

# 인체 섬유모세포(HGF-1) 배양에서 소아용 치과금속재의 세포친화성에 대한 분자생물학적 연구

김주미 · 정태성 · 김 신

부산대학교 치과대학 소아치과학교실

**국문초록**

소아치과 임상에 흔히 사용되는 3종의 금속재에 의한 인체 섬유모세포(HGF-1)를 이용하여 세포독성에 대한 세포적 및 분자적 접근을 시도하였다. 세포의 성장과 증식 및 세포사, 그리고 이들과 관련된 세포내 신호전달물질 발현의 변화를 보고자 하였고, 세포사는 screening한 후 세포사의 유형(necrosis/apoptosis)을 규명하고자 하였다. HGF-1은 DMEM으로 계대배양한 후 유지하였으며, 사용한 금속재는 stainless steel crown (R), 교정용 band(B), 교정용 wire(W)의 세 종류였다. HGF-1세포의 증식에 대하여 기본적으로 cell count를 하였고, 생존세포 count를 위하여 대조군에 대한 실험군의 상대증식도를 계산하였다. 세포수는 배양일이 지남에 따라 증가하여 7일째에 최고를 나타내었고, 11일째에는 감소하였으며, 대조군과 실험군 사이의 통계적 유의한 차이는 관찰되지 않았다( $p>0.05$ ). 대조군에 대한 실험군의 상대증식도 또한 유의한 차이는 없었다( $p>0.05$ ). 세포사에 대한 형태적 소견은 괴사(necrosis)를 나타내었다. PCNA lableing index에 대한 대조군과 실험군 간에 유의한 차이는 없었다( $p>0.05$ ). 신호전달 관련 MAP kinase인 ERK1 및 ERK2, p38, JNK는 배양일의 경과에 따른 발현의 변화는 관찰되었으나, 대조군과 각 실험군 간에 차이는 관찰되지 않았다.

결론적으로 본 연구대상인 stainless steel crown, 교정용 band 와 wire, 세 종류의 소아 치과용 금속재는 단기간의 인체 섬유모세포를 이용한 세포친화성 검정에 있어서 세포적, 분자적 위해 양상을 나타내지 않았다.

**주요어** : HGF-1, 치과금속재, 세포독성, PCNA, MAP kinase

**I. 서 론**

어린이의 수복 치료는 유치와 미성숙 영구치를 대상으로 한다. 유치는 손상의 정도와 사용할 기간에 따라 수복치료의 내용이 다양해지며, 미성숙 영구치는 성숙한 영구치와는 다른 고유한 특징을 가지고 있어서 그에 부합되는 고려가 필요하다.

기성금관(preformed stainless steel crown)을 이용한 영구치의 수복은 소아치과학 분야의 고유한 술식이라 할 수 있으며, 1947년 Humphrey가 stainless steel crown을 유치에 응용한 이래 어린이의 치과 치료에 필수적인 술식이 되었다<sup>1,2)</sup>.

또한, 기성금관 뿐 아니라, 여러 종류의 금속재가 어린이의 치과치료에 사용되고 있는데, 치아 우식증이나 외상으로 인해 영구치가 조기에 상실된 경우, 공간유지나 교합유도를 위해 교정용 band 또는 clasp와 loop를 위한 wire를 이용하여 distal shoe나 고정성 또는 가철성 공간유지 장치가 사용되어진다.

이러한 용도로 사용되는 금속재는 일반적으로 두 종류 이상의 금속이나 금속과 비금속의 혼합물로서 합금의 성질은 그 조성을 이루는 각 금속의 종류에 따르는 것은 물론이고, 조성성분 상호간의 비율과 온도에 의해서도 달라진다<sup>3)</sup>. 또한, 합금의 생

체 적합성은 생체 환경에서의 부식에 대한 저항성과 방출될 수 있는 금속이온의 종류와 양에 의해서도 영향을 받게 된다<sup>4)</sup>. 따라서, 기성금관, 교정용 band, 교정용 wire는 장기간 구강내 조직과 직접 접촉하고 있어 기계적 자극 뿐 아니라, 성분 유출에 의한 위해성도 문제가 될 수 있어 생체적합성에 대한 고려가 필수적이다.

이러한 재료는 생체라는 특수한 환경에서 사용되어야 하므로 물리화학적 및 생화학적으로 적절한 성질을 가져야 할 뿐 아니라 조직과의 관계에서 독성 반응을 나타내지 않아야 하고 장단기적인 생물학적 이상 반응을 보이지 않아야 한다<sup>5)</sup>.

그리고, 생체재료는 조직 및 세포에 대한 급만성 세포 손상, 세포 증식, 압 유발, 과민성 반응 등이 고려되어야 하며, 이에 대하여 주로 배양세포를 대상으로 여러 실험실적 연구가 이루어져 왔다. 그러나 생체재료는 주위 조직과 친화성을 가지고 장기간 안전하게 유효한 기능을 발휘하여야 하기 때문에, 실제 상황과 동등한 시료를 인체와 유사한 실험동물에 매식하여 이물질에 대한 병태생리적 현상을 검토하여 그 안정성과 기능성을 규명하여야 마땅하다. 이러한 치과재료의 독성이나 과민성 반응에 대한 평가로서 ADA 규격<sup>6)</sup>이 정한 것은 phase I 연구,

