

Comet assay를 이용한 Ferric Sulfate의 유전자 독성에 대한 연구

강호승 · 김 신 · 정태성 · 박혜련*

부산대학교 치과대학 소아치과학교실, 구강병리학교실*

국문초록

치수절단술은 유치의 치수치료 방법 중 사용빈도가 높은 시술 중 하나로 치수절단 술식에 사용되는 약제는 치수나 주위조직에 무해하여야 하며, 감염이나 내흡수 등의 부작용이 없어야 한다. 본 연구는 임상에서 유치의 지혈적 치수절단 술식의 약제로 사용되는 ferric sulfate의 유전자 독성을 평가할 목적으로 human gingival fibroblast에 ferric sulfate를 다양한 농도와 접촉시간을 설정한 후 comet assay를 이용하여 유전자 독성을 평가하여 보았다. 그 결과는 다음과 같다.

1. 농도에 따른 세포의 유전자 손상정도의 변화는 ferric sulfate의 농도에 비례하여 유전자 손상이 증가하는 양상을 나타내었다.
2. 농도에 따른 세포의 유전자 손상정도는 0.1mM 이상의 농도에서 대조군과 유의한 차이를 나타내었다($p < 0.05$).
3. 시간경과에 따른 세포의 유전자 독성의 변화는 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다($p > 0.05$).

주요어 : 치수절단술, ferric sulfate, 유전자독성, comet assay

I. 서 론

치수 절단술은 유치의 치수치료 방법중 사용빈도가 높은 시술중 하나로, 치아우식증에 감염되었거나 간접적으로 영향을 받은 치관부의 치수조직을 제거하고 다양한 약제를 적용하는 술식으로서, 잔존하는 치근부 치수조직의 생활력과 기능을 보존함을 그 목적으로 한다¹⁾.

현재 가장 널리 사용되고 있는 치수절단술식은 formocresol을 이용한 1-visit technique이다²⁾. Formocresol은 대개 70~90%의 높은 임상적 성공률이 보고되고 있고³⁾, 확실한 치수조직의 살균 및 고정능력을 가지는 반면, 약제 자체가 지닌 독성 및 국소적, 전신적 위해작용 때문에 많은 관심과 연구가 이루어져 왔다⁴⁾. Formocresol의 대표적인 위해작용으로 국소적으로는 영구 계승치의 치배에 영향을 줌으로써 법랑질 형성 부전증 또는 변위 등을 야기할 수 있으며, 전신적으로는 국소 적용된 formocresol이 체내로 흡수되어 신체의 여러 장기에 분포됨을 밝혀낸 많은 보고들이 있다⁵⁻¹¹⁾.

이러한 formocresol의 독성을 감소시키기 위한 노력의 일환으로 여러 대안들이 제시되었는데, 첫째로, 기존의 formocresol

을 희석하여 사용함으로써 독성을 낮추면서 동일한 임상적 성공을 얻으려는 방법이 소개되었다¹²⁾. Formocresol을 1 : 5로 희석한 Buckley's formula를 1 : 5로 희석시킨 formocresol은 현재까지도 임상적으로 널리 사용되는 농도이다. 둘째로, formocresol을 대체할 수 있는 약제의 개발을 위한 연구로서, calcium hydroxide, glutaraldehyde, ferric sulfate 등 다양한 약제들이 소개된 바 있다.

Ferric sulfate는 1857년부터 피부과 영역에서 Monsel's solution(20% ferric sulfate)이라는 이름으로 사용되기 시작하였는데¹³⁾, 이미 치과계에서는 오래 전부터 인상채득이나 근관수술시 지혈제로 사용되어 왔으며¹⁴⁾, 1988년 Landau와 Johnsen¹⁵⁾은 처음으로 ferric sulfate를 치수절단 약제로 소개하였다. 이 약제는 조직 고정작용이 없고 모세혈관내 미세혈병을 형성하여 혈병의 양을 최소화하면서 지혈을 시키는 특성이 있다. Fei 등¹⁶⁾은 임상 연구에서 ferric sulfate를 치수에 적용한 경우 하방조직에서 formocresol보다 양호한 조직반응과 함께 우수한 방사선학적, 임상적 성공률을 나타내었다고 보고하였다. Lemon 등¹⁷⁾은 ferric sulfate가 모세혈관에 형성한 미세혈병이 방어막의 역할을 하여 약제의 전신분포를 차단할 수 있

으므로 formocresol의 전신적인 독성을 극복할 수 있다고 보고 하였다.

