

수소이온 농도의 변화가 배양 인체 치주인대 세포의 활성에 미치는 영향

김성호 · 박귀운 · 유형근 · 신형식

원광대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서 론

구강 내에는 다양한 기능을 가지고 있는 타액^{1,2)}과 치주질환의 심도 및 활성도를 반영하는 치은열구 삼출액이 존재한다³⁾. 다수 조직의 복합체로 이루어진 구강 내에서 유동성 물질인 타액과 치은열구 삼출액이 치주질환에 미치는 영향에 대한 많은 연구가 있었고^{4,5)}, 치주질환의 심도에 따른 타액과 치은열구삼출액의 조성 변화 및 수소이온 농도 변화에 대한 연구 또한 있었다⁶⁻⁹⁾. Mandel등⁹⁾은 심한 치석형성군의 타액에서 요소와 단백질 농도가 증가하며, 타액내 단백질은 칼슘과 친화성이 강하기 때문에 수소이온 농도 상승 시에 단백질과 결합하는 칼슘의 양이 증가한다고 하였다. 한편 Kleinberg와 Jenkino는¹⁰⁾ 치태의 구강내 분포와 수소이온 농도에 관한 연구에서, 염기성이 높은 부위가 높은 치주질환의 발생 빈도를 보인다고 보고했다. 또한 최와 이¹¹⁾는 타액의 수소이온 농도가 상승함에 따라 치석 지수가 증가하나 치주질환 지수와는 통계학적 유의성이 없다고 보고하였다.

치은열구의 구조와 기능에 중요한 역할을 하는 치은열구 삼출액은 세균, 탈락 상피 세포, 백혈구 등의 세포 성분, 전해질인 Na, K, Ca, 유기 성분인 탄수화물과 단백질, IgG, IgA, IgM, albumin과 fibrinogen 등의 혈장단백, 유산, 요소, 내독소, 황화 수소 등의 대사 산

물과 acid phosphatase와 lactic dehydrogenase 등의 효소를 포함하고 있다^{1,3,12-14)}. Urban등¹⁵⁾은 치은열구 삼출액의 양이 염증 및 치주낭 깊이와 상관관계가 있다고 하였으며, Borden등¹⁶⁾은 치은염증시 열구의 깊이가 깊을수록 치은열구 내의 수소이온 농도가 상승함을 보고했다. Bickel등⁶⁾은 치은열구 삼출액의 양과 수소이온 농도 사이에 상관관계가 있다고 하였다. 또한 Tenenbaum등^{4,5)}과 Rapp등¹⁷⁾은 치석이 없는 군과 치석이 있는 군의 타액 비교시 치석 형성이 있는 군에서 칼슘 및 인산염의 농도 증가와 수소이온 농도의 상승을 보고했다. Warren¹⁸⁾은 모든 생물학적인 체액에서 이온화 및 비이온화된 형태로 존재하는 암모니아의 독성과 pH에 관한 연구에서, 두 가지 형태의 암모니아 비율은 주로 체액의 pH에 의해 결정되며, 독성은 유기체내로 들어가는 암모니아에 의해 좌우되는데, 낮은 pH에서는 암모니아의 양이 과량일 때만 독성이 있는 반면, 높은 pH에서는 소량의 암모니아만으로도 치명적 일수 있고, 비이온화된 암모니아가 이온화된 암모니아보다 용이하게 조직 표면을 통과한다고 하였다. 그러므로 치은열구내의 대사 산물인 이산화탄소와 요소에 의한 pH의 증가, 요소의 산물인 암모니아의 독성과 열구상피세포에 대한 투과성 등이 직, 간접적으로 치주질환 발생의 인자가 됨을 보여주고 있다.

전술한 상기의 원인 이외에 구강 내에서 수

소이온 농도를 변화시키는 또하나의 요인은 다양한 치과 재료이다. 특히 1930년 Hederman¹⁹⁾에 의해 근관충진제로 개발된 calcium hydroxide ($\text{Ca}(\text{OH})_2$)는 상아 세관을 통해 상아질과 치근면에 수소이온 농도를 상승시키는 것으로 알려져 있다²⁰⁻²²⁾. 이 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 는 치주치료후 치유 과정을 저해하는 영향을 미치는 것으로 최근 보고^{23,24)}되고 있으나 아직 그 기전 규명이 불투명한 상태이다.

일반적으로 연조직 손상시 초기에는 상피 세포가 혈관을 비계 삼아 창상 중앙부로 이주된 세포는 세포끼리 접촉하여 접촉 저해 현상이 초래된다. 이때부터 세포들은 분화하여 신속한 속도로 증식하여 중층 배열로 환원된다. 창상 심부의 섬유모세포는 급속히 증식하여 새로운 결체조직구성 물질을 생성한다. 이어 점진적으로 혈관이 제거되어 육아 조직으로 대치되는 과정을 밟는다²⁵⁾.

치주조직의 치유 과정에서 섬유모세포는 치근표면에 치은결체조직의 부착에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁶⁾. 또한 Lowenberg²⁷⁾들은 기질 표면에 세포의 이주와 부착의 중요성을 인식하고 세포 활성의 증진을 위해 *in vitro* 상에서 치면에 교원질을 처리하고 치주인대세포를 부착시켜 봄으로써 치아매식학에 좀더 확고한 골 동화를 도모한 바 있다²⁷⁾.

치주조직의 창상 치유에 있어 기질인 치근면에 치주인대세포가 부착과 아울러 분화 증식되는 것은 세포 기능의 중요한 점으로 이미 밝혀진 바 있으나 콜라젠과 같은 구조적 단백질 합성을 위해서 치주인대는 반드시 치근표면에 부착이 되어야만 한다²⁸⁾. 또한 세포의 분열 능력은 창상 치유 과정에서 중요한 요인 중의 하나라는 것은 이미 잘 알려진 사실이다²⁹⁾. 이러한 세포의 부착과 분화 증식 및 확산에 중요한 변수로 작용하는 것중 하나가 수소이온 농도이다. 즉 최근의 연구에서 Lengheden³⁰⁾은 치주인대세포의 부착에 가장 적합한 농도를 pH 7.2로 측정하고 세포 성장 실험에서 수소이온 농도가 증가함에 따라 세포 성장이 점차적으로 방해를 받는다고 발표하였다. 그리고 Lengheden과 Jansson은³¹⁾ 치주인대 섬유모세포에서

최대의 DNA합성을 보이는 농도는 pH 7.5 라고 보고하였다. 그는 또한 pH 7.8 이상의 농도에서 모든 세포의 성장은 표면의 blebbing과 더불어 세포내 다양한 크기의 공포를 보여주었다고 했다. 즉 세포 독성의 지침이 되는 형태적인 변형을 보고했다. 또한 Lengheden³⁰⁾, Ham과 McKeehan⁴¹⁾, McAteer와 Douglas⁴²⁾는 이주와 같은 섬유모세포의 기능을 위한 적절한 농도는 pH 7.2에서 7.5 사이라고 하였으며, 어떤 종류의 세포들은 pH 6.6에서 7.8 범위의 농도를 견딜 수도 있다고 보고하였다.

