

상아질 결합제의 L929 세포 독성에 관한 연구

원광대학교 치과대학 치과보존학교실

임미경 · 지정호 · 김상섭

Abstract

CYTOTOXICITY OF DENTIN BONDING SYSTEM ON L929 CELLS

Mi-Kyung Im, Jung-Ho Ji, Sang-Seop Kim

Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Wonkwang University

The research of the dentin bonding system was mainly on the chemistry and bonding strength. And in vitro assesment of biocompatibility of dentin bonding system was not completely developed.

The purpose of this study was to evaluate the cytotoxic effect of several dentin primers. Scotchbond Multi-Purpose (3M Dental Products, USA), Gluma (BayerDental, Germany), All-Bond (Bisco, USA), ProBond (CaulkDensply, USA) and VeridonFil (Dongyang Nylon, Korea) were included. Cytotoxicity was tested using MTT cell viability test. 0.5 ul, 1 ul, 2 ul and 10 ul of each primer were added to the 96 well plate of incubated L929 cell lines. After 30-minute, 1, 4, 24 and 72-hour exposures, absorbance of L929 cells was observed with ELISA reader. All data were analyzed using t-test.

All primers showed cytotoxicity on L929 cells under every conditions used in this study. Absorbance of L929 cells was decreased by time. Scotchbond group exhibited the lowest absorbance value in all exposure time and value.

본 연구는 1996년도 원광대학교 교비 연구비의 지원으로 이루어졌음.

I. 서 론

상아질 결합제는 상아질에 콤포지트를 결합시키기 위하여 개발되었다¹⁾. 상아질 결합제는 콤포지트 수복의 변연 누출을 감소시키고 보존적인 와동 형성에서 유지를 증가시키며 교합 응력을 분산시킨다²⁾. 여러 제품이 현재 임상에서 널리 사용되고 있다. 상아질 결합제의 제3세대 제품은 초기 제품보다 사용하기에 복잡하지만 결합력은 이전 세대의 제품에 비하여 증진되었다.

임상에서 상아질 결합제를 적절하게 사용하기 위하여 이의 생물학적 성질을 완전히 이해하는 것이 중요하다. 최근에 소개된 대부분의 상아질 결합제는 상아질의 도말층을 부분적 혹은 전부 제거하여 상아 세관을 개방하는 효과를 나타내어 상아질의 투과성이 광범위하게 증가된다³⁾. 상아질은 다공성이며 전체 부피의 50%가 유기물질과 물로 구성되어 있으며 이러한 습윤한 환경으로 상아질에 대한 결합은 장애를 받으며 상아질의 낮은 표면 에너지와 도말층의 존재 및 치수와의 적합성 등이 결합을 방해하는 부가적인 요인이 된다^{4,5)}.

임상에서 사용될 때와 생체내 연구에서 상아질 결합제의 효과가 유해하게 나타난 경우는 적으나 혈관의 확장과 충혈, 염증 반응, 조상아세포의 변위와 치아의 지각 과민성이 콤포지트를 수복한 후에 나타날 수 있다^{6,7)}. 치수에 대한 상아질 결합제의 자극은 이 재료 자체의 독성에 기인할 수도 있고 약한 결합력으로 인하여 발생한 계면에 세균이 성장해들어오거나 혹은 이 양자에 의하여 모두 발생할 수 있다⁸⁾. 이와 같이 상아질 결합제에 대하여 많은 연구가 이루어져 왔으나 이들은 주로 결합의 형성,

결합력 및 임상에서 효과적인 사용 방법등에 관하여 연구되었으며 이들의 생체 적합성에 관한 연구는 비교적 부족하다.

이에 본 연구는 배양한 영구 세포주에 대하여 상아질 결합제의 성분 중 상아질 전처리제로 사용되는 수종의 primer를 중심으로 상아질에 미치는 독성을 평가하고자 하였다

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에서는 국내에서 시판되고 있는 수종 상아질 결합제의 primer를 대상으로 하였으며 Table 1), 세포는 영구 세포주인 L929세포(한국세포주은행)을 사용하였다.

2. 실험 방법

1) 세포의 준비

L929세포를 Earle's salt가 포함된 Eagle's minimal essential medium(MEM)에 10% (vol/vol) fetal calf serum, 2mM L-glutamine, sodium bicarbonate 2.2 mg/ml, streptomycin 50ug/ml, penicillin 100U/ml을 첨가하였다. 세포가 약 80-90%의 충밀도에 도달할 때 계 대하여 실험에 사용하였으며, 배양배지는 실험 3일과 1일전에 각각 새로운 배지로 교환하였다. 실험 당일에 배양액이 든 75cm² 플라스크 배양액을 버리고 인산완충용액으로 2회 세척하였는데 1회 세척시에는 20, 2회 세척시에는 10 ml을 사용하고 잔여액은 파이펫으로 제거하였다. 플라스크 바닥에서 세포를 제거하기 위하여 0.25% trypsin 5ml을 넣고 30초간 실온에 방

Table 1. Primers used in this study

Code	Primer	Lot number	Manufacturer
ALL	All-Bond	109025	Bisco, USA
GLU	Gluma	035315	BayerDental, Germany
ALL	All-Bond	109025	Bisco, USA
PRO	Probond	534252	CaulkDensply, USA
VER	VeridonFil photo		Dongyang Nylon, Korea

치한 후 trypsin용액을 버린 후 플라스크를 CO₂ 배양기에 5분간 두었다. 배양액 10ml로 분리된 세포를 회수하여 1000rpm에서 10분간 원심분리하여 trypsin을 제거한 후 세포를 배양액으로 부유시켜 세포수를 조정하였다.

