 바꾸는 것보다는 처음 배양되었던  $\alpha$ -MEM에서 생존력이 가장 높게 나온 것 같다고 보았다.

본 연구에서도  $\alpha$ -MEM에서 냉장고 온도 4°C와 실온 25°C에 보관한 경우, MC3T3-E1 세포의 생존력이 다른 보관용액에 비해 4°C와 25°C에서 모두 가장 높았고, 시간에 흐름에 따라 4°C가 25°C보다 높은 것을 알 수 있었다. 이는 세포의 배양액인  $\alpha$ -MEM이 287 mosmol/kg 정도의 삼투압과 7.5 정도의 pH를 유지하므로, MC3T3-E1 세포가 생존할 수 있는 적절한 영양소와 삼투압, pH농도를 모두 갖추고 있기 때문인 것으로 생각 할 수 있다 (Table 1, Table 2).

HBSS는 미국 치과 근관치료학회(American Association of Endodontists, 1994)에서 치아의 완전 탈구 시 치주인대세포의 보존을 위한 보관용액으로 추천되는 용액이다<sup>45)</sup>. 생리적으로 적합한 삼투압과 pH를 갖는 비독성 물질로 여러 가지 필수 영양분을 포함하고 있어 세포성장에 도움을 준다는 것이 많은 연구를 통해 밝혀졌다<sup>22,43)</sup>.

본 연구에서도 HBSS에서 냉장고 온도 4°C와 실온 25°C에 보관한 경우,  $\alpha$ -MEM과 우유와 함께 MC3T3-E1 세포의 생존력이 높았는데, 60분 후에 4°C가 25°C보다 높은 것을 알 수 있었다 (Table 1, Table 2).

Lekic 등<sup>46)</sup>에 의하면 우유와 대기 상태에서 4°C, 23°C에 15, 30, 60, 120 분에 보관 시 4°C에서 치주인대세포의 생존력이 높았고, Schwartz와 Andreasen<sup>20)</sup>에 의하면 4, 20, 37°C에서 60, 120, 180분 후 생존력 있는 세포수를 센 결과 우유에서 보관 시에는 거의 모든 세포가 살아있었고, 타액에서는 시간과 온도에 의존적으로 세포수가 감소하였다고 한다. 본 연구에서는 60 분 후 4°C가 25°C보다 더 높았고, 시간에 흐름에 따라 4°C와 25°C에서 유의성 있는 차이를 보이지 않았다. 우유는  $\alpha$ -MEM, HBSS와 함께 뼈모세포의 생존력이 높게 나타났다. 우유군은 시간에 흐름에 따라 4°C와 25°C에서 유의성 있는 차이를 보이지 않았다 (Fig. 1, Fig. 2). 이는 체내와 유사한 304 mosmol/kg 정도의 삼투압과 6.6정도의 pH농도를 가지고 있고, 온도가 낮을수록 세포 부종이 감소하며, 상처 치유 능력을 증진시켜 회복력을 상승시켜 생존력은 높았지만, 본 실험에서 4°C와 25°C에서 별 차이가 없었던 것은 Huang 등<sup>47)</sup>처럼 갑작스러운 온도 변화에 의한 것으로 생각된다. 우유가 다른 보관용액보다 생존력이 높았던 이유는 일반적으로 생리적인 삼투압 농도를 가지고, 아미노산, 탄수화물, 비타민, 지방산, 미량금속 등 중요한 영양소가 함유되어 있으며<sup>48)</sup>, 살균처리가 되어 있어 MC3T3-E1 세포에 해로운 성분이 적기 때문이다. 또한 응급 상황 근처에서 구하기 쉬운 편이며, 3시간 정도까지 치주인대세포 생존력에 효과적으로 작용한다고 하였다<sup>18,23,42-43)</sup>.