Sch der 등¹⁸⁾은 치수절단술의 성공에 영향을 미치는 요소로서 치수내 혈병의 형성이 극소화되는 효율적인 지혈과정이 관련이 있다고 하였다. 이러한 관점에서 볼 때 ferric sulfate는 치수의 혈병의 양을 최소화하면서 치수지혈을 이루어 조직학적 치유를 도모하므로 치수치료의 목적에 잘 부합되며, formocresol을 대체할 수 있는 약제로 충분히 각광받을 만 하다. 그러나 이에 관한 연구는 여타 약제나 방법에 관한 연구에 비하여 미흡하며, 다양한 농도와 치수노출의 조건 등을 복합적으로 설정하여 그 결과를 조사한 연구는 찾아보기 힘들었다. 비록 혈병의 형성작용으로 전신적 위해작용을 막을 수 있다고 하나, 이 약제 또한 생체조직인 치수에 일차적으로 직접 적용되는 약제임에 틀림없으므로, 세포와 약제가 직접 접촉할 경우 발생할 수 있는 독성에 대한 연구가 필요하다고 사료되었다. 또한 잔존 ferric sulfate가 골조직과 장기간 접촉될 경우 염증을 유발한다는 보고가 있어¹⁹⁾ 치수에 대한 장기적 효과에 대한 연구 또한 계속적으로 이루어져야 할 것으로 사료되었다. 따라서 본 연구에서는 ferric sulfate가 인체 세포에 미치는 영향을 유전자 독성의 관점에서 검토할 목적으로 Comet assay(single cell alkaline gel electrophoresis)법을 이용하여 검증한 결과 다소의 지견을 얻게 되었다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

본 연구에서 사용된 재료는 다음과 같다.

Human gingival fibroblast (HGF-1)는 한국세포주은행에서 구입하였고, ferric sulfate는 Astringedent® (Ultradent Products, U.S.A.)를 사용하였으며, low melting agarose는 Seakem사 제품을 사용하였으며, cell culture medium으로서 Dulbecco's Modification of Eagle's medium(DMEM), phosphate-buffered saline(PBS), 10% FBS(fetal bovine serum)는 Gibco사의 제품을 사용하였다. 그 외의 대부분의 약제는 Sigma사의 제품을 사용하였다.

2. 세포배양

본 연구에서 대상으로 쓰인 세포는 human gingival fibroblast (HGF-1)로서 penicillin-streptomycin이 첨가된 Dulbecco's Modification of Eagle's medium(DMEM)과 10% fetal bovine serum (FBS)배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 배양된 세포는 6 well plate에 1×10⁶ cell/well 정도의 밀도까지 배양하였으며, 최대밀도에 도달하는 기간은 8~10일정도 소요되었다.

3. Ferric sulfate의 처리 및 준비

본 연구에서 사용한 약제는 Astringedent® (Ultradent Co, U.S.A.)이며 이 약제는 15.5% 수용액이다. 희석시 약제를 혈청이 포함되지 않은 배지로 단계적으로 희석시켜 여러 농도로 측정하였다.

4. 약제의 적용방법

본 연구에서는 두 가지의 실험방법을 적용하였다.

첫째 방법은 약제의 농도를 다양하게 적용하여서 유전자의 손상을 일으키는 농도를 측정하는 방법으로서 단계적으로 희석된 ferric sulfate를 30분간 적용하였다. 실험에 사용된 농도는 0.01, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00, 5.00mM로 설정하였다. 대조군은 ferric sulfate를 첨가하지 않고 혈청이 없는 순수배지만을 적용한 경우로 설정하였다.

두 번째 방법은 약제와의 접촉시간을 다양하게 적용하는 방법으로서 임상적으로 ferric sulfate를 치수에 적용시키는 시간은 15초에서 30초 정도이므로, 첫 번째 실험의 결과에서 독성을 일으키지 않은 가장 높은 농도의 ferric sulfate를 다양한 시간에 적용하였다. 약제의 적용시간은 10, 20, 30, 45, 60분으로 설정하였다. 대조군은 약제를 적용한 후 즉시 제거한 경우로 설정하였다.

5. 배양된 세포에 약제를 적용.

배양된 세포를 pH 7.4의 PBS로 두 번 세척하여, DNA 손상의 유발유무를 관찰하기 위하여 배지에 희석된 다양한 농도의 약제를 30분간 적용하였다. 이후 남은 약제를 깨끗이 제거하기 위하여 PBS로 두 번 씻은 후 trypsin/EDTA를 이용하여 세포를 떼어낸 후, 세포를 100×g, 3분간 원심분리하였다. 분리된 상층부의 액을 제거한 후 남은 세포와 PBS를 혼합한다. 이때 세포액 일부를 trypan blue와 혼합하여 cell viability와 세포의 갯수를 측정하였다. 남은 세포액은 다시 원심분리한 후 최종적 세포의 밀도는 1~5×10⁶ cells/ml가 되도록 PBS로 조정한 후, 이후 세포액을 1 : 10의 비율로 0.6% low melting point agarose(LMA) 75μl와 37°C에서 혼합하였다.