따라서, 본 연구는 구강내 다양한 환경 변화로 인해 바뀌어지는 수소이온 농도가 치주 질환의 치유 과정에 미치는 영향을 규명하기 위해 단계적인 연구로써 최소한의 환경 변화로 세포 반응을 규명할 수 있는 실험실적 연구를 진행하였다. 환경 변화를 위해 세포 배양액의 수소이온 농도를 달리하여 치주인대세포가 기질면 부착 과정에 어떠한 영향을 받으며 부착 후의 세포 활성화에 나타나는 반응을 규명하기 위해 배양한 치주인대세포에 수소이온 농도를 달리하여 세포의 부착 정도와 부착된 세포의 형태, 활성화도 및 증식도를 평가했다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 연구 재료

1) 치주인대세포의 준비

본 연구에 사용된 치주인대 세포는 교정 목적으로 발치 한 소구치나 제 3 대구치에서 얻어졌다. 발치에 앞서 치은의 건강 상태는 임상 및 방사선학적으로 평가되었다. 치아의 치근 중간 1/3에서 절제한 치주인대조직은 40 % 우태아 혈청 (Fetal bovine serum, Gibco Co., USA)과 20 % 항생제(Penicillin G, Streptomycin, Amphotericin B 포함, Gibco Co., USA)를 가한 α -MEM(Minimal Essential Medium, Gibco Co., USA)으로 3회 세척하였다. 치주인대 조직을 세척한 후 60 mm 세포 배양용 배양 접시 (Nunc Co., USA)로 옮겨 약 1 mm²로 세절하였다. 세절한 조직은 20분간 37°C, 5 % CO₂, 습도 100%의 배양기(Bantex 1820 IR,

SHELL-LAB, USA) 에서 배양 접시에 고르게 부착이 되도록 배양시킨 후, 각 배양 접시당 2ml의 10 % 우태아 혈청과 1% 항생제를 포함한 α -MEM을 가하고 단일 세포층이 형성될 때까지 3일 간격으로 배양액을 교환하였다. 3 일간 배양후 배양액을 제거하고 HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Gibco Co., USA)로 2회 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 부착된 세포의 분리를 위해 HBSS를 제거한 후 0.25% Trypsin/EDTA (10%, Gibco Co., USA)를 배양접시당 2ml씩 넣고 원심 분리용 시험관으로 옮겨 1,200 rpm 으로 10분간 원 침하였다. 원침 후 상청액을 제거하고 HBSS를 가하여 세척한 후 Vortex mixer로 혼합하고 세포 부유액을 만들어 60 mm 배양 접시에 분 주하였다. 배양액은 세포의 충분한 증식이 명확히 나타날 때까지 2일 혹은 3일 간격으로 교환하였다. 본 실험에서는 4회 내지 5회 계대 배양한 치주인대세포를 이용하였다.

2) 배양액의 준비

배양액 속에서 각기 다른 수소이온 농도를 만들기 위해 1 M NaOH와 1N HCl을 이용하여 pH meter를 통해 6.6에서 8.2까지 0.2 간격으로 조정되었다. 본 실험에 사용된 대조군의 pH 는 7.4였는데, 이는 시약을 첨가하지 않은 본래의 배양액의 농도가 7.4를 보였기 때문이다.

2. 연구 방법

(1) 수소이온 농도의 변화가 세포의 부착에 미치는 영향

1) MTT assay에 의한 평가

실험 당일 35 mm plate에 3×10^4 개의 세포로 분주하고 분주와 동시에 이미 준비해 놓은 수소이온 농도 6.6에서 8.2까지 0.2간격으로 조정된 배양액을 가하여 24시간과 48시간동안 세포의 부착율을 평가했다. 각군의 세포 부착율을 간접적으로 평가하기 위해 부착된 세포의 세포 활성을 측정했다. 24시간과 48시간 동안의 부착 기간을 준후 식염수에 용해한 MTT(3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide : No. M2128, Sigma Co., St. Louis

MO, USA) 용액 50 μ l를 각 well에 넣고 3시간 동안 배양후 MTT 용액을 버리고, DMSO를 50 μ l씩 첨가하여 Formazan 결정을 용해 시킨 후 세포 활성도의 측정을 위해 96 well plate 상으로 옮겼다. Plate를 잘 흔든 후 ELISA analyser (Model ETY-96, Toyo instruments Inc., Tokyo, Japan)에 plate를 넣은 다음 630 nm 를 기준으로 570 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 실험은 각 군마다 4배수로 시행하였으며, 매 실험마다 실험 용액이 들어 있지 않은 배양액을 대조군으로 하여 모든 실험 결과는 다음과 같이 대조군의 백분율로 산출 하였다.

세포 활성도 (%) = 실험 well의 흡광도 / 대조 well 의 흡광도 \times 100

2) 세포수 산정에 의한 평가

실험 당일 35 mm plate에 3×10^4 개의 세포로 분주하고 분주와 동시에 이미 준비해 놓은 수소이온 농도 6.6에서 8.2까지 0.2간격으로 조정된 배양액을 가하여 24시간과 48시간동안 세포의 부착율을 평가했다. 배양 1일과 2일째에 각군의 부착도를 평가하기 위해 도립 현미경상 (Inverted Microscope, IMT-2-21, Olympus, Tokyo, Japan)에서 세포수를 산정해서 세포의 부착 정도를 평가했다.

(2) 세포의 형태 관찰

상기 농도로 24, 48시간 동안 배양된 치주인대세포의 형태를 전자현미경으로 관찰하기 위하여 실험 마지막날에 배양된 세포를 0.1 M cacodylate buffer(PBS, PH 7.0-7.4)로 부드럽게 세척해 주고, Karvonsky's solution (1% glutaraldehyde와 1% formaldehyde 혼합액(0.1 M phosphate buffer, pH 7.3))으로 1차 고정을 실시한 후 1시간 동안 냉장실에 보관하였다. 그후 다시 0.1 M Cacodylate buffer로 3회 세척하고 Osmium tetroxide로 후고정을 실시한 후 1 시간 동안 냉장실에 보관하였다. 마지막으로 0.1 M cacodylate buffer 로 3회 세척후 50%, 70%, 90%, 100% 알코올에서 5-10분간 탈수를 실시하고 건조하였다.

그후 완전히 건조된 것을 확인하고 각각의 시료를 알루미늄계의 시료대에 silver paste로 고정 한 후에 ion sputtering/vacuum evaporation에 의해 금을 600Å의 두께로 입힌 후 주사 전자 현미경 (HITACHI X-650 Scanning Electron Microanalyzer, Tokyo, Japan)으로 모두 동일하게 500배의 배율로 관찰하였다.

3) 세포의 활성화 및 증식도의 평가

실험 전일 24 well plate에 분주한 치주인대 세포에 이미 준비한 수소이온 농도 6.6에서 8.2까지의 배양액을 가하고 24, 48, 72시간을 더 배양하였다.

배양 마지막날 치주인대세포를 4% paraformaldehyde로 15분간 고정 한 후 PBS로 세척하였고 일차항체인 PCNA(monoclonal, Dako, Glostrup, Denmark)를 적정 농도로 생각되는 1:150으로 희석하여 1시간 동안 부란시키고 PBS를 사용하여 세척한 후 이차 항체(anti-mouse Ig G)를 20분간 처리하였다. 그후 Streptavidine alkaline phosphatase 로 20분간 처리한 후 Aminoethylcarbazole(AEC)로 발색시킨 후 검경하였다. PCNA 계측은 광학현미경(100배)으로 3부위 이상 사진 촬영하여 핵내에 중등도 이상 염색된 것을 양성으로 판정하였으며, 3명의 관찰자가 각각의 사진에서 세포 수를 계측하여 양성 세포 수를 측정 세포 수로 나누고 백분율로 환산하여 PCNA 지수를 구하

였다.