황 등<sup>49)</sup>은 녹차가 1 시간 이내의 짧은 시간동안 치주인대세포를 유지하는데 효과가 있었으나 시간이 증가하면서 효과가 없다고 하였고, 녹차추출액에서 HBSS 용액만큼 효과가 있었다고 하였으며, 녹차 티백을 100ml 물에 5분 우린 것의 삼투압이 12mosmol/kg로 매우 낮게 측정되었는데, 본 실험에서도 녹차와 감잎차의 삼투압이 매우 낮아 측정되지 않았고, 녹차와 감잎차도 1 시간 이내에는 효

과가 있었으나 시간이 지남에 따라 효과가 없었으며, 감잎차는 30분까지 4°C에서 HBSS보다 효과가 있었던 것으로 보아 결과가 일치하였다. 이것은 녹차와 감잎차가 항산화, 항암효과를 지닌 catechin과 flavonoid 및 tannin을 함유하고 있어<sup>27-34)</sup> 1시간 이내의 짧은 시간에는 보관용액으로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

탈구된 치아가 일반적으로 실온의 보관용액에 담겨지지만, Sigalas 등<sup>50)</sup>은 낮은 온도가 세포 생존력에 긍정적 영향을 미친다고 결론을 내렸고, Barile<sup>50)</sup>은 낮은 온도가 세포 대사를 줄이는 장점이 있어서 박테리아의 성장을 늦추어 치아 재식의 예후에 영향을 미칠 수 있다고 보았다. 본 연구에서도 보관용액인  $\alpha$ -MEM, HBSS, 우유, 녹차, 감잎차, 생수에서 모두 시간에 흐름에 따라 세포 수가 감소하였지만, 시간에 흐름에 따라 4°C가 25°C보다 높았다.

본 연구에서는 선학들에 의해 치주인대세포의 생존력에서 가장 추천이 되고 있는  $\alpha$ -MEM, HBSS, 우유가 MC3T3-E1 세포의 생존력을 보존시키는 용액으로도 우수한 효과를 지닌 것으로 나타났다. 이들 용액은 모두 체내와 유사한 삼투압과 pH를 지니고 있으며, 이밖에 녹차, 감잎차, 생수 등은 삼투압과 pH가 체내와 부조화를 이루고 있어 세포 생존 조건이 맞지 않아 탈구된 치아를 보관하는 매개체로 적절하지 않았다.

## 참고문헌

1. 대한소아치과학회. 소아청소년치과학. 신흥인터내셔널. 2007서울 592-621
2. 정윤주, 김광철, 박재홍 등. 유치외상에 관한 연구. 대한소아치과학회지 2010;37(3):328-337
3. Petersson EE, Andersson L, Sörensen S. Traumatic oral vs non-oral injuries. Swed Dent J 1997;21:55-68
4. 허수경, 최남기, 김선미 등. 유치와 영구치의 외상에 관한 연구. 대한소아치과학지 2008;35(4):642-651