6. Comet assay

이 방법은 손상된 유전자의 경우 전기영동후 관찰하면 유성의 꼬리와 같은 모양이 나타나며, 이 꼬리의 길이를 측정하여 손상정도를 가늠하는 방법으로서 실험과정은 다음과 같다.²⁰⁻²¹⁾

- 1) Slide glass에 phosphate buffered saline(PBS)으로 녹인 0.8% low melting point agarose(LMA) 85μl를 spread한다.
- 2) Coverslip을 덮고 4°C에서 5분간 freezing한다.

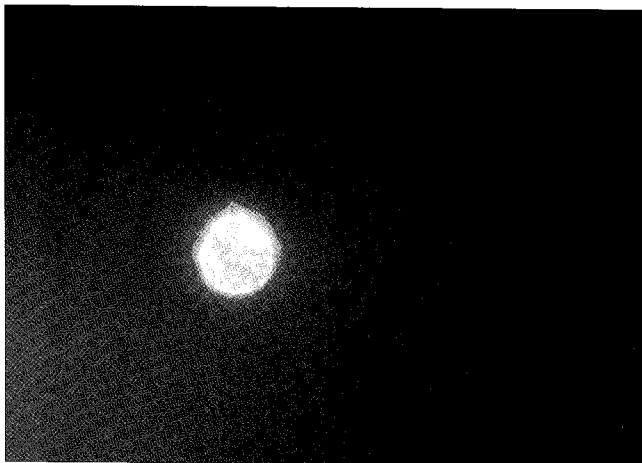
- 3) Coverslip을 벗기고 준비된 세포와 LMA의 혼합물을 피펫으로 옮긴다.
- 4) Coverslip을 덮고 4°C에서 5분간 freezing한다.
- 5) Coverslip을 벗기고 0.8% low melting point agarose(LMA) 85μl를 다시 spread한다.
- 6) Coverslip을 덮고 4°C에서 5분간 freezing한다.
- 7) Coverslip을 벗기고 4°C에서 60분 동안 암실에서 lysing 한다. 이때 lysing solution은 1% sodium sarcocinate, 2.5M NaCl, 100mM Na₂EDTA, 10mM Tris-HC(pH 10), 1% Triton X-100, 10% DMSO(dimethyl sulfoxide)로 구성된다.
- 8) 전기영동한다. 이때 horizontal electrophoresis unit은 1mM Na₂EDTA, 300ml NaOH 완충용액으로 채워져 있다. Slide glass는 30분간은 용액에 담근 채로 유지한 후, 다시 30분간은 25V, 200~250mA 전기영동한다.
- 9) 위의 과정이 끝나면 세척한다. 세척제는 0.4M Tris buffer(pH 7.4)를 사용하며, 3번 반복한다.

- 10) 건조시킨 후 염색한다. 염색제는 ethidium bromide 20 μg/ml로 5~10분간 시행한다.
- 11) Coverslip을 덮고 100% 습도에서 보관한다.

7. 유전자 손상의 관찰.

각각의 슬라이드는 coverslip을 덮은 후 형광 현미경 (Olympus, Japan)으로 400배에서 관찰하는데, 전기영동된 각각의 세포중 100개의 세포를 무작위로 골라서 세포에서 나온 DNA의 손상정도를 측정하였다. 이때 손상의 정도는 손상이 없는 경우, 약간의 손상이 있는 경우, 손상이 있는 경우, 심한 손상이 일어난 경우의 네 가지의 등급으로 구분하였다(Fig. 1). 각 등급에는 점수를 부여하였으며 (손상이 없는 경우 1점, 약간의 손상이 있는 경우 2점, 상당한 손상이 있는 경우 3점, 아주 손상이 심하여 형체가 파괴된 경우 4점), 각 농도당 유전자 손상의 총 점수를 합하여 대조군과 비교하였다.