2) MTT를 이용한 세포독성 검사

MTT를 이용한 L929세포의 생존능을 평가하기 위하여 세포수를 2×10^6 cells/ml로 조정하여 사용하였다. primer의 독성을 평가하기 위하여 96-well plate (Corning, NY, U.S.A.)에 well당 100ul씩 세포를 분주하여 CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양한다. 각 primer를 well당 0.5ul, 1ul를 첨가하여 1시간, 4시간과 24시간 동안 각각 배양하였으며, 2ul를 첨가한 군은 30분간 배양하였다. 또한 10ul를 첨가한 군은 24시간과 72시간 동안 배양하였다. 각 군당 6개의 well을 사용하였고 primer와 접촉시키지 않은 세포액이 든 well을 대조군으로 하였다.

tetrazolium dye (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl dimethyltetrazolium bromide (MTT, 98%, MW 414, C₁₈H₁₆BrN₅S, Jensen chemical, Blegium)을 인산 완충용액에 2mg/ml이 되도록 녹인 후 0.2um의 여과주사기 (syringe filter, Nalgene, U.S.A.)로 여과시킨 후 사용하였다. 각 well에 50ul씩 첨가하여 4시간 동안 CO₂ 배양기에서 배양한 후 MTT용액을 버리고, demethyl sulfoxide (DMSO, SO(CH₃)₂, MW 78.1, Merck)용액을 well당 50ul씩 넣고 용액을 균일하게 혼합하였다. ELISA reader II (Behring, Serial NO. 350160, Germany)에서

측정 파장 570nm에서 흡광도를 측정한 후 대조군에 대하여 실험군에서 생성된 formazan결정의 흡광도로서 세포의 활성도를 측정하였다. 각 군의 흡광도는 t-test를 이용하여 통계처리하였다.

III. 실험 성적

각 primer를 2 ul를 첨가하여 30분간 노출시킨 경우의 L929세포의 흡광도는 Table 2와 같다. 실험에 사용한 5가지 군 모두에서 대조군과 비교시 모두 유의하게 세포의 활성을 억제하였다 ($p < 0.001$). 이 중 SCO과 VER은 PRO에 비하여 유의하게 흡광도가 낮아서 실험에 사용한 primer중 L929 세포에 대한 독성이 가장 강하였다 ($p < 0.001$). 세포 독성의 순위는 SCO, VER, PRO, ALL, GLU으로 독성이 강하였다 ($p < 0.05$).

각 primer를 well당 0.5 ul와 1 ul씩 첨가하고 1시간 동안 배양한 결과는 Table 3과 같다. 0.5 ul를 첨가한 경우에는 SCO와 GLU군은 흡광

Table 2. Absorbance of L929 cells after 30-minute exposure of 2 ul of each primer

primer	mean	SD
ALL	0.326	0.032
GLU	0.490	0.047
SCO	0.058	0.003
PRO	0.321	0.016
VER	0.066	0.007
control	0.713	0.063

Table 3. Absorbance of L929 cells after 1-hour exposure of each primer

primer	0.5 ul		1 ul	
	mean	SD	mean	SD
ALL	0.697	0.075	0.687	0.143
GLU	0.291	0.016	0.321	0.021
SCO	0.190	0.058	0.055	0.023
PRO	0.444	0.052	0.358	0.032
VER	0.576	0.201	0.212	0.021
control	0.890	0.033	1.025	0.021

도의 수치가 낮아서 L929 세포에 대한 강한 독성을 보였다. 이에 비하여 VER은 독성이 약하게 나타났으나 대조군에 비하여는 유의하게 세포의 활성을 억제하였다 ($p=0.004$). 또한 ALL은 대조군과 비교시 유의하게 세포 독성이 나타났다 ($p=0.001$). 1 ul를 첨가하고 1시간 동안 배양한 경우에도 실험군 모두 대조군에 비하여 유의하게 L929세포의 활성을 억제하였다 ($p<0.05$). GLU군과 PRO군 사이에는 세포 독성의 유의한 차이를 보였다 ($p<0.05$). 각 군에서 primer의 양을 0.5 ul에서 1ul를 증가 시킴에 따라서 SCO과 VER군은 세포의 활성이 유의하게 감소하였으며 ($p<0.05$), PRO군에서도 감소되었다 ($p<0.001$). 그러나 ALL와 GLU는 primer의 양을 0.5 ul에서 1 ul로 증가 시켜도 세포 독성의 유의한 증가가 관찰되지 않았다.

각 primer를 각각 0.5 ul와 1 ul를 첨가하고 4시간 동안 배양한 후의 L929세포의 흡광도는 Table 4와 같다. 실험에 사용된 모든 군에서 대조군에 비하여 유의하게 L929세포의 활성을 억제하였다 ($p<0.05$). 각 primer 0.5 ul를 첨

가하고 1시간 배양한 경우에 비하여 4시간 동안 배양한 경우에서 SCO은 매우 유의하게 세포 독성이 증가하였다($p=0.001$). VER에서도 세포 독성이 유의하게 증가하였으나 SCO에 비하여는 세포 독성의 증가 정도가 약하였다 ($p<0.05$). 또한 GLU과 PRO는 L929세포의 활성이 약간 감소한 정도로 나타났다. 1 ul를 첨가하고 4시간 동안 배양한 경우를 0.5 ul를 첨가하고 4시간 동안 배양한 경우와 비교하면 ALL은 유의하게 L929세포의 활성이 감소되었으며($p<0.001$), 1 ul를 첨가하고 1시간 동안 배양한 경우에 비하여도 세포 독성이 유의하게 증가됨을 관찰하였다 ($p<0.05$). SCO는 흡광도의 수치가 매우 낮아서 강한 독성 독성을 보였다. VER과 PRO는 흡광도의 수치의 차이는 약간 있으나 이들 사이의 통계적인 유의성은 나타나지 않아서 독성은 거의 비슷하였다. 이들 군은 0.5 ul를 첨가하고 4시간 동안 배양한 군에 비하여 유의하게 L929세포의 활성을 억제하였다 ($p<0.05$). 그러나 GLU는 세포 독성의 증가가 관찰되지 않았다.