또한 세포의 부착도 평가와 같은 방법으로 MTT assay에 의해서도 각군 세포의 활성도를 평가했다.

4) 통계 처리

각 농도와 시간에 따른 대조군에 대한 백분율로 환산된 세포 활성화의 평균과 표준편차를 구하고 이들의 통계학적인 유의성은 일원 분산 분석법(ANOVA)과 Duncan's multiple range test 를 이용하여 통계 분석하였다.

III. 연구 결과

1. 수소이온 농도의 변화가 세포의 부착에 미치는 영향

1) MTT assay에 의한 평가

수소이온 농도를 각기 달리해 만든 배양액을 치주인대세포에 가했을 때 실험 1일째 대조군에 비해 pH 6.6에서 96.35±5.63%의 부착율을 보였고, pH 6.8에서는 93.24±1.97%의 부착율을 보였다. pH 7.0에서는 94.07±3.85%의 부착율을 보였으나 pH 7.2에서는 대조군에 비해 통계학적 유의성은 없었으나 105.37±3.67%의 부착율을 보였다 (P<0.05). pH 7.6에서는 대조군과 유사한 부착율을 보였으나 pH 7.8, pH 8.0, pH 8.2에서 각각 80.68±3.94%, 78.25±4.54%, 80.37±0.99%의 부착율을 보였으며 이는

Table 1. pH effects on attachment of periodontal ligament cells at 1st, 2nd day by MTT assay (n=5).

pH Time	6.6	6.8	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8	8.0	8.2
1st day	96.35± 5.63	93.24± 1.97 †	94.07± 3.85	105.37± 3.67	100.00± 4.59 †	92.56± 3.68	80.68± 3.94 †	78.25± 4.54 †	80.37± 0.99 †
2nd day	82.02± 7.50	111.27± 1.26	113.75± 5.46	148.59± 1.83 †	100.00± 7.36 †	96.60± 8.10	89.05± 3.93	74.03± 1.99 †	62.45± 1.37 †

Control group : pH 7.4

Cell attachment after 1st, 2nd and 3rd day with different pH concentrations. MTT activity is expressed in mean±S.D (%) of attached cells in media. †, ‡ : Statistically different from control group (P<0.05)

통계학적으로 유의성이 있게 감소하였다 ($P < 0.05$).

배양 2일째에는 낮은 pH에서 pH 6.6의 $82.02 \pm 7.50\%$ 를 제외하고는 pH 6.8, pH 7.0, pH 7.2에서 각각 $111.27 \pm 1.26\%$, $113.75 \pm 5.46\%$, $148.59 \pm 1.83\%$ 의 통계학적으로 유의성 있는 세포 부착율의 증가를 볼 수 있었다 ($P < 0.05$). 반면 pH 7.6에서는 대조군과 유사한 수준의 부착율을 보였지만, pH 7.8 이상에서는 통계적으로 유의성 있게 감소한 부착율을 보였다 ($P < 0.05$) (Table 1).

2) 세포수 산정에 의한 평가

수소이온 농도를 각기 달리해 만든 배양액을 치주인대세포에 가했을 때 실험 1일째 대조군에 비해 pH 6.6에서 $97.86 \pm 4.46\%$ 의 부착율을 보였고, pH 6.8에서는 $96.68 \pm 5.79\%$ 의 부착율을 보였다. pH 7.0에서는 $98.70 \pm 2.57\%$ 의 부착율을 보였고, pH 7.2에서는 $98.09 \pm 3.89\%$ 의 부착율을 보였다. pH 7.6에서는 대조군과 유사한 부착율을 보였으나 pH 7.8, pH 8.0, pH 8.2에서 각각 $82.14 \pm 5.46\%$, $61.84 \pm 5.54\%$, $71.43 \pm 5.19\%$ 의 부착율을 보였으며 이는 통계학적으로 유의성이 있게 감소했다 ($P < 0.05$).

배양 2일째에는 pH 6.6에서 $93.02 \pm 7.68\%$ 을 제외하고는 pH 6.8에서는 $95.47 \pm 3.54\%$, pH 7.0에서는 $102.53 \pm 4.65\%$, pH 7.2에서는 $106.80 \pm 3.91\%$ 의 부착율을 보였다. 반면 pH 7.6과

7.8에서는 대조군과 유사한 수준의 부착율을 보였지만, pH 7.8 이상에서는 통계적으로 유의성 있게 감소한 부착율을 보였다 ($P < 0.05$) (Table 2).

2. 세포의 형태 관찰

전자현미경 (HITACHI X-650 Scanning Electron Microanalyzer, Tokyo, Japan)으로 모두 동일하게 500 배의 배율로 관찰한 치주인대세포의 형태는 대조군인 pH 7.4에서는 정상적인 세포돌기를 보이며 정상적인 세포의 형태를 보여주었다. pH < 7.4에서는 대조군에 비해 모양으로는 그리 큰 변화를 보이지는 않았으나, 대조군에 비해 세포의 크기가 약간 증가된 모습을 보였고, 세포 간극이 넓어져 있음을 볼 수 있었다. 그러나 pH 7.6 이상의 고농도에서는 배양 1일군, 2일군 모두 세포의 형태에서 돌기들이 상실된 모습을 볼 수 있었고 대조군에 비해 전체적으로 세포의 용적이 줄어든 모습과 저농도의 pH에서보다 더 넓은 세포 간극을 보여주었다. (사진부도)

3. 세포의 활성화 및 증식도 평가

1) MTT assay를 이용한 세포 활성화도의 평가

수소이온 농도를 각기 달리해 만든 배양액을 치주인대세포에 가했을 때 실험 1일째 대조군에 비해 pH 8.2에서 $80.98 \pm 5.71\%$ 의 통계학적

Table 2. pH effects on attachment of periodontal ligament cells at 1st, 2nd day by cell counting. (n=5)

pH Time	6.6	6.8	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8	8.0	8.2
1st day	97.86 ± 4.46	96.68 ± 5.79	98.70 ± 2.57	98.09 ± 3.89	100.00 ± 2.67	92.12 ± 6.76	82.14 ± 5.46 †	61.84 ± 5.54 †	71.43 ± 5.19 †
2nd day	93.02 ± 7.68	95.47 ± 3.54	102.53 ± 4.65	106.80 ± 3.91	100.00 ± 3.65	93.74 ± 4.76	90.46 ± 6.57	73.14 ± 5.36 †	75.37 ± 3.71 †

Control group : pH 7.4

Cell attachment after 1st, 2nd and 3rd day with different pH concentrations. Number of attached cell is expressed in mean \pm S.D (%) of attached cells in media. †, ‡ : Statistically different from control group ($P < 0.05$)

으로 유의성 있는 활성도의 감소를 보였지만, 전 농도 모두 대조군과 유사한 세포의 활성도를 보였다. 배양 2일째에는 pH 7.6에서 대조군에 비해 최고 135.29±6.78%의 유의성 있는 활성의 증가를 보였고 (P<0.05), 전 농도군 모두 대조군에 비해 통계학적인 유의성은 없으나 약간 증가된 활성도를 나타냈다 (P<0.05). 배양 3일째에도 역시 배양 2일째와 유사한 양상을 보였다. 그러나 pH 8.0과 pH 8.2에서 대조군에 비해 각각 88.54±2.91%, 88.64±2.75%의 통계학적으로 유의성 있게 감소된 세포의 활성도가 주목되었다(P<0.05). 3일째에도 마찬가지로 pH 7.6에서 대조군에 비해 최고 113.57±3.97%의 통계학적으로 유의성 있는 세포 활성의 증가가 관찰되었다 (P<0.05) (Table 3).