5. 김종철, 손동수. 서울 지역 중·고등학생의 전치외상에 관한 연구. *대한소아치과학회지* 1979;6:20-24
6. Nazif MM. Intrabony tooth injuries : reports of two case. *ASDC J Dent Child* 1989;56:65-68
7. Snyder CC. Facial injuries from car accidents. *Plastic and Recon Surg* 1967;40:414-425
8. 심현구, 이의웅. 연세대학교 치과병원에 내원한 야간 응급환자의 임상적 연구. *대한구강악면외과학회지* 1985;11:1119-1132
9. Tate RJ. Facial injuries associated with the battered child syndrome. *Br J Oral Surg* 1971;9:41-45
10. Rai SB, Munshi AK. Traumatic injuries to the anterior teeth among Suth Kanara school children-aprevalence study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 1998;16:44-51
11. Wood EB, Freer TJ. A Survey of dental and oral Trauma in southeast Queensland during 1998. *Aust dent J* 2002;47:142-146
12. 유수민, 박호원. 어린이의 외상성 치아 손상에 관한 연구. *한국치위생과학회* 2004;4(1):21-25
13. 김광철, 이궁호. 완전탈구된 치아의 보관방법에 따른 재식 후 치주인대 회복과 섬유아세포의 변화에 관한 연구. *대한소아치과학회지* 1989;16(1):36-56
14. 한유리, 최형준, 이재호 등. 완전탈구된 치아의 지연 재식. *대한소아치과학회지* 2002;29(4):555-560
15. 이세준. 치아 탈구시 처치. *대한치과보존학회지* 1999;24(2):462-9
16. 이동우, 곽지윤, 김성오 등. 재식된 상악 중절치의 장기간에 걸친 추적례. *대한소아치과학* 2004;31(4):729-733
17. 최충호, 정성철, 김종열. 초등학교 학생들의 치아탈구에 대한 학부모의 응급처치 지식에 대한 연구. *한국건강교육학회지* 1992;9(1):30-38
18. 최원경, 최형준, 최병재 등. 수종의 저장용액에서 치주인대세포의 생존율 비교. *대한소아치과학회지* 1999;26(2):427-436
19. Blomlöf L, Andersson L, Lindskog S, et al. Periodontal healing of replanted monkey teeth prevented from drying. *Acta Odontol Scand* 1983;41: 117-123
20. Schwartz O, Andreason JO. Cryopreservation of mature teeth before replantation in monkeys. *Int J Oral Surg* 1983;12:425-436
21. Olson BD, Mailhot JM, Anderson RW, Schuster GS, Weller RN: Comparison of various transport media on human periodontal ligament cell viability. *J Endod* 1997;23:676-679
22. 조재현, 김성오, 최형준 등. 저장용액의 온도에 따른 치주인대세포의 생존율. *대한소아치과학회지* 2007;34(1):36-42
23. B.D.M. Souza, D.D. Luckemeyer, J.F. Reyes-Carmona, et al. Viability of human periodontal ligament fibroblasts in milk, Hank's balanced salt solution and coconut water as storage media. *Int Endo J* 2011;44:111-115, DOI: 10.1111/j.1365-2591.2010.01809.x
24. Martin MP, Pileggi R. A quantitative analysis of Propolis : a promising new storage media following avulsion. *Dent Traumatol* 2004;20:85-89, DOI: 10.1111/j.1600-4469.2004.00233.x
25. Khademi aa, Saei S, Mohajeri MR, Mirkheshti N, Ghassami F, Torabinia N, et al. A new storage medium for an avulsed tooth. *J Con Dent Pract* 2008;9:25-32
26. Dos Santos CL, Sonoda CK, Poi WR, Panzarini SR, Sundefeld ML, Negri MR. Delayed replantation of rat teeth after use of reconstituted powdered milk as a storage medium. *Dent Traumatol*. 2009;25:51-57, DOI: 10.1111/j.1600-9657.2008.00723.x.
27. 오중학, 김은희, 김정례 등. DPPH 방법을 통한 녹차의 항산화 활성에 대한 연구, *한국식품영양과학회지* 2004;33(7):1079-1084
28. 박윤주, 강명희, 김종익 등. 감잎의 처리방법과 추출 조건에 따른 감잎차의 VitaminC와 Superoxide Dismutase(SOD) 유사활성의 변화. *한국식품과학회지* 199;527(3): 281-285
29. 이호선, 손종연. 시판 녹차, 홍차, 오롱차의 항산화 및 상승효과. *한국식품영양회* 2002;15(4):377-381
30. 정창호, 강수태, 주옥수 등. 국내 시판 녹차, 보이차, 우롱차 및 홍차의 폴리페놀함량, 항산화 및 아세틸콜린에스테라이스 저해 효과. *한국식품저장유통학회* 2009;15(2):230-237
31. 정숙현 : 감잎차의 ethanol 추출물 및 분획물의 항균효과. *한국차학회*2009;15(2):99-106
32. 안봉전, 배만종, 최희진 등. 한국산 감잎로부터 Polyphenol계 생리활성물질분리. *한국식생활문화학회지*