각 primer를 0.5 ul과 1 ul씩 첨가하고 24시간

Table 4. Absorbance of L929 cells after 4-hour exposure of each primer

primer	0.5 ul		1 ul	
	mean	SD	mean	SD
ALL	0.830	0.073	0.575	0.141
GLU	0.255	0.009	0.244	0.014
SCO	0.071	0.018	0.048	0.006
PRO	0.360	0.101	0.170	0.028
VER	0.335	0.038	0.164	0.082
control	0.865	0.025	1.132	0.118

Table 5. Absorbance of L929 cells after 24-hour exposure of each primer

primer	0.5 ul		1 ul	
	mean	SD	mean	SD
ALL	1.135	0.231	0.728	0.264
GLU	0.137	0.026	0.132	0.013
SCO	0.027	0.005	0.018	0.001
PRO	0.024	0.002	0.020	0.002
VER	0.023	0.004	0.017	0.002
control	1.235	0.027	1.413	0.063

동안 배양한 후의 L929세포의 흡광도는 Table 5와 같다. 모든 군에서 대조군에 비하여 유의한 세포 독성을 보였다. ($p < 0.05$). 0.5 ul를 첨가하고 24시간 동안 배양한 경우는 0.5 ul를 첨가하고 4시간 동안 배양한 경우에 비하여 SCO, PRO와 VER군에서 모두 세포 독성이 유의하게 증가하였으며, 특히 PRO와 VER에서는 매우 강한 세포 독성을 보였다 ($p < 0.001$). 이에 비하여 A는 시간 증가에 따른 독성 증가가 나타나지 않았다. 1 ul를 첨가하고 24시간 동안 배양한 경우에는 ALL군은 L929세포에 대하여 독성을 나타내었다. SCO, PRO와 VER는 모두 L929세포에 대하여 심한 독성을 나타내었다. GLU군은 1 ul를 첨가하고 4시간 동안 배양한 경우에 비하여 유의하게 L929세포의 흡광도가 감소하였다 ($p < 0.001$). ALL군 이외의 다른 군들은 모두 0.5 ul를 첨가하거나 1ul를 첨가한 경우 모두 동일한 세포 독성을 나타내어 primer양의 증가에 따른 세포 독성의 증가는 관찰되지 않았다.

각 primer를 well당 10 ul를 첨가한 후 24시간 동안 배양한 L929세포의 흡광도는 Table 6과 같다. ALL군을 포함하여 실험에 사용한 4가지 군 모두가 대조군에 비하여 흡광도가 유의하게

Table 6. Absorbance of L929 cells after 24-hour exposure of 10 ul primer

primer	mean	SD
ALL	0.017	0.002
GLU	0.133	0.027
SCO	0.007	0.002
PRO	0.018	0.005
control	0.602	0.010

억제되어 세포독성을 나타냈다 ($p < 0.05$). 이 중 GLU군은 SCO, ALL 및 PRO군에 비하여는 흡광도의 수치가 유의하게 높아서 10 ul를 첨가한 경우에서 실험에 사용한 primer중 가장 강한 세포독성을 보였다 ($p < 0.05$).

각 primer를 well당 1 ul와 10 ul를 첨가한 후 72시간 동안 배양한 L929세포의 흡광도는 Table 7과 같다. 실험에 사용한 4가지 군 모두에서 1 ul를 첨가하고 72시간 배양하면 대조군에 비하여 유의하게 흡광도가 감소되어 모든 primer가 세포 독성을 보였다 ($p < 0.05$). 이 중 SCO군은 가장 낮은 흡광도 수치를 보였으며, GLU과 ALL군과 비교시도 유의하게 흡광도의 수치가 낮아서 강한 세포독성을 나타냈다 ($p < 0.05$). 10 ul를 첨가하고 72시간 동안 배양한 군에서도 실험에 사용한 모든 군이 대조군에 비하여 흡광도의 수치가 유의하게 낮아서 모두 세포독성을 보였다($p < 0.05$). 이 중 GLU군은 기타 3군과 비교시에도 흡광도가 유의하게 높아서 실험에 사용한 4가지 primer중 가장 약한 세포독성을 나타내었다 ($p < 0.001$).

각 primer를 0.5와 1 ul를 첨가한 후 시간 경과에 따른 세포 독성의 변화를 그림으로 나타낸 결과는 Fig. 1, 2와 같다. 각 군의 흡광도를 대조군의 흡광도 수치로 나누어 상대 흡광도를 구하여 표시하였다. Fig. 1에서 ALL을 제외한 모든 군이 전반적으로 시간이 증가함에 따라서 세포독성이 증가함을 나타내었다. SCO군은 1시간 노출시부터 상대 흡광도가 5가지 실험군에서 가장 낮게 나타났으며, 시간 경과에 따라서도 더욱 낮아졌다. 이에 비하여 GLU군은 시간이 경과함에 따라서 상대 흡광도 감소의 폭이 가장 컸다. 1 ul를 첨가하고 관찰한 Fig.