모든 실험에서 viability의 기준은 80% 이상으로 하였으며,



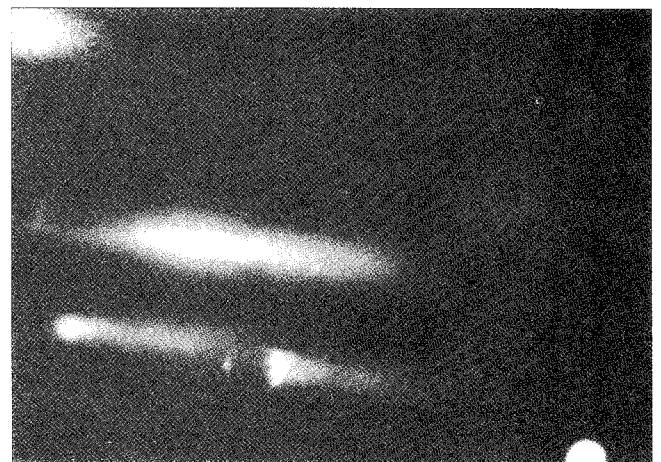
A. Undamaged (Score 1).



B. Slightly damaged (Score 2).



C. Damaged (Score 3).



D. Highly damaged (Score 4).

Fig. 1. Comet images of human gingival fibroblasts after treatment with ferric sulfate. These comets illustrate examples of the visual scoring classification.

각 슬라이드에서 유전자 손상의 정도값의 합을 비교하였다. 실험의 정밀도를 높이기 위하여 각 농도에서 복제 슬라이드를 하나 이상 제작하여 총합의 평균치를 대조군과 비교하였다.

현저한 길이의 변화를 관찰할 수 있는 약제의 최소량을 확인하기 위해서 각 농도의 값을 대조군과 비교하기 위해 student *t* test를 적용하였다. Comet assay는 다양한 유전자 손상의 측정방법(예를 들면, tail length, tail moment 등²²⁾)으로 유전자 손상을 측정할 수 있으나, 본 실험에서 사용한 방법은 많은 수의 슬라이드를 관찰할 때 간단하고 유용한 방법이다²³⁾.

Ⅲ. 연구 성적

1. 실험 1 : 다양한 농도의 ferric sulfate를 30분간 적용

실험 1은 30분간 여러 가지 농도의 ferric sulfate를 적용하였을 때의 DNA의 손상을 측정할 수치이다.

Table 1에는 다양한 농도의 ferric sulfate를 적용하였을 때의 DNA의 손상정도를 제시하였고, 각 자료의 분포도는 Fig. 2에 표시되어 있다.

실험 결과, ferric sulfate 처리된 comet의 평균치는 약제가

Table 1. DNA migration in human fibroblasts treated with ferric sulfate in variable concentration

concentration (mM)	viability (%)	DNA damage. (Sum of arbitrary unit) mean (SD)
0	90.58	148.3 (5.6)
0.01	93.41	153.0 (6.6)
0.05	88.49	160.1 (5.1)
0.10	91.84	212.1 (8.6)
0.50	88.04	231.4 (6.1)
1.00	84.00	262.2 (8.7)
5.00	67.31	299.9 (13.3)

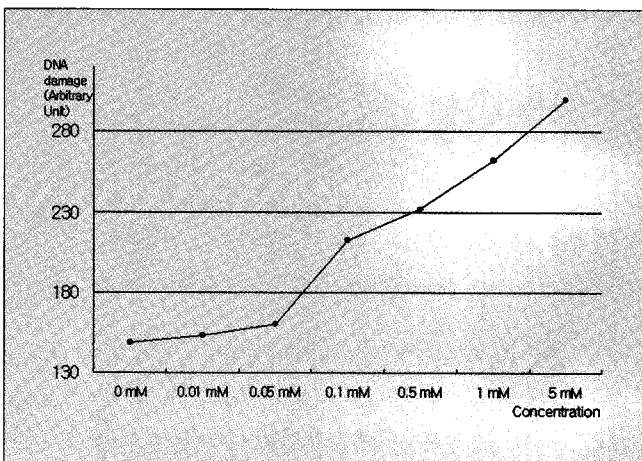


Fig. 2. Histogram of the distribution of DNA damage in human fibroblasts after treatment with ferric sulfate of various concentration.

포함되지 않은 대조군과 비교할 때 농도에 비례하여 증가되는 양상을 보였으며, 0.1mM의 농도에서 대조군과 비교할 때 통계학적으로 유의한 차이를 나타내었으며($p < 0.05$), 이때 cell viability는 91% 이상으로서 현저한 세포독성이 없는 농도에서도 유전자 독성을 확인할 수 있었다. 5mM 이상의 농도에서는 cell viability의 감소와 DNA 손상 모두 관찰할 수 있었다.