2) PCNA 지수를 이용한 세포의 증식능 측정

세포주기중 증식력이 왕성한 G1과 S기 사이에 있는 세포들의 수를 알기 위해 면역조직화학염색법으로 평가한 결과 배양 1일, 2일, 3일

모두 대조군인 pH 7.4보다 낮은 PCNA 지수를 보였다. 배양 1일째에 pH 7.4에서는 3.51±0.29개의 세포가 보였고, pH 7.2에서 최대의 활성인 3.98±0.49개의 통계학적으로 유의성이 있는 세포수의 증가가 보였다 (P<0.05). 반면 그 외의 농도에서는 대조군에 비해 증식이 활발한 세포수의 감소를 볼 수 있었다. pH<7.2의 저농도에서 보다 pH>7.8 이상에서는 대조군에 비해 통계학적으로 유의성 있는 세포수의 감소가 주목되었다 (P<0.05). 배양 2일째에는 대조군에 비해 pH 7.0에서 최대 4.73±0.37개의 세포수의 증가를 볼 수 있었지만, 그 이외의 농도에서는 배양 1일째와 마찬가지로 증식 능력이 있는 세포수의 감소가 주목되었다. 배양 3일째에는 배양 1일과 2일째와 비슷한 양상을 보였다.

전군 모두 pH>7.8에서 통계학적으로 유의성 있게 (P<0.05) 대조군인 pH 7.4에 비해 증식이 활발한 세포의 수가 현저히 줄어든 것을 볼 수 있었다 (Table 4) (사진부도).

Table 3. pH effects on Cellular activities of Periodontal Ligament Cells at 1st, 2nd, 3rd day. (n=5)

pH Time	6.6	6.8	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8	8.0	8.2
1st day	98.19 ± 6.93	104.56 ± 1.20	105.42 ± 8.31	104.27 ± 7.16	100.00 ± 9.02 †	91.11 ± 6.16	93.36 ± 2.91	95.14 ± 2.18	80.98 ± 5.71 †
2nd day	111.83 ± 1.66	123.30 ± 8.87	111.49 ± 2.12	98.43 ± 1.49	100.00 ± 1.08 †	135.29 ± 6.78 †	112.07 ± 5.76	97.54 ± 2.41	97.88 ± 2.67
3rd day	108.27 ± 6.22	104.05 ± 1.53	104.24 ± 6.93	93.11 ± 4.48	100.00 ± 0.70 †	113.57 ± 3.97 †	103.23 ± 0.63	88.54 ± 2.91 †	88.64 ± 2.75 †

Control group : pH 7.4

Cellular activity after 1st, 2nd and 3rd day in media with different pH. Cellular activity is expressed in mean(%)±S.D of cell in media. †, ‡, † : Statistically different from control group (P<0.05)

Table 4. pH effects on Cellular activities of Periodontal Ligament Cells at 1st, 2nd, 3rd day by PCNA index. (n=3)

pH Time	6.6	6.8	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8	8.0	8.2
1st day	2.43 ± 0.31 † (69.23)	3.56 ± 0.26 (101.42)	3.38 ± 0.31 (96.29)	3.98 ± 0.49 † (113.39)	3.51 ± 0.29 (100.00)	2.56 ± 0.33 (72.93)	1.34 ± 0.24 † (38.18)	1.01 ± 0.65 † (28.77)	1.34 ± 0.32 † (38.18)
2nd day	2.36 ± 0.39 † (52.21)	3.46 ± 0.25 † (76.55)	4.73 ± 0.37 (104.65)	3.50 ± 0.32 † (77.43)	4.52 ± 0.33 (100.00)	4.55 ± 0.28 (100.66)	3.52 ± 0.27 † (77.88)	2.23 ± 0.56 † (49.34)	1.44 ± 0.37 † (31.86)
3rd day	2.17 ± 0.37 † (51.54)	3.75 ± 0.24 † (89.07)	4.53 ± 0.24 (107.60)	3.90 ± 0.39 (92.64)	4.21 ± 0.27 (100.00)	3.56 ± 0.21 † (84.56)	2.56 ± 0.25 † (60.81)	2.02 ± 0.46 † (47.98)	1.23 ± 0.27 † (29.22)

Control group : pH 7.4

Cellular activity after 1st, 2nd and 3rd day in media with different pH. Proliferating index is expressed in mean(%)±S.D of cell in media. †, ‡, †: Statistically different from control group (P<0.05)

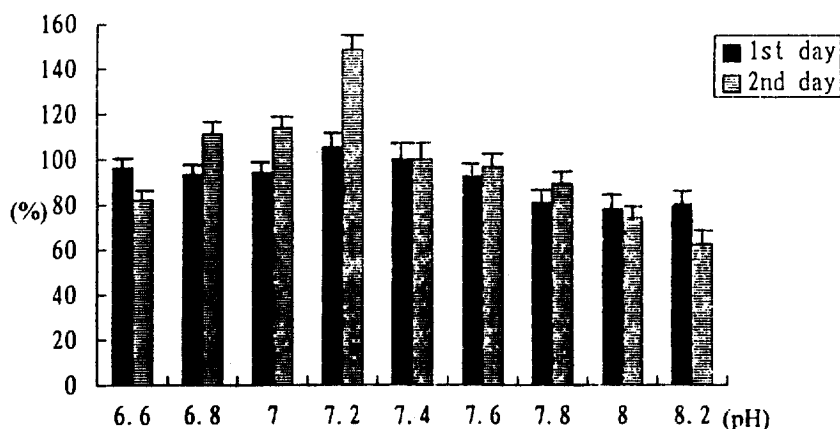


Fig 1. pH effects of attachment of periodontal ligament cells at 1st, 2nd day by MTT assay. Time course of different pH concentration on periodontal ligament cells assayed by MTT. Confluent cultures were incubated with different pH concentration 1st, 2nd and 3rd incubation day. Values are mean±S.D of four to five cultures of representative experiment from a total five experiments.

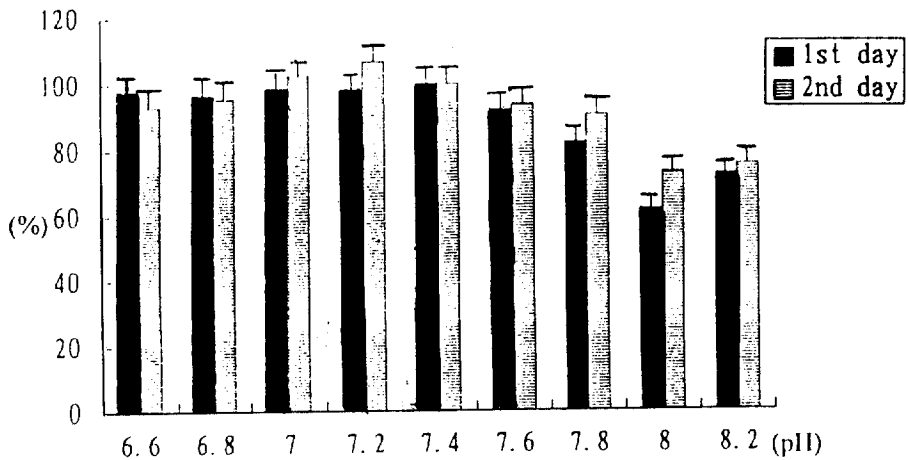


Fig 2. pH effects of cell attachment of periodontal ligament cells at 1st, 2nd day by cell counting. Time course of different pH concentration on periodontal ligament cells assayed by Cell count. Confluent cultures were incubated with different pH concentration 1st, 2nd and 3rd incubation day. Values are mean \pm S.D of four to five cultures of representative experiment from a total five experiments.