Table 7. Absorbance of L929 cells after 72-hour exposure of each primer

primer	1 ul		10 ul	
	mean	SD	mean	SD
ALL	0.066	0.036	0.022	0.00
GLU	0.080	0.005	0.138	0.007
SCO	0.016	0.003	0.008	0.004
PRO	0.035	0.040	0.031	0.006
control	0.730	0.050	0.700	0.035

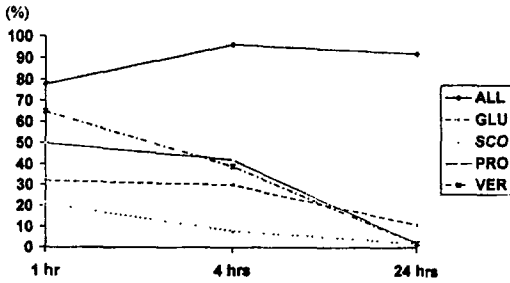


Fig. 1. Relative absorbance of L929 cells exposed to 0.5ul of each primer by exposure time.

2의 경우는 0.5 ul를 첨가한 경우에 비하여 상대 흡광도가 1시간 노출된 경우부터 낮게 나타났으며, 시간 경과에 따라서 더욱 낮게 유지되었다. 이 경우 역시 SCO군의 상대 흡광도는 실험 시간 전체에 모두 낮게 유지되었다. GLU군의 상대 흡광도 감소의 폭이 가장 크게 나타났다.

IV. 총괄 및 고찰

상아질 결합제의 분류에 관하여 도말층의 처리시 전처리제 (primer)의 사용 여부에 따라 제 1세대와 제 2세대로 분류하기도 하고 상아질 처리 및 결합력에 따라 3세대까지 분류하기도 한다. 제 4세대 제품은 법랑질과 상아질을 모두 부식시키는 제품이다⁹⁻¹¹⁾. 최근 사용되고 있는 상아질 결합제는 상아세관의 입구를 개방시켜 투과성을 증가시키므로 치수로 확산하는 세균의 산물이나 수복재로부터 용출되는 독성물질이 치수로 침투할 수 있는 가능성이 증가되고 있다. 상아질 결합제의 일부 성분이 상아세관을 타고 치수쪽으로 200-300um까지도 이동할 수 있다는 보고가 있다¹²⁾.

레진 콤포지트 수복의 하방에서 나타나는 유해한 치수반응의 원인에 관하여 논란이 있다. 일부 연구에서는 미세 누출이후에 나타나는 세균의 침입을 원인으로 간주한^{13,14)} 반면 다른 연구에서는 레진의 화학적인 독성이 치수 자극의 원인에 기여한다고 하였다¹⁵⁻¹⁹⁾. 상아질 결합제의 생물학적인 검사는 복잡한 과정이다.

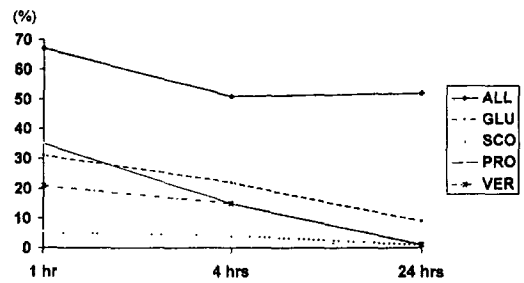


Fig. 2. Relative absorbance of L929 cells exposed to 1 ul of each primer by exposure time.

대부분의 다른 치과재료와는 달리 상아질 결합제는 청결제 (cleanser), 전처리제 (primer)와 결합용 레진 등 한가지 이상의 성분으로 구성되어 있다. 또한 이들 성분은 결합 강도와 효과적으로 임상에서 사용될 수 있도록 계속 변형되고 있다. 상아질 결합제의 사용검사는 이들 검사하고자 하는 재료들의 물리적인 성질이 실험 결과에 영향을 줄 수 있다는 점에서 더욱 복잡하게 된다. 예를 들면 결합력이 낮아서 수복물과 와동의 계면 사이에 틈이 생기고^{20,21)} 이 틈을 따라서 세균이 성장하게 된다²²⁻²⁴⁾. 따라서 치수의 손상은 재료 자체의 영향 뿐 아니라 세균, 그리고 이들 양자의 결합에 의하여 발생된다.

제 3세대 상아질 결합제의 생체적합성에 관한 연구에서 Siew등²⁵⁾은 F-N-P 결합체계에 관하여 조사하였다. 사람의 적혈구의 용혈 및 쥐의 섬유아세포가 clone을 형성하는 효율성을 이용하였으며 결합체계의 용출액 뿐 아니라 각 성분에 대하여도 연구한 결과 용출물 뿐 아니라 각 성분 중 어떤 것도 모든 실험에서 독성을 나타내지 않았다고 하였다. 이와 유사하지만 좀더 자세한 실험을 시행한 Dumsha등²⁶⁾은 전반적으로는 Siew등의 실험 결과를 지지하였다. 이들은 신장 세포와 사람의 폐 세포를 이용하여 F-N-P 계의 각 성분의 세포독성을 검사하였으며 그 결과 FO, NPG-GMA와 NTG-GMA가 그 자체로는 세포독성 있으나 이들을 사용 방법에 따라 임상에서와 같은 방법으로도 포하면 유의한 독성 반응을 유발하지 않는

다고 하였다. 이들은 독성을 유발하는 성분은 잔여의 결합되지 않은 성분이며 이들은 실제 임상 과정에서는 과다한 물질은 씻어버리게 되므로 독성이 크게 감소되거나 없다고 하였다. 전반적으로 검사된 물질에 대한 평가 결과는 우수하여 이 결합제를 생체내에서 계속하여 검사할 것을 지지하였다.