2. 실험 2 : 일정농도의 ferric sulfate를 다양한 시간으로 적용

실험 2는 일정한 농도의 약제를 다양한 접촉시간으로 적용하는 방법으로서 본 실험에서 적용한 ferric sulfate의 농도는 실험 1에서 통계학적으로 유의한 결과를 보인(현저한 DNA 손상의 증가가 관찰된) 0.1mM보다 한 단계 낮은 0.05mM의 농도를 이용하였다.

Table 2에는 일정한 농도의 ferric sulfate를 다양한 시간으로 적용하였을 때의 DNA 손상정도가 제시되었으며, 각 자료의 분포도는 Fig. 3에 표시된 바와 같다.

실험 결과, 모든 경우에서 cell viability는 80% 이상이었으며, 적용시간에 따른 DNA 손상정도의 변화량은 거의 없었으며 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다($p > 0.05$).

Table 2. DNA migration in human fibroblasts treated with ferric sulfate in variable exposure time

Exposure time (min.)	DNA damage(Sum of arbitrary unit) mean (SD)
0	155.1 (6.5)
10	150.0 (5.1)
20	161.4 (3.5)
30	154.2 (6.6)
45	163.6 (6.0)
60	161.4 (4.7)

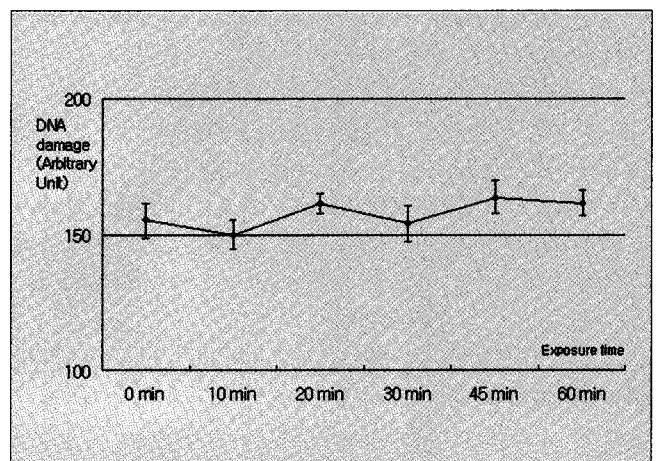


Fig. 3. Histogram of the distribution of DNA migration length in human fibroblasts after treatment with ferric sulfate of various time of exposure.

IV. 총괄 및 고안

Single cell gel electrophoresis(SCGE)는 일명 comet assay라고도 하며, 새로운 약제나 화합물에 대한 개개 세포의 유전자 손상을 확인할 수 있는 신속하고 신뢰할 만한 방법이다. 이 연구방법은 DNA single strand breaks나 alkali-labile site를 쉽게 찾을 수 있는데²³⁾, 원리를 살펴보면, 손상된 DNA의 이중나선분자는 complex supercoiling을 방출하고 유리된 DNA는 양극으로 이동하게 되어 유성(comet)의 형태를 띄게 된다²⁴⁾.

Comet assay는 여러 가지 용도에 적용할 수 있는데, 화합물이나 방사선에 노출된 DNA의 손상과 회복을 측정할 때²⁵⁾, 돌연변이의 유발이 예상되거나 발암성을 가진 물질의 유전자 독성을 확인할 때²⁶⁾, 그리고 세포소멸을 시각화할 때 등이다.

이 분석방법의 장점중의 하나는 포유동물의 세포를 배양하여(in vitro mamalian cell culture system) 사용할 수 있는 것이다²⁷⁾. 물론 다양한 종류의 포유동물의 세포를 사용할 수 있으며²⁸⁾, 심지어 동물세포나 암종세포, 돌연변이 세포도 실험에 적용 가능하다. 본 실험에서 사용한 세포는 human gingival fibroblast이며, 정상인에서 얻은 fibroblast는 쉽게 배양할 수 있고, 사용가능하다. 또 다른 장점으로는 세포의 수가 많지 않아도 되며, 핵분열이 없는 상태에서도 DNA의 손상을 확인할 수 있다는 점이다²⁹⁾.

세포에 대한 독성 연구에 있어서 상기할 점은 세포독성과 유전자 독성간의 상관관계이다. 사용된 화합물의 특성에 따라 높은 농도에도 불구하고 세포독성은 없으면서, 유전자 손상을 일으키는 경우도 있으며^{30,31)}, 매우 높은 세포독성을 가지는 농도의 화합물이 DNA에는 전혀 손상을 미치지 않는 경우도 있다³²⁾.