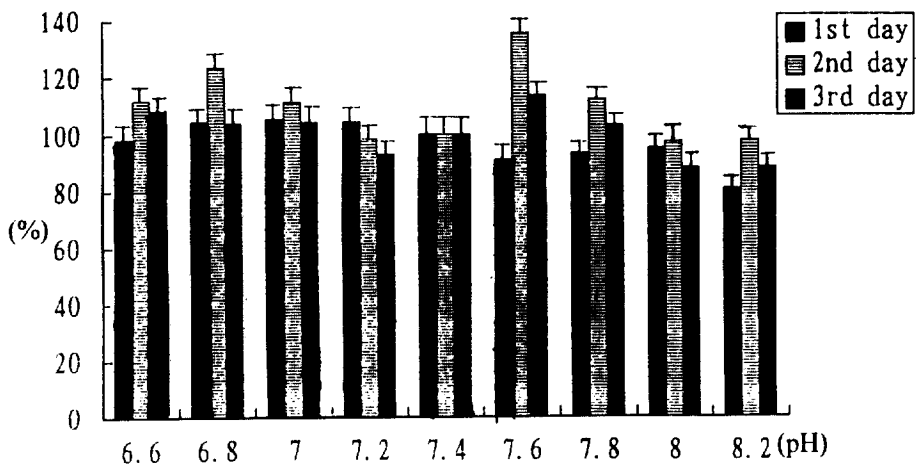
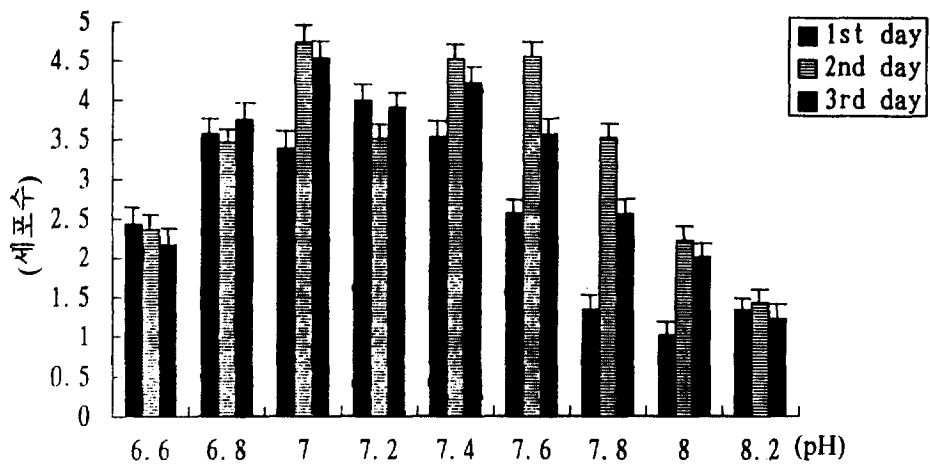
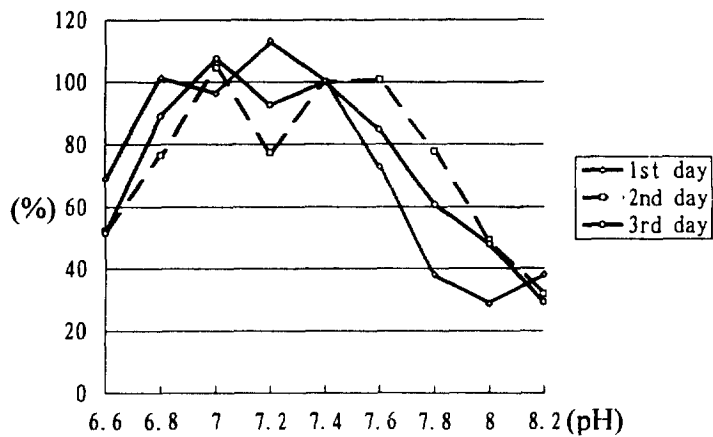


Fig 3. pH effects on cellular activities of periodontal ligament cells at 1st, 2nd, 3rd day by MTT assay. Time course of different pH concentration on periodontal ligament cells assayed by MTT. Confluent cultures were incubated with different pH concentration 1st, 2nd and 3rd incubation day. Values are mean \pm S.D of four to five cultures of representative experiment from a total five experiments.



(A)



(B)

Fig 4. pH effects on cellular activities of periodontal ligament cells at 1st, 2nd, 3rd day by PCNA index.

(A) Number of immunostained cell

(B) % of control value

Time course of different pH concentration on periodontal ligament cells assayed by PCNA index. Cells were cultured with different pH concentration for 1st, 2nd, 3rd incubation day. PCNA index was determined by method described in Material and Methods. Data are mean \pm S.D of four to five cultures of representative experiment from a total three experiments.

IV. 총괄 및 고찰

이상적인 치주치치의 목적을 달성하기 위해서는, 치주인대세포의 이주 능력과 DNA 합성 능력 즉, 세포의 활성 및 증식력이 요구되어진다. 근래의 치주치료의 개념을, 단순한 치주낭의 제거라는 개념이 아닌, 치주인대세포의 선택적인 이주와 증식을 요구하는 진정한 의미의 재생이라는 관점에서 보면 치주인대세포의 치근면으로의 선택적인 이주와 부착은 매우 중요하다. Bruce³²⁾는, 섬유모세포의 이주와 증식이 치주인대세포의 구조적인 단백질의 재건과 합성의 전구 조건이라 하였다. 치주인대세포는 풍부한 세포의 기질 합성을 갖는 고도로 조직화된 세포내 기관을 가진 세포극성을 가지고 있다^{33,34)}. 또한 매우 높은 교원질 합성율을 보이고 신생 교원질 분자의 중합에 가장 효과적이며³⁵⁾, 골 형성에 관여하는 기능을 가지며³⁶⁻³⁸⁾, 백악질 생성에 관여하는 기능을 갖는다고 알려져 있다. 이러한 이유 때문에 창상의 치유에 있어서 치주인대세포에 초점이 맞추어지고 있다.

또한 치주적인 창상의 치유에 대한 생체 적합성과 독성 실험으로부터 추론된 여러 선택들의 연구 결과^{30,39,40)}에서 다른 기원의 세포를 이용한다기 보다는 치주인대세포 그 자체를 이용한다면 그 연구 결과를 좀 더 믿을 만하다는 것이 주장되었으므로, 치주인대세포를 배양하여 본 실험에 이용하였다.

적절한 세포의 분화를 유도할 수 있는 pH의 범위는 일반적으로 매우 적고 세포의 종류에 따라 어느 정도 다양하다^{41,42)}. Lengheden³⁰⁾, Ham과 McKeehan⁴¹⁾, McAteer와 Douglas⁴²⁾는 이주와 같은 vital 한 섬유모세포의 기능을 위한 적절한 pH의 범위는 7.2에서 7.5 사이이고, 어떤 종류의 세포들은 6.6에서 7.8 범위의 pH를 견딜 수 있다고 보고했다.