Meryon 등²⁷⁾은 BHK섬유아 세포에 대하여 Gluma, Scotchbond 2와 Tripson이 나타내는 세포독성을 100-500um 두께의 상아질 삭편을 매개시켜 실험하였다. 모든 검사한 재료는 대조군에 비하여 유의한 세포 독성을 보였으며 깊은 와동에서는 적절한 이장재를 사용할 것을 추천하였다. 또한 Gluma는 사람의 치수 세포와 직접 접촉시도 세포독성을 보였다²⁸⁾. 도말층을 제거하거나 변형시키기 위하여 사용되는 primer와 conditioner에 대한 세포독성 평가에서 EDTA에 기본을 둔 Gluma cleanser는 사람의 치수 세포에 대하여 약한 세포독성을 나타낸 반면 말레인 산과 HEMA에 기초를 둔 Sctochnep은 좀 더 세포 독성이 강하게 나타났²⁹⁾.

F-N-P와 Tenure의 mutagenicity를 조사하기 위하여 Ames' mutagenicity검사를 시행한 결과 이들 재료는 암 유발성을 보이지 않았으나 Gluma의 primer가 암 유발성을 나타냈으며 이는 primer의 성분 중 glutaraldehyde에 기인한 것으로 보고하였다³⁰⁾. F-N-P 결합체계에 관한 생체내 적합성 실험은 앞서 행해진 생체의 실험의 결과를 지지하여 개의 치아에서 검사시 자극을 주지 않는 것으로 보고되었다. 또한 이 재료들은 콤포지트만을 사용하는 경우보다 치수를 보호할 수도 있다고 하였다³¹⁾. 이러한 결과는 Stanley 등에 의한 F-N-P 상아질 결합제를 개의 치아에 대하여 검사한 경우 아주 제한된 치수반응을 유발하였다는 것과 부합된다. 이들은 EO, NPG-GMA와 PMDM이 불용성의 산물을 형성하여 상아세관을 막아서 이들 재료로부터 용출되는 유해한 성분이 치수로 도달되는 것을 방지한다고 하였다³²⁻³³⁾. PMDM의 자발적인 중합과 레진과의 상호 중합(copolymerization)은 이 과정 동안 유해한 산물을 방출하지 않고 상아세관을 폐쇄하는 결과가 된다.

이 F-N-P상아질 결합제를 swine의 전치에서 검사한 결과 임상적인 사용시 수용할 만 하다고 보고하였다³⁴⁾. ferric oxalate/nitric 산이 aluminum nitrate와 oxalic acid로 대체된 F-N-P 결합체계의 두가지 다른 formulae를 Blosser 등³⁵⁾은 원숭이의 치아에서 평가하였다. 이들 결합제는 단지 약간의 병적인 반응을 유발하였으며 이것은 ZOE, varnish와 아말감 대조군과 유사한 정도였다고 하였다.

F-N-P와 Tenure결합체에 대한 생물학적인 검사는 일치하지만 제 3세대의 다른 결합체에 대한 결과는 다소 논란이 있다. Horsted-Bindslev³⁶⁾는 glutaraldehyde에 기본을 둔 Gluma의 생체 적합성에 대하여 원숭이의 치아를 대상으로 실험하였다. 관찰기간은 8일과 90일이었으며 총 24층레 중 치수벽이 아주 얇으며 calcium hydroxide를 도포하지 않은 2층레에서만 Gluma의 독성 효과가 나타났다고 보고하였다. 이들은 치수반응이 나타난 원인으로서 재료의 독성 자체가 원인이기보다는 삭제 과정, 잔존 상아질의 두께와 와동의 변연을 따라 세균이 성장해 들어가는 것등이 치수 염증 반응을 유발한 주요한 원인일 것이라고 기술하였다. Grieve 등은 Gluma를 ferret의 치아에 대하여 적용한 후 7일, 14일과 28일 후에 관찰한 결과 세균이 성장해 들어가는 것이 치수 염증 반응을 일으키는 주요한 원인이라고 하였다³⁷⁾. Gluma의 항균 효과에 대하여 원숭이의 치아를 대상으로 V급 와동을 형성하고 산으로 부식한 후 48시간 동안 개방시켜 상아질에 세균이 감염될 수 있도록 한 실험에서 8일과 90일 동안의 실험 기간에서 세균의 성장을 관찰할 수 없었다고 보고하였다. 이들은 Gluma의 glutaraldehyde의 성분의 항균 효과로 인하여 치아와 수복물 사이의 계면에 세균의 성장을 억제하거나 방지하였다고 보고하였다 또한 원숭이의 치아에 Gluma를 8일과 90일 간 각각 적용하고 관찰한 경우 약간의 염증 반응만이 나타난 경우도 보고되었다^{38,39)}. 치수에 손상을 주지 않는 이유로서 Gluma의 결합력이 우수하며 glutaraldehyde를 형성하여 상아질을 폐쇄하므로 상아질의 투과성이 감소되는 것이 이의 기전으로 설명

하고 있다.