Comet assay는 원래 유전자 독성을 측정하는 방법이지만, 실험 내용중 cell viability를 측정하기 위해 trypan blue dye exclusion method를 이용하여서, 약제가 미치는 세포독성을 측정할 수 있으므로, 죽은 세포가 나타나는 비율과 comet 길이의 변화를 연관하여 비교할 수 있다.

본 실험에서 배양된 세포에 약제를 적용한 후 agar와 혼합하기 전에 trypan blue exclusion을 시행한 결과, ferric sulfate는 5mM의 농도에서 세포독성이 있음을 확인할 수 있었다. 실험 1에서는 0.1~1mM의 농도에서 cell viability의 변화가 거의 없었으나, comet tail의 길이 변화는 통계학적으로 유용한 수치임을 알 수 있었다. 이것은 ferric sulfate가 DNA 손상을 유발함에 있어 이미 죽은 세포는 실제적인 역할을 하지 않음을 의미하며, 세포독성은 없으나 유전자 손상을 일으키는 농도가 존재함을 시사한다. 물론 ferric sulfate의 세포독성에 관한 정교한 실험이 뒷받침되어야 하나, ferric sulfate의 세포독성만을 단독으로 비교하여 본다면, 본 실험에서 사용된 ferric sulfate의 최대 비독성 농도는 Jeng 등³³⁾이 언급한 formocresol이나 glutaraldehyde의 최대 비독성 농도보다 더욱 높은 결과를 나타내어 약제 자체의 세포독성은 다른 치수절단술 약제에 비하

여 낮다고 추정할 수 있으나, 이 부분은 보다 많은 연구가 이루어진 다음에 판단할 수 있을 것으로 사료되었다.

Jeansonne 등¹⁹⁾은 ferric sulfate가 골조직과 장기간 접촉하였을 때 만성적 염증을 나타냄을 보고하였으나, Lemon 등¹⁸⁾은 ferric sulfate에 노출된 부위를 깨끗이 소파하고, 식염수로 세척한 후 장기간 관찰시 만성적 염증이나 골조직의 회복에 해로운 영향을 관찰할 수 없었다고 보고하였다. 본 실험에서 시간에 따른 ferric sulfate의 유전자 독성에 관한 결과는 ferric sulfate가 세포와 접촉하는 시간이 증가할수록 세포독성과 유전자 손상은 미약하게 변화되는 양상을 보였으나 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 본 실험에서는 약제의 적용시간을 최대 60분으로 설정하였으며, cell viability는 80% 이상 유지되었다. 임상적으로 약제를 적용하고 세척하는 시간이 이보다 길게 적용되는 않을 것으로 판단된다. 본 실험에서는 시간 경과에 따른 유전자 손상정도의 증가 양상은 관찰할 수 없었다. 치수절단술을 시행할 경우, ferric sulfate의 적용시간이 15초에서 1분 정도이므로, ferric sulfate의 독성을 최소화하기 위해서는 약제 적용후 식염수로 깨끗이 세척하여야 함을 보여준다.

Fei 등¹⁶⁾은 ferric sulfate는 formocresol과 달리 치수조직을 미이라화하지 않으므로, 치수조직의 면과 직접 접촉하게 되는 이장재가 치수에 중요한 역할을 한다고 하였으며, 이때 통상적 이장재인 Zinc Oxide Eugenol(ZOE)은 치수에 염증반응을 일으키므로³⁴⁾ 이상적인 이장재가 아니라고 할 수 있다. 이것은 ZOE에 함유된 eugenol(4-allyl-2- methoxyphenol)의 독성에 기인한 것으로 다른 문헌에서도 eugenol의 유전자 독성을 확인한 바 있다^{35,36)}. Eugenol 이장재에 의한 염증반응은 고정제를 사용한 치수조직에 비해 사용하지 않은 조직에서 더욱 심한 것을 볼 수 있었다³⁷⁾. 즉 치수와 일차적으로 접촉하는 ferric sulfate의 독성이 미미하더라도, 고정되지 않은 치수조직에 이장재로부터 유리된 물질이 또한 독성문제를 야기할 여지가 있다. 그러므로 ferric sulfate는 치수세포의 부착을 촉진하여 보다 빠르고 염증을 덜 유발하는 창상치유를 가능하게 하는 불활성의 이장재와의 임상적 사용에 대한 연구가 필요할 것으로 생각되었다.

본 연구를 통해 임상적으로 사용되는 15.5%(0.39M)의 ferric sulfate는 유전자 손상을 유발할 수 있는 농도임을 알 수 있었다. 따라서 동일한 지혈효과를 얻을 수 있다면 기존의 농도보다 더욱 희석하여 사용하거나, 다른 약제와 혼합하여 독성을 없앤 후 사용하는 등 현재의 독성을 감소시키기 위한 연구와 노력이 계속되어야 할 것으로 사료되었다.