수소이온 농도의 변화에 따라 치주인대세포가 부착에 어떠한 영향을 받으며, 부착된 세포의 활성 및 증식도는 어떻게 영향을 받는지를 알아보기 위한 목적으로 시행한 본 실험에서, 치주인대세포의 형태는 낮은 pH에서는, 대조

군인 pH 7.4에 비해 세포의 용적이 늘어난 것을 볼 수 있었다. 반대로 높은 pH에서는 세포 돌기의 수가 감소하고 세포가 전체적으로 많이 수축되어 있음을 볼 수 있었다. 그리고 $\times 500$ 의 배율로 관찰한 시야 내에서 높은 수소이온 농도에서는 세포간의 간격이 넓어져 있는 것을 볼 수 있었다. 이러한 결과는 pH 7.8 이상에서 세포내 공포가 보여지고 이러한 형태학적인 변화는 세포 독성 효과와 연관이 있다고 보고한 Al-Nazahn과 Spångberg⁴⁰⁾, Lettré⁴³⁾ Blomlöf등⁴⁴⁾의 결과와 일치한다.

한편 세포의 부착도 평가에서는 실험 1일군에서는 pH 7.2에서 최대의 부착도를 보였으며, 2일군에서도 역시 pH 7.2에서 최대의 부착도를 보였다. 반면 pH 8.0 이상에서는 1일군, 2일군 모두 대조군에 비해 통계적으로 유의성 있게 세포의 부착도가 감소한 것을 볼 수 있었다 ($P < 0.05$). 이러한 결과는 pH 8.0 이상에서 대조군의 65%의 부착도를 보였으며, pH 7.2에서 최대의 부착도를 보였다는 Lengheden³⁰⁾의 결과와 일치했으며, Zmener와 Cabrini⁴⁵⁾와 Kawahara등⁴⁶⁾의 결과와도 일치했다.

MTT assay를 사용한 활성도 평가에서, 배양 1일, 2일, 3일 모두 비슷한 양상으로 낮은 pH에서보다 높은 pH에서 통계학적으로 유의성 있게 감소한 세포의 활성을 볼 수 있었다 (Table 2).

Lengheden과 Jansson³¹⁾은 그들의 실험에서 이미 부착되어 있는 건강한 세포의 DNA 합성은 pH가 증가함에 따라 매우 민감하게 반응한다고 보고하였는데, 이는 본 실험의 결과와 일치한다.

배양 인체 치주인대세포의 증식도를 조사하기 위해 본 연구에서는 증식 세포 핵항원 (Proliferating Cell Nuclear Antigen : PCNA) 지수를 이용하였는데, 이는 면역 조직 화학적 염색법 중의 하나로써, 실험실적으로 관찰하고자 하는 인자가 어느 부위에 있는지를 확인할 수 있고, 개개의 세포 단위로 여러 가지 병리학적 소견과 항원 표현과의 관계를 연구할 수 있다는 장점이 있다⁴⁷⁾. 또한 생존해 있는 세포중 증식력이 왕성한 세포에 선택적으로 염색이 되기 때문에,

세포의 증식도 측정에 매우 유용한 지표이다. 또한 PCNA는 분자량 36 Kd 으로써 DNA 합성에 필수적인 산성 단백질로서 증식세포내에 존재하는 DNA polymerase의 보조 단백질이며 세포주기중 주로 G1 후기부터 S기 전반에 걸쳐 합성된다^{48,49}. Celis⁵⁰는 PCNA가 DNA 복제 과정과 세포 분열 과정에서 중심 요소로 작용한다고 보고하였고, Fairman⁵¹은 DNA 복제 과정뿐만 아니라 DNA 손상 부위에서도 발견된다고 보고하였다. 많은 선학들의 연구^{50,52}에서 세포가 합성기일 때 핵내에 PCNA가 축적되어 그 발현이 최고치를 나타낸다고 보고하였다. Morris⁴⁹등은 DNA 합성이 가장 왕성할 때 최고치를 보인다고 하였으며, Kurki등⁴⁸은 G1 말기에 PCNA가 발현되기 시작하여 DNA 합성 시기인 S기에 현저히 증가되었다가 G2 와 M기에 감소됨을 보고하였다. 이렇게 조직내 증식 중인 세포에서만 제한적으로 나타난다는 점을 이용하여 PCNA지수는 세포 증식에 대한 평가 지수로 다양한 질병의 진단에 활용되고 있으며⁵³, 치은 증식의 경우에도 사용되고 있다⁵⁴. 본 실험의 결과는 대조군인 pH 7.4에 비해 배양 1일째 낮은 pH에서보다 높은 pH, 즉 알칼리성에서 PCNA 지수가 유의하게 감소된 것을 볼 수 있었다 (Table 3). 이러한 양상은 배양 2일과 3일 모두에서 유사하게 나타났다.

이와 같이 PCNA 지수와 MTT assay에 의한 분석을 함께 수행한 이유는, 두 가지 방법이 엄밀히 말해 차이가 있다고 할 수 있기 때문이다. MTT assay는 세포의 생존력, 즉 vitality를 평가하는 것이고, PCNA 지수는 생존력 있는 세포 중에 cell cycle G1에서 S기 사이에 있는 증식력이 왕성한 세포의 활성을 평가하는 지수이다.

본 연구는, 치주조직의 재생에서 가장 중요한 치주인대세포의 두 가지 성질, 즉, 치주인대세포의 치근면으로의 부착, 부착된 치주인대세포의 활성 및 증식도를 평가하는데 초점을 맞추었다. 그러나 실험실상의 연구는 세포의 배양시 배양액 속의 혈청 함량, pH, 온도 등과 같은 요소에 의해 영향을 받을 수 있으므로, 본 연구에 나타난 결과가 in vivo 상으로 그대로

적용된다고 할 수는 없다. 그러나 여러 선학들의 연구 결과와 본 연구 결과에서도 나타났듯이 실험실상으로 알칼리성의 수소이온 농도가 치주인대세포에 유해한 영향을 미치는 것으로 나타났다.

앞으로는 치주조직의 재생에 영향을 미칠 수 있는 요인, 즉, 온도, pH등과 같은 복합적인 구강내 상황을 실험실적으로 재현해 치주조직의 재생에 어떠한 영향을 미치는가를 규명하는 것이 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

치주조직의 치유에 있어 치주인대세포의 부착과 활성 및 증식에 영향을 미칠 수 있는 국소적인 수소이온 농도의 변화에 대해 치주인대세포가 부착, 활성 및 증식에 있어서 어떻게 영향을 받는지를 알아보기 위해 실험실적으로 배양된 치주인대세포에 수소이온 농도를 달리 하여 세포의 부착도와 부착된 세포의 활성도 및 증식도를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MTT assay와 세포 수의 산정에 의한 세포의 부착도 평가에서 두 가지 모두, 낮은 pH에서는 대조군과 비교해 유의한 수준의 변화가 없이 비슷한 수준의 부착도를 보였으며, 높은 pH에서는 pH 8.0 이상에서 1일 군과 2일군 모두 유의한 세포의 부착도 감소가 나타났다 ($P < 0.05$).
2. pH 7.4 이하에서는 대조군에 비해 큰 변화를 보이지는 않았으나 전체적으로 세포의 용적이 커진 것과 세포간 간극이 넓어져 있는 것을 볼 수 있었다. 반대로 pH 7.4 이상에서는 세포의 용적이 전체적으로 수축되어 있었으며, 돌기들이 상실된 모습과 저 농도의 pH에 비해 세포간 간극이 더 넓어져 있음을 볼 수 있었다.
3. 세포의 활성도는 pH 7.6에서 최대의 활성을 보이며, 낮은 pH에서는 대조군 수준과 유사한 반면, 높은 pH에서는 대조군과 비교해 유의성 있게 낮은 활성도를 볼 수 있었다

($P < 0.05$).