그러나 Dogon등³⁹⁾에 의하면 Hema-Glutaraldehyde결합체계는 원숭이의 치아에서 사용시 14일부터 168일 간 관찰시 심한 치수반응을 유발하였다고 보고하였다. F-N-P결합체계에 대한 치수 반응은 적절하여 사람 치아에 대하여 4-241일 동안 조직학적인 검사를 시행한 경우 잔존 상아질의 두께가 미미한 경우에서도 치수의 염증 반응은 전혀 없거나 극히 미약하여 이 재료가 생물학적으로 안전하다고 하였다. 이러한 결과는 여러 연구자들의 생체외 및 생체내 연구결과와도 일치하는 것이다. 반면 Eibaum등은⁷⁾ 다른 결과를 나타내었다. 50일 까지 관찰하였을 때 사람의 치아에서 미약한 정도에서 심한 정도의 치수 반응이 나타났다. 유사한 반응은 Gluma를 21-49일 동안 그리고 50-120일 동안 평가하여 유사한 결과를 얻었다. 이 두 기간 모두에서 중등도의 치수 반응이 관찰된 경우가 가장 많았으며 소수의 경우에는는 미약한 반응부터 심한 반응까지 나타났다. 이들은 재료의 독성 때문에 깊은 와동에서는 치수를 보호해야 한다고 하였다.

상아질 결합체는 상아질에 직접 도포하여 사용하기 때문에 치수에 유해한 효과를 나타낼 수 있다. Rathbun등과 Hanks등은 현재 사용되고 있는 상아질 결합체의 주요 성분인 Bis-GMA가 에탄올과 같은 용매에 의하여 중합된 레진으로부터 쉽게 용해될 수 있음을 보고하였다^{41,42)}. 또한 산소 억제층이 상아질 결합 단량체의 완전한 중합을 방해하는 것⁴³⁾뿐만 아니라 상아질이 여러 가지 물질에 대하여 투과성을 갖는 것⁴⁴⁾도 상아질 결합체 유해성의 원인이 될 수 있다. 따라서 와동내에 남아있는 중합되지 않은 상아질 결합체나 레진 성분이 상아 세관액을 따라서 치수로 확산해 들어갈 수 있다^{45,46)}.

본 실험에서는 상아질 primer를 배양한 L929 세포에 첨가하여 이들 primer가 L929세포의 생존능에 미치는 영향을 평가하였다. 각 상아질 primer를 2 ul씩 첨가하고 30분간 배양한 경우에는 SCO와 VER가 가장 강한 세포 독성을 나타내었으며, 흡광도의 수치가 가장 높았던 GLU도 대조군에 비하여 유의한 세포 독성을

보여서 well당 2 ul의 primer도 L929세포에는 손상을 주었다. well당 첨가하는 primer의 양을 0.5 ul로 줄여서 1시간 동안 배양한 결과에서도 모든 primer는 L929세포에 독성을 나타내었다. 그 중 ALL군의 흡광도의 수치가 높게 나타났으나, ALL군의 primer는 2가지 용액을 동량으로 혼합하여 상아질에 도포하도록 되어 있어 본 실험에서는 각 용액을 절반씩 well에 첨가하였는데 이 과정에서 정확한 정량이 되지 않았을 가능성도 있다고 사료된다. 또한 SCO군 역시 2 ul를 첨가하고 30분간 배양한 경우와 마찬가지로 가장 낮은 흡광도의 수치를 보여서 세포 독성이 강하게 유지되었다. 10 ul를 첨가하고 24시간 배양한 경우에서도 모든 군에서 대조군에 비하여 세포 독성이 유의하게 나타났다. Primer를 1 ul와 10 ul씩 각각 첨가하고 72시간 동안 배양한 군에서는 모든 경우에서 대조군에 비하여 흡광도의 수치가 유의하게 낮았다. 이 중 1 ul를 첨가한 경우에는 SCO군이 GLU와 ALL군에 비하여 유의하게 세포 생존능을 감소시켜서 첨가한 primer의 양 뿐 아니라 노출 시간에 따라서도 각 primer의 세포 독성의 순위에 차이가 있음을 나타냈다. 시간 변화에 따른 세포 독성을 관찰하기 위하여 상대 흡광도를 그래프로 관찰한 Fig. 1과 2에 나타난 바와 같이 SCO군은 모든 시간대에서 0.5 ul를 첨가한 경우와 1 ul를 첨가한 경우 모두에서 항상 가장 낮은 상대 흡광도를 보여서 세포 독성이 강함을 나타냈다. 이에 비하여 ALL군은 24시간에도 상대 흡광도가 비교적 높게 유지되어 세포독성이 미약함을 의미하였다. 그러나 전술한 바와 같이 ALL군은 실험 단계에서 정량이 정확한지의 의문이 있어 추후 더 실험을 계속하여야 하리라고 사료된다. 상대 흡광도의 감소면에서는 GLU군이 시간 경과에 따른 세포 독성의 증가폭이 가장 크게 나타나서 24시간이 경과하면 SCO군과 같은 정도로 상대 흡광도가 감소되어 시간 경과에 따른 세포독성의 증가가 가장 컸다.

실험하는 과정에서 각 primer를 1 ul씩 첨가하고 난 직후에서 SCO군은 투명한 노란색으로 well의 색이 변하여 SCO의 산도가 다른

균들에 비하여 강함을 알 수 있었다. 그 다음으로 색 변화를 보인 균은 PRO였으며, GLU과 ALL로 가면서 대조균의 색과 유사하였다. 이러한 결과는 MTT를 이용한 흡광도의 결과와 비교적 일치되는 것으로서 이들 primer의 세포 독성은 주로 primer의 산도에 상당 부분 기인하는 것으로 추정된다. 또한 10 ul를 첨가한 균에서는 SCO와 PRO는 모두 탁하고 진한 노란색으로 변하였으며, PRO는 아주 뿌옇게 변하였다. 또한 ALL은 주황색을 띤 노란색을 보였으며 well내부에 과립 형태로 세포가 응집되는 양상을 보여 각 primer를 첨가한 직후부터 세포는 심한 손상을 받음을 나타내었다. GLU의 색은 그 중 대조균과 가장 유사하였으나, 1 ul를 넣은 PRO의 색과 거의 유사하여 10 ul정도의 부피는 L929 세포에 미치는 초기독성이 강력함을 시사하였다.