V. 결 론

본 연구는 인체 세포 자체에 ferric sulfate가 미치는 영향을 유전자 독성의 관점에서 검토할 목적으로 human gingival fibroblast를 대상으로 comet assay (single cell alkaline gel electrophoresis)를 시행하였다. Ferric sulfate를 다양한 농도

와 접촉시간으로 적용하여 그 결과를 형광 현미경으로 관찰함으로써 유전자 손상을 분석한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 농도에 따른 세포의 유전자 손상정도의 변화는 ferric sulfate의 농도에 비례하여 유전자 손상이 증가하는 양상을 나타내었다.
2. 농도에 따른 세포의 유전자 손상정도는 0.1mM 이상의 농도에서 대조군과 유의한 차이를 나타내었다($p < 0.05$).
3. 시간경과에 따른 세포의 유전자 독성의 변화는 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다($p > 0.05$).

참고문헌

1. Guideline for pulp therapy for primary and young permanent teeth. AAPD reference manual 1991-1992, p.53-56. Am Assoc Ped Dent.
2. Redig DF : A comparison and evaluation of two formocresol pulpotomy technics utilizing "Buckley's" formocresol. J Dent Child 35:22-30, 1968.
3. Alacam A : Pulpal tissue changes following pulpotomies with formocresol, glutaraldehyde-calcium hydroxide, glutaraldehyde-zinc oxide eugenol pastes in primary teeth. J Pedod 13:123-132, 1988.
4. Lewis BB : Formaldehyde in dentistry : A review for the millennium. J Clin Pediatr Dent 22(2):167-77, 1998.
5. Myers DR, Shoaf HK, Dirksen TR, et al. : Distribution of ^{14}C -formaldehyde after pulpotomy with formocresol. J Am Dent Assoc 96:805-13, 1978.
6. Ranly DM : Formocresol toxicity. Current knowledge. Acta Odontol Pediatr 5:93-8, 1984.
7. Lewis BB, Chestner SB : Formaldehyde in dentistry : A review of mutagenic and carcinogenic potential. J Am Dent Assoc 103:429-34, 1981.
8. Ketley CE, Goodman JR : Formocresol toxicity : Is there a suitable alternative for pulpotomy of primary molars? Int J Pediatr Dent 2:67-72, 1991.
9. Ranly DM, Rulton R : Reaction of rat molar pulp tissue to formocresol, formaldehyde and cresol. J Endodon 2:176-81, 1976.
10. Sun HW, Feigal RJ, Messer HH : Cytotoxicity of glutaraldehyde and formaldehyde in relation to time of exposure and concentration. Pediatr Dent 12:303-307, 1990.
11. Hill SD, Berry CW, Seale NS, et al. : Comparison of antimicrobial and cytotoxic effects of glutaraldehyde and formocresol. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 71:81-95, 1991.
12. Straffon LH, Han SS : Effects of varying concentrations of formocresol on RNA synthesis of connective tissue in sponge implants. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 29:915-925, 1970.
13. Larson PO : Topical hemostatic agents for dermatologic surgery. J Dermatol Surg Oncol 14:623-31, 1988.
14. Christensen GJ, Christensen R : Astringent by Ultradent. Clin Res Assoc Newsletter 3:2, 1979.
15. Landau MJ, Johnsen DC : Pulpal response to ferric sulfate in monkeys. J Dent Res 67:215(Abstr 822), 1988.
16. Fei AL, Udin RD, Johnson R : A clinical study of ferric sulfate as a pulpotomy agent in primary teeth. Pediatr Dent 13(6):327-332, 1991.
17. Lemon RR, Steele PJ, Jeansonne BG : Ferric sulfate hemostasis : Effects on osseous wound healing. I. Left in situ for maximum exposure. J Endod 19(4):170-173, 1993.
18. Schr der U : A 2-year follow-up of primary molars, pulpotomized with a gentle technique and capped with calcium hydroxide. Scand J Dent Res 86:273-78, 1978.
19. Jeansonne BG, Boggs WS, Lemon RR : Ferric sulfate hemostasis : Effects on osseous wound healing. II. With curettage and irrigation. J Endod 19(4):174-176, 1993.
20. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, et al. : A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res 175:184-91, 1988.
21. Ralph S, Petras M : Genotoxicity monitoring of small bodies of water using two species of tadpoles and the alkaline single cell gel (comet) assay. Environ Mol Mutagen 29(4):418-30, 1997.
22. Bocker W, Bauch T, Muller-WU : Image analysis of comet assay measurements. Int J Radia Biol 72(4):449-60, 1997.
23. Susan J, Duthie A, Collins R : The influence of cell growth, detoxifying enzymes and DNA repair on hydrogen peroxide-mediated DNA damage (measured using the comet assay) in human cells. Free Rad Biol & Med 22(4):717-24, 1997.
24. Hellman B, Vaghef H, Fris L, et al. : Alkaline single cell gel electrophoresis of DNA fragments in biomoni-