- 증식력이 왕성한 즉, 세포 주기 G1 에서 S기 사이에 있는 세포의 수를 나타내는 세포의 증식도, 즉 PCNA 지수는 낮은 pH와 높은 pH 양쪽 모두 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다 ($P < 0.05$).

이상과 같은 연구 결과를 바탕으로 치주조직의 치유에 있어 영향을 미치는 요인 중의 하나인 국소적인 수소이온 농도의 변화는, 실험실상으로 높은 pH, 즉, 알칼리성의 수소이온 농도가 치주인대세포에 유해한 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

참고문헌

- Carranza, F.A.Jr. : Glickman's clinical periodontology, 7th edition. W.B.Saunders Co., pp 93-93, 1989.
- Grant, D.A., Stern, L.B., and Everett, F.G. : Periodontics, 5th ed. C.V. Mosby Co., pp 119-129, 1979.
- Mukherjee, S., Das, A.K., and Patel, M.K. : A longitudinal study of crevicular fluid in periodontal disease in beagles : Clinical, histopathological and biochemical observation. *J Perio Res*, 18 : 501-511, 1983.
- Tenenbaum, B., and Karshan, M. : Factors in human saliva correlated with the occurrence of salivary calculus. *J.A.D.A.*, 24 : 1255-1259, 1937.
- Tenenbaum, B., and Karshan, M. : Factors in saliva correlated the occurrence of calculus. *J.A.D.A.*, 26 : 1965-1971, 1939.
- Bickel, M., and Cimasoni, G. : The pH of human crevicular fluid measured by a new microanalytical technique. *J Perio Res*. 20 : 35-40, 1985.
- Dawes, C. : Effects of diet on salivary secretion and composition. *J Dent Res*. 49 : 1263-1272, 1970.
- Forcher, B.K., Paulsen, A.G. and Hess, W. C. : The pH of the periodontal pocket and the glycogen content of the adjacent tissue. *J Dent Res*. 33 : 444-453, 1954.
- Mandel, I.D. and Thompson, R.H. : The chemistry of parotid and submaxillary saliva in heavy calculus formers and non-formers. *J Periodontol*. 38 : 310-316, 1967.
- Kleinberg, L., and Jenkins G.N., : The pH of dental plaques in the different areas of the mouth before and after meals and their relationship to the pH and rate of flow of resting saliva. *Archs. Oral. Biol*. 19 : 493-516, 1964.
- 최중철, 이만섭 : 타액의 pH가 치석침착과 치주질환 및 치아우식증에 미치는 영향에 관한 연구. *경희치대논문집*, 4 : 139-146, 1982.
- Eversole, J.L., Taubman, M.A., Smith, D.J., and Goodson, J.M. : Gingival crevicular fluid antibody to oral microorganism : I. method of collection and analysis of antibody. *J Perio Res*. 19 : 124-128, 1984.
- Golub, L.M., Kennett, S., Mcewan, H., Curran, J.B., and Ramamurthy, N.S. : Collagenolytic activity of crevicular fluid from periodontal gingival flaps. *J Dent Res*, 55 : 177-185, 1976.
- Hancock, E.B. : Determination of periodontal disease activity. *J Periodontol.*, 52 : 492-499, 1981.
- Orban, J.E., and Stallard, R.E. : Gingival crevicular fluid : A reliable predictor of gingival health *J Periodontol*. 40 : 231-240, 1969.
- Borden, S.M., Golub, L.M., and Kleinberg, L. : The effect of age and sex on the relationship between crevicular fluid flow and gingival inflammation in humans. *J Perio Res*. 12 : 160-167, 1977.
- Rapp, G.W. : Biochemistry of oral calculus : conditions predisposing to oral calculus deposition, *J.A.D.A.* 32 : 1368-1377,

- 1945.
18. Warren KS. : Ammonia toxicity and pH. *Nature*, 195 : 47–49, 1962.
 19. Hermann BW. : Dentinobliteration der Wurzelkanäle nach Behandlung mit Calcium. *Zahnaerztl Rdsch* 21 : 888–899, 1930.
 20. Tronstad L, Andreason JO, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. : pH changes in dental tissue after root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod* 7 : 17–21, 1981.
 21. Hasselgren G, Kerekcs K, Nellestam P. : pH changes in calcium hydroxidcovered dentin. *J Endodont* 8 : 502–505, 1982.
 22. Nerwich A, Figdor D, Messer H. : pH changes in root dentin over a 4 week period following root canal dressing with calcium hydroxide. *J Endod* 19 : 302–306, 1993.
 23. Lengheden A, Bloml f L, Lindskog S. : Effect of immediate calcium hydroxide treatment on periodontal healing in contaminated replanted teeth. *Scan J Dent Res* 99 : 147–153, 1991.
 24. Lengheden A, Bloml f L, Lindskog S. : Effect of immediate calcium hydroxide treatment and permanent root filling on periodontal healing in contaminated replanted teeth. *Sand J Dent Res* 99 : 139–146, 1991.
 25. Arvey, J.K. : Oral development and histology, B.C. Docker Inc, Toronto, 282–294, 1988.
 26. Bordin S., Narayanan, A.S., Jeddy, J., Cleveland, D. and Page, R.C.. : Fibroblast subtypes in the periodontium, *J Perio Res* 19 : 642–64, 1984.
 27. Lowenberg, B.F. et al. : Attachment, migration, and orientation on human gingival fibroblasts to collagen-coated, surface-deminerallized, and untreated root slices. *J Dent Res* 64(9) : 1106–1110, 1985.
 28. Bell PB, Revel JP. : Scanning electron microscope application to cells and tissue in culture. In : Hodges GM, Hallowes RC, eds. *Biomedical research applications of scanning electron microscopy*. Vol.2. London : Academic Press, 46–47, 1980.
 29. Grinell F, Nakagawa S. : Spatial regulation of fibroblast proliferation : an explanation for cell regression at the end of the wound repair. *Prog Clin Biol Res* 365 : 155–166, 1991.
 30. Lengheden A : Influence of pH and calcium on growth and attachment of human fibroblasts in vitro. *Scand J Dent Res* 102 : 130–136, 1994.
 31. Lengheden A, Janson L. : pH effects on experimental wound healing of human fibroblasts in vitro. *Eur J Oral Sci* 103 : 148–155, 1995.
 32. Philips HJ. : Dye exclusion test for cell viability. In : Kruse PK, Patterson MK, eds. *Tissue culture : methods and applications*. New York : Academic Press, 406–408, 1973.
 33. Cho MI, Grant PR. : Sequential events in the formation of collagen secretion granules with special reference to the development of segment-long-spacing like aggregates. *Anat Rec* 199 : 309–320, 1981.
 34. Cho MI, McCarthy PR. : Role of microtubules in the organization of the Golgi complex and secretion of collagen secretory granules by periodontal ligament fibroblasts. *Anat Rec* 199 : 459–471, 1981.
 35. Sodek J, Berkman FA. : Bone cell cultures. In : *Methods in Enzymology*, Vol.145 Academic Press 303–324, 1987.
 36. Nojima N, Kobayashi M, Shionome M, Takahashi N, Suda T, Hasegawa K : Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts. *J Periodont Res* 25 : 179–185, 1990.