- 2002;45(4):212-217
33. 오현명, 김미경. 감잎, 녹차의 건분 및 물, 에탄올추출물이 노령쥐의 지방대사와 항산화능에 미치는 영향. 한국영양학회지 2001;34(3):289-298
  34. 김호정, 김미경. 감잎의 물 및 에탄올 추출물이 한국인 위암 세포주에 미치는 항암효과. 한국영양학회지 2003;36(2):133-146
  35. 양미영, 최기운, 민병순 등. 수종 치근단 역충전 재료가 배양된 치주인대 섬유모세포 및 뼈모세포의 활성화에 미치는 영향. 대한치과보존학회지1999;24(1):76-87
  36. Aukhil I, Nishimura K, and Fernyhough W. Experimental regeneration the periodontium. *Critical Reviews Oral Biology and Medicine* 1990;1:101-115
  37. Nanci, A. Ten Cate's Oral histology: Development, structure, and function. Mosby 2008;239-267
  38. Nanci, A. Ten Cate's Oral histology: Development, structure, and function. Mosby 2008;108-140
  39. Casaroto AR, Hidalgo MM, Sell AM, Franco SL, Cuman RK, Moreschi E. et al. Study of the effectiveness of propolis extract as a storage medium for avulsed teeth. *Dent Traumatol.* 2010;26:323-331, DOI: 10.1111/j.1600-9657.2010.00879.x.
  40. Blomlöf L, Lindskog S, Hedström KG, Hammarström L. Vitality of periodontal ligament cells after storage of monkey teeth in milk or saliva. *Scand J Dent Res.* 1980;88(5):441-445.
  41. Blomlöf L. Storage of human periodontal ligament cells in a combination of different media. *J Dent Res.* 1981;60(11):1904-1906.
  42. 현원섭, 김광철, 이근호. 치주인대 세포의 보관방법에 따른 생활력에 관한 연구. 대한소아치과학회지, 1994;21(1):193-208
  43. 김수경, 김광철. 수종의 보관 용액에 따른 치주인대세포의 생활력 비교 평가. 경희대학교 : 석사논문 2011
  44. Courts FJ, Mueller WA, Tabeling HJ. Milk as an interim storage medium for avulsed teeth. *Pediatr Dent* 1983;5(3):183-186.
  45. 김의성, 이승중. MTT 검색법을 이용한 쥐 치아 치주인대세포의 활성화도 평가. 연세대학교 : 박사논문 2003
  46. Lekic PC, Kenny DJ, Barrett EJ. The influence of Storageconditions on the clonogenic capacity of periodontal ligament cells: implications for tooth replantation. *Int Endod J* 1998;31:137-140
  47. 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
  48. 주미란, 고영수. 시판 우유 및 조제 분유의 화학적 성분에 관한 연구. 한국생화학학회지 1998;16:117-137
  49. 황지영, 최성철. 완전탈구치의 새로운 저장매체로서 녹차추출물의 사용. 경희대학교 : 석사논문 2011
  50. Sigalas E, Regan JD, Kramer PR, Witherspoon DE, Opperman LA. Survival of human periodontal ligament cells in media proposed for transport of avulsed teeth. *Dental Traumatology* 2004;20;21-28, DOI: 10.1111/j.1600-4469.2004.00219.x
  51. Barile FA. Introduction to In Vitro Cytotoxicology : Mechanisms and Methods. Boca Raton, FL: CRC Press. 1994

## ABSTRACT

# Study on viability of MC3T3-E1 cell in storage solutions for tooth avulsion

Yuri Kim<sup>1</sup>, Heesu Lee<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Department of Anatomy and Cell Biology, School of Medicine, Kangwon National University,*

<sup>2</sup>*Department of Anatomy, College of Dentistry, Research Institute of Oral Science Gangneung-Wonju National University*

This study was to compare the viability of MC3T3-E1 cells in different storage solutions for tooth avulsion. MC3T3-E1 cells were cultured in 4°C or 25°C in  $\alpha$ -MEM, HBSS, milk, green tea, persimmon leaf tea and mineral water for 30, 60, 90, 120 and 180 minutes. This study was to compare the viability of cells, by MTT assay. Each storage media's osmolality and pH were measured. The results are as follows.

The viability of osteoblasts in 4°C  $\alpha$ -MEM was higher. ( $\alpha$ -MEM > HBSS  $\approx$  milk > persimmon leaf tea > green tea > mineral water) The viability of osteoblasts in 25°C  $\alpha$ -MEM was higher. ( $\alpha$ -MEM > HBSS  $\approx$  milk > persimmon leaf tea > green tea > mineral water). The viability of osteoblasts in all storage media were higher at 4°C than at 25°C as time goes by.

$\alpha$ -MEM was the most effective storage media for conserving MC3T3-E1 cells. Since milk is easily obtained at emergency situation, 4°C milk would be recommended as the medium for storing osteoblasts.

**Keywords:** MC3T3-E1 cells, Storage media, MTT assay, cell viability, Temperature