본 연구에서 사용한 세포주는 영구 세포주로서 치수의 섬유아세포와는 여러 측면에서 다른 특성을 가질 것이다. 또한 세포 독성의 연구에 영향을 미치는 인자 중 도말층의 존재 여부와 상아질의 투과성이 완전히 배제된 상태에서 실험한 것이므로 실제로 이들 primer가 상아질에 대하여 나타내는 임상적인 효과와는 상당한 차이가 있을 것으로 사료된다. 또한 본 실험에서 세포 독성을 측정하는 척도로서 사용한 MTT검사 방법은 방사선 동위 원소를 사용하지 않고 신속하게 세포의 생존능을 검사할 수 있다는 점에서는 유익한 측면이 있으나, 세포의 DNA의 합성이나 기타 생화학 검사를 이용하는 방법과 비교시는 예민도가 낮은 단점이 있는 것으로 사료된다. 또한 본 실험에서 세포에 접촉시키는 각 primer는 제조품 자체의 농도를 사용하고 또한 각 well에 첨가시킨 농도도 실제의 상황과 비교시는 고농도로서 치수의 세포가 접촉되는 농도와는 차이가 있을 것이다. 이러한 관점에서 본 연구의 목적은 각 primer가 치수에 나타내는 실제의 세포 독성을 측정하기 보다는 치아내에서 사용되는 재료로서 이들이 나타낼 수 있는 상대적인 독성에 차이가 있는지를 알아보고자 함이었다. 추후, 상아질 삭편을 매개하거나, 상아세관액의 흐름을 고

려한 실험 디자인 및 각 primer의 개개 성분에 대한 농도에 따른 독성 효과를 측정하는 실험이 계속되어야, 상아질 결합제의 결합력의 증가와 이에 상응하는 생체적합성에 대한 연구가 상호 조화를 이루어 임상에서 안전하고 효율적으로 상아질 결합제를 사용하는 데 기여할 것으로 사료된다.

V. 결 론

임상에서 사용되는 상아질 결합제는 최근 상아질에 대한 결합력이 증대되어 그 사용 용도가 점차 증대되고 있다. 상아질 결합제에 대한 세포독성을 평가하기 위하여 수종의 상아질 결합체계의 각 primer를 배양한 L929에 첨가하여 MTT를 이용한 세포의 생존능을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

실험에 사용된 모든 primer는 본 실험에 사용된 조건에서 L929세포의 활성을 유의하게 억제하였다. 각 primer가 첨가된 세포는 시간이 경과됨에 따라서 세포의 흡광도가 감소되었다. SCO균이 첨가된 세포의 활성은 본 실험에 사용된 모든 조건에서 가장 낮게 나타났다.

참 고 문 헌

1. Buonocore M, Wileman W and Brudevold A : A report on a resin composition capable of bonding to human dentin surfaces. J Dent Res 35 : 846-851, 1956.
2. Douglas WH : Clinical status of dentine bonding agents. J Dent 17 : 209-15, 1989.
3. Pashley DH, Michelich V and Kehl T : Dentin permeability : effects of smear layer removal. J Prosthet Dent 46 : 531-7, 1981.
4. Rees JS and Jacobsen PH : The current status of composites materials and adhesive systems. Part 2 : Adhesive systems. Res Dent 6 : 14-18, 1990
5. Tyas MJ, Alexander SB, Beecj DR and Cook WD : Bonding - retrospect and pro-