- toring for genotoxicity : An introductory study on healthy human volunteers *Int Arch Occup Environ Health* 69(3):185-92, 1997.
25. Faribairn DW, Olive PL, O'neill KL : The comet assay : a comprehensive review *Mutat Res* 339(1):37-59, 1995
 26. Hartman A, Speit G : Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister-chromatid exchanges (SCE). *Mutat. Res.* 346(4):49-56, 1995.
 27. Singh NP, Tice RR, Stephens RE, et al. : A microgel electrophoresis technique for the direct quantization of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. *Mutation Res* 252:289-96, 1991.
 28. Rojas E, Valverde M, Sordo M, et al. : DNA damage in exfoliated buccal cells of smokers assessed by the single cell electrophoresis assay. *Mutation Res* 370(2):115- 120, 1996.
 29. Sasaki YF, Tsuda S, Izumiyama F, et al. : Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Mutation Res* 388(1): 33-44, 1997.
 30. Duthie SJ, Johnson W, Dobson VL : The effect of dietary flavonoids on DNA damage(strand breaks and oxidised pyrimidines) and growth in human cells. *Mutation Res* 390(1):141-151, 1997.
 31. Miyamae Y, Zaizen K, Ohara K, et al. : Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell electrophoresis (Comet) assay. 1. Relationship between the onset of DNA damage and the characteristics of mutagens. *Mutat Res* 393(1):99-106, 1997.
 32. Jeng JH, Kuo ML, Hahn LJ, et al. : Genotoxic and non-genotoxic effects of betel quid ingredients on oral mucosal fibroblasts in vitro. *J Dent Res* 73:1043-49, 1994.
 33. Jeng HW, Feigal RJ, Messer HH : Comparison of the cytotoxicity of formocresol, formaldehyde, cresol, and glutaraldehyde using human pulp fibroblast cultures. *Pediatr Dent* 9:295-300, 1987.
 34. Garcia-Godoy F : A comparison between zinc oxide eugenol and polycarboxylate cements on formocresol pulpotomies. *J Pedod* 6:203-17, 1982.
 35. Woolverton C, Fotos P, Mokas M, et al. : Evaluation of eugenol for mutagenicity by the mouse micronucleus test. *J Oral Pathol* 15:450-453, 1986.
 36. Rompelberg CJ, Evertz SJ, Brijntjes-Rozier GC, et al. : Effect of eugenol on the genotoxicity of established mutagens in the liver. *Food Chem Toxicol* 34:33-42, 1996.
 37. Cotes O, Boj JR, Canalda C, et al. : Pulpal tissue reaction to formocresol vs. ferric sulfate in pulp-tomized rat teeth. *J Clin Pediatr Dent* 21(3):247-54, 1997.

Abstract

EVALUATION OF THE GENOTOXICITY OF FERRIC SULFATE BY COMET ASSAY

Ho-Seung Kang, Shin Kim, Tae-Sung Jeong, Hae-Ryoun Park*

Department of Pediatric Dentistry, Oral Pathology, College of Dentistry, Pusan National University*

Although ferric sulfate has been proposed as an alternative to formocresol in pulpotomy treatment in primary teeth, it has been given little concern regarding its cytotoxicity and mutagenicity. In the present study, we assessed the in vitro genotoxic effect of a ferric sulfate on human gingival fibroblast cell line (HGF-1). DNA damage was evaluated using comet assay (single cell alkaline gel electrophoresis) and obtained the results as follows:

1. A dose-response relationship was found between ferric sulfate concentrations (0 to 5mM) and DNA damages.
2. Above the concentration of 0.1mM, DNA damage was significantly increased than those of the control ($p < 0.05$).
2. At the fixed concentration of 0.05mM, no significant difference was found between exposure time and DNA damage.

These findings suggest that ferric sulfate as a pulpotomy agent can induce DNA damage in human gingival fibroblasts.

Key words : Pulpotomy, Ferric sulfate, Genotoxicity, Comet assay