37. Topham RT, Chieco DJ Jr, Gattone VH, Hinton DA, Klein RM. : The effect of epidermal growth factor on neonatal incisor differentiation in the mouse. *Dev Biol* 124 : 532-543, 1987.
38. Yamashita Y, Sato M, Noguchi T : Alkaline phosphatase in the periodontal ligament of the rabbit and macaque monkey. *Arch Oral Biol* 32 : 677-678, 1987.
39. Arenholt-Bindslev D, Hörsted-Bindslev P. : A simple model for evaluating relative toxicity of root filling materials in cultures of human oral fibroblasts. *Endod Dent Traumatol* 5 : 219-226, 1989.
40. Al-Nazahn S, Spångberg L. : Morphological cell changes due to chemical toxicity of a dental material : an electron microscopic study on human periodontal ligament fibroblasts and L929 cells. *J Endod* 16 : 129-134, 1990.
41. Ham R, McKeehan W. : Media and growth requirements. *Methods Enzymol* 58 : 72, 1979(only).
42. McAteer JA, Douglas HJ. : Monolayer culture techniques. *Methods Enzymol* 58 : 135, 1979(only).
43. Lettré R. : Drug action on cells in vitro. *Ann NY Acad Sci* 1085-1088, 1954.
44. Blomlöf L, Lindskog S, Hammarström L. : Influence of pulpal treatments on cell and tissue reactions in the marginal periodontium. *J Periodontol* 59 : 577-583, 1988.
45. Zmerner O, Cabrini R. : Effects of three calcium hydroxide based materials on human blood monocytes and lymphocytes. *Endod Dent Traumatol* 3 : 28-32, 1987.
46. Kawahara H, Yamagami A, Nakamura M. : Biological testing of dental materials by means of tissue culture. *Int Dent J* 18 : 443-467, 1968.
47. Horan P, Thor A, Wunderlich D, Muraro R, Causo, Schlom J : Monoclonal antibodies of predefined specificity detect activated ras gene expression in human mammary and colon carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 81 : 5227-5231, 1984.
48. Yu CCW, Woods AL, Levinson DH : The assessment of cellular proliferation by immunocytochemistry ; A review of currently available methods and their application. *Histochemical J* 24 : 121-131, 1992.
49. Morris GF, Matthews MB : Regulation of cell nuclear antigen during cell cycles. *J Biol Chem* 264 : 13856-13864, 1989.
50. Celis JE, Celis A : Cell cycle dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells : subdivision of S phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 : 3262-3266, 1985.
51. Fairman MP : DNA polymerase/PCNA actions and interactions. *J Cell Sci* 95 : 1-7, 1990.
52. Bravo R, Macdonald-Bravo H : Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle : associations with DNA replication sites. *J Cell Sci* 84 : 795-802, 1980.
53. Mathews MB, Berstein RM, Franza BR, Garrels JI : Identify of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 309 : 374-376, 1984.
54. 이강남, 한수부, 이대일 : 치은증식시 세포 구성과 성장인자에 관한 면역조직화학적 연구. 대한 치주과학회지. 24 : 357-375, 1994.

Explanation of Figures

- Fig 1. A scanning electron microscopic findings of periodontal ligament cells at 1 day after incubation in pH 6.6 medium ($\times 500$).
Slightly increased cellular volume and widening of intercellular distances.
- Fig 2. A scanning electron microscopic findings of periodontal ligament cells at 1 day after incubation in pH 7.4 medium ($\times 500$).
Periodontal ligament cells are spindle-shaped and have a typical spread appearance indicative of optimal culture condition.
- Fig 3. A scanning electron microscopic findings of periodontal ligament cells at 2 days after incubation in pH 8.0 medium ($\times 500$).
Loss of spindle shape and apparently shrinkage of cell and widening of intercellular distances.
- Fig 4. Inverted microscope photograph by immunostain of PCNA with pH 6.8 medium at periodontal ligament cells 2 day after incubation ($\times 100$).
Arrow indicates cell of G1 to S phase in cell cycle.
- Fig 5. Inverted microscope photograph by immunostain of PCNA with pH 7.4 medium at periodontal ligament cells 2 day after incubation ($\times 100$).
Arrow indicates cell of G1 to S phase in cell cycle.
- Fig 6. Inverted microscope photograph by immunostain of PCNA with pH 7.8 medium at periodontal ligament cells 1 day after incubation ($\times 100$).
Arrow indicates cell of G1 to S phase in cell cycle.
- Fig 7. Inverted microscope photograph by immunostain of PCNA with pH 8.0 medium at periodontal ligament cells 2 day after incubation ($\times 100$).
Arrow indicates cell of G1 to S phase in cell cycle.

논문 사진부도 (1)

Fig 1.

Fig 2.

Fig 3.

논문 사진부도 (2)

Fig 4.

Fig 5.

Fig 6.

Fig 7.

BIOLOGICAL EFFECTS OF pH CONCENTRATION ON CULTURED HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT CELL ACTIVITY IN VITRO

Seong-Ho Kim, Kui-Woon Park, Hyung-keun Yoo, Hyung-Shik Shin

Department of Periodontology, College of Dentistry, Wonkwang University

Periodontal therapeutic modalities should be re-establishing and regenerating the periodontal tissue previously lost to the disease. To achieve periodontal regeneration, periodontal ligament cells must selective migrate to the denuded root surface, attached and proliferated it. Local pH concentration is one of the most factors that periodontal regeneration. The aims of this study were to examine on biological effects of pH to the human periodontal ligament cells in vitro, especially on the cell morphology, attachment, activity, vitality and viability. Human periodontal ligament cells were cultured from extracted tooth for non-periodontal reason. Immediately after extraction, any soft tissue adhering to the cervical parts of the roots was carefully removed with a sterile curette. To produce different pH levels in the media, Eagle's MEM was adjusted from pH 6.6 to 8.2 in 0.2 intervals with 1 M NaOH and 1 N HCl. After cultivation, Then, Periodontal ligament cells were cultured at pH ranging from 6.6-8.2. attachment assay was done at 1, 2 day incubation and activity assay was done at 1, 2, 3 day incubation.

The experiments were evaluated by scanning electron microscopic techniques (HITACHI X-650 Scanning Electron Microanalyzer, Tokyo, Japan), MTT assay, and the cultured periodontal ligament cells were fixed in neutral formalin for 24 hours and immunohistochemically processed by PCNA for proliferating ability.

The surviving cells in the medium showed slightly increased volume and widening intercellular distances at low concentration of pH than control group (pH 7.4), and apparently shrinkage at high concentration of pH than control group (pH 7.4).

The results of the statistical analysis from the experiment on attachment, vitality and viability were as follows.

Attachment of periodontal ligament cells at 1st and 2nd day, similar attachment rate of low concentration pH compared with control value (pH 7.4). But above pH 8.0, attachment rate were statistically significant decrease from control value ($P < 0.05$).

Periodontal ligament cell's activities were maximum at pH 7.6 by MTT assay. Similar with control value at low concentration of pH. But, the activities were statistically significant decrease at high concentration of pH ($P < 0.05$).

Cellular proliferating rate (PCNA index) were statistically significant decrease from control value at low and high concentration of pH ($P < 0.05$).

This results suggested that high concentration pH, in other words, alkali pH was cytotoxic effects on human periodontal ligament cells in vitro.