- spect. *Aust Dent J* 33 : 364–74, 1988.
6. Stanley HR, Going RE and Chauncey HH : Human pulp response to acid treatment of dentin and to composite restoration. *J Am Dent Assoc* 91 : 817–25, 1975.
 7. Elbaum R, Remusat M and Brouilet JL : Biocompatibility of an enamel-dentin adhesive. *Quint Int* 23 : 773–82, 1992.
 8. Stanford JW : Bonding of restorative materials to dentin. *Int Dent J* 35 : 133–138, 1985.
 9. Setcos JC : Dentin bonding perspective. *Am J Dent* 1(special issue) : 173–5, 1988.
 10. Douglas WH : Clinical status of dentine bonding agents. *J Dent* 17 : 209–15, 1989.
 11. Retief DH, O'brien JA, Smith LA and Marchman JL : In vitro investigation and evaluation of dentine bonding agents. *Am J Dent* 1(special issue) 176–83, 1988.
 12. Watson IF and Boyde A : In vitro dentine penetration of Gluma bonding agent. *J Dent Res* 66 : 835, abstract no. 8, 1987.
 13. Brannstrom M and Nyborg H : Pulp reaction to composite resin restorations. *J Prosthet Dent* 27 : 181–9, 1972.
 14. Bergenholtz G, Cox CF, Loesche WJ and Syed SA : Bacterial leakage around dental restorations : its effect on the dental pulp. *J Oral Pathol* 11 : 439–50, 1982.
 15. Vojinovic O, Nyborg H and Brannstrom M : Acid treatment of cavities under resin fillings ; bacterial growth in dentinal tubules and pulpal reactions. *J Dent Res* 52 : 1189–93, 1973.
 16. Stanley HR, Going RE and Chauncey HH : Human pulp response to acid pretreatment of dentin and to composite restorations. *J Am Dent Assoc* 91 : 817–5, 1975.
 17. Franquin JC and Brouilet JL : Biocompatibility of an enamel and dentin adhesive under different conditions of application. *Quint Int* 19 : 813–26, 1988.
 18. Qvist V, Stoltze K and Qvist J : Human pulp reactions to resin restorations performed with different acid-etch restorative procedures. *Acta Odontol Scand* 47 : 253–63, 1989.
 19. Pashley DH : The effects of acid etching on the pulpodentin complex. *Oper Dent* 17 : 229–42, 1992.
 20. Horsted-Bindslev P : Monkey pulp reactions to cavities treated with Gluma dental bond and restored with a microfilled composite. *Scand J Dent Res* 95 : 347–55, 1987.
 21. Fusayamas T : Factors and prevention of pulp irritation by adhesive composite resin restorations. *Quint Int* 18 : 633–41, 1988.
 22. Torstenson BC, Nordenvall KJ and Brannstrom M : Pulpal reaction and microorganisms under Clearfil composite resin in deep cavities with acid etched dentin. *Swed Dent J* 6 : 167–76, 1982.
 23. Cox CF, Felton D and Bergenholtz G : Histopathological response of infected cavities treated with Gluma and Scotchbond dentine bonding agents. *Am J Dent* 1 (special issue) 189–94, 1988.
 24. Felton D, Bergenholtz G and Cox C : Inhibition of bacterial growth under composite restorations following Gluma pretreatment. *J Dent Res* 68 : 491–5, 1989.
 25. Siew C, Gruninger SE, O'Young A, Ts'ao NK and Bowen RL : Biological safety evaluation of a novel dentine bonding system. *J Dent Res* 63(special issue) 313, abs no. 1277, 1985.
 26. Dumsha TC and Sydiskis RJ : Cytotoxicity testing of a dentin bonding system. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 59 : 637–41, 1985.
 27. Meryon SD and Brook AM : In vitro cytotoxicity of three dentine bonding agen-

- sts. *J Dent* 17 : 279–83, 1989.
28. Neroni M, Regad C, Christen O, Thoenen S and Holz J : Six produits adhésifs dentinaires soumis au contrôle in vitro. *J Biol Buccale* 18 : 271–85, 1990.
 29. Salomon JP, Desousa G, Roche M, Goldberg M and Rahmani R : In vitro cytotoxicity of dentin conditioners and primers assessed by neutral red and tetrazolium salt assays. *J Dent Res* 70 : 749, abstract no. 77, 1991.
 30. Li Y, Noblitt TW, Dunipage AJ and Stookey GK : Evaluation of mutagenicity of restorative dental materials using the Ames' salmonella/microsome test. *J Dent Res* 69 : 1188–92, 1990.
 31. Chohayeb AA, Bowen RL and Cobb EN : Pulp response to a dentine and enamel adhesive bonding procedure. *Oper Dent* 13 : 107–13, 1988.
 32. Bowen RL, Cobb EN and Rapson JE : Adhesive bonding of various materials to hard tooth tissues ; improvement in bond strength to dentine. *J Dent Res* 61 : 1070–6, 1982.
 33. Bowen RL and Cobb EN : A method for bonding to dentin and enamel. *J Am Dent Assoc* 107 : 734–6, 1983.
 34. Dumsha TC and Beckerman T : Pulp response to a dentine bonding system in miniature swine. *Dent Mater* 2 : 156–8, 1986.
 35. Blosser RL, Rupp NW, Stanley HR and Bowen RL : Pulpal and microorganism responses to two experimental dental bonding systems *Dent Mater* 5 : 140–4, 1989.
 36. Horsted-Bindslev P : Monkey pulp reactions to cavities treated with Gluma dental bond and restored with a microfilled composite. *Scand J Dent Res* 95 : 347–55, 1987.
 37. Grieve AR, Alani A and Saunders WP : The effects on the dental pulp of a composite resin and two dentin bonding agents and associated bacterial microleakage. *Int Endod J* 24 : 108–18, 1991.
 38. Cox CF, Felton D and Bergenholtz G : Histopathological response of infected cavities treated with Gluma and Scotchbond dentine bonding agents *Am J Dent* 1 (special issue) 189–94, 1988.
 39. Dagon IL, Van Leeuwen MJ and Heeley J : A comparison of the pulpal response to two dentin bonding agents. *J Dent Res* 65 (special issue) : 772, abstract no. 418, 1986.
 41. Rathbun MA, Craig RG, Hanks and Filisko FE : Cytotoxicity of a Bis-GMA dental composite before and after leaching in organic solvents. *J Biomed Mater Res* 25 : 443–57, 1991.
 42. Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC and Craig RG : cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res* 70 : 1450–5, 1991.
 43. The effect of oxygen inhibition on an unfilled/filled composite system. *J Dent Res* 69 : 1652–8, 1990.
 44. Hanks CT, Wataha JC, Parsell RR, Strawn SE and Fat JC : Permeability of biological and synthetic molecules through dentin. *J Oral Rehabil* 21 : 475–87, 1994.
 45. Pashley DH : consideration of dentine permeability in cytotoxicity testing. *Int Endod J* 21 : 143–54, 1988.
 46. Gerzina TM and Hume WR : Effect of hydrostatic pressure on the diffusion of monomers through dentin in vitro. *J Dent Res* 74 : 369–73, 1995.