phase II 동물실험, 그리고 phase III 임상 전단계 검사 등이 있다. 일반적인 세포독성 검사는 phase I 연구에 속해 있으며, 세포 개체에 대한 재료의 영향을 평가할 수 있는 가장 기초적인 방법으로 알려져 있다. 여기에는 세포수 산정<sup>7,8)</sup>, 세포 내 DNA, RNA 및 단백질의 함량 측정<sup>9)</sup>, 방사선 동위원소<sup>10)</sup>를 이용하거나, 효소기능 측정<sup>11)</sup> 그리고 세포내 대사량 측정 등에 대한 방법이 연구되어 왔다. 이들의 세포독성 검사방법은 급성 세포독성에 대한 개괄적인 방법으로 주로 세포사에 대한 기능적 평가방법에 속한다. 그러나 매식한 생체재료의 장시간 경과후의 생체반응에 대한 연구는 세포배양 뿐 아니라 동물실험에서도 한계가 있다.

최근 분자생물학의 발달과 생명공학 기법의 증진에 힘입어, 세포 혹은 조직에 대한 자극으로 인한 암 유발 등의 만성적 현상에 대해 초기 분자적, 생화학적 변화에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다. Cu와 같이 현저한 급성 세포사를 유도하는 세포독성 물질을 제외한 금속재들에 있어서도 만성 병변이나 발암 등에 대한 연구가 필요하다. 이들 병변의 완전한 표현형에 대한 연구는 실험실에서는 거의 불가능하나 초기 단계의 중요한 인자들에 관한 분석은 실험실에서 용이한 세포배양을 이용하여 할 수 있으며, 치과영역에서의 생체재료에 대한 분자생물학적 연구는 알려진 바가 많지 않았다.

세포손상의 결과 나타나는 대표적인 두 가지 범주는 세포사와 세포증식이다. 세포사에는 괴사(necrosis)와 고사(apoptosis)가 있고, 세포증식의 극한 상황은 발암이다. 일반적으로 세포독성을 screening할 때 여러 가지 방법에 의하여 세포사의 유무를 우선적으로 검사하며, 세포사가 있을 때에는 어느 유형인지 알아야 한다. 세포사와 세포증식은 서로 상반되는 현상이나, 때로는 죽은 세포에서 나오는 물질이 신호로 작용하여 세포증식을 유도할 수도 있다. 성장 호르몬, 사이토카인, 스트레스 등의 세포와 신호가 과녁세포의 세포표면에 있는 수용체와 결합하게 되면, 세포내 신호전달물질이 여러 단계에 걸쳐 활성화되어 궁극적으로 세포성장 및 증식, 분화, 노화, 고사 등을 유발하게 된다. 세포내 신호전달물질들의 활성화는 일련의 serine-threonine protein kinases에 의하여 일어나며, 이들 MAP (mitogen active protein) kinases에는 크게 ERKs (extracellular signal-related kinases)<sup>12,13)</sup>, JNKs (c-Jun NH2-terminal kinases)<sup>14)</sup>, p38<sup>15)</sup> (p38 MAP kinase) 그리고 ERK5/Big<sup>16)</sup> MAP kinase 1의 4개 group이 있다. ERKs는 세포성장 및 증식 신호와 관련이 있고, JNKs와 p38은 사이토카인 혹은 스트레스 등의 신호를 받아서 세포의 증식, 분화 및

세포사 등을 유도한다. 세포증식에 대한 보편적인 분자적 marker로는 DNA 복제와 관련이 있는 세포핵의 3H-thymidine incorporation<sup>17)</sup>, Brd-U incorporation 및 증식세포핵항원 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)의 발현을 들 수 있다.

본 연구는 인체 섬유모세포(HGF-1)를 배양하여 소아치과 임상에서 흔히 사용하는 3종의 금속재에 대한 기본적인 세포독성 검사로써, 세포수를 산정하여 생존세포율을 구하며 생물학적 반응을 관찰함과 동시에 세포사 존재시에는 그 유형을 관찰할 목적으로 시도되었다. 그리고, 더 나아가 세포의 성장과 증식에 관련된 보편적인 지표자 중의 하나인 증식세포핵항원 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)의 labeling을 검사한 후, 신호전달관련 MAP kinase인 ERK1, ERK2, JNK 및 p38의 발현 유무와 경향을 연구하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 연구 재료

현재 소아치과 영역에서 널리 사용되고 있는 3종의 금속재를 연구대상으로 하였다. 이들의 형태와 구성성분은 Table 1에 제시된 바와 같다. 편의상 stainless steel crown을 R, 교정용 band를 B, 그리고 교정용 wire를 W로 표기하였다. 각 금속시편들은 실험 전에 초음파 세척한 다음 가압멸균기에서 120℃, 30분간 멸균 소독하고 건조하여 사용하였다.

### 2. 연구 방법

#### 1) 세포 배양

본 연구에서 사용한 인체 섬유모세포(human gingival fibroblast, HGF-1)는 미국 ATCC사에서 구입하였다. 세포 배양액은 penicillin-streptomycin (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, USA)과 10% fetal bovine serum (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, USA)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, USA)을 이용하였으며, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건을 유지하였다. HGF-1은 분양받은 후 계대배양한 3세대에서 6세대를 실험에 이용하였다. 세포의 형태를 기본적으로 screening하기 위하여 대조군과 실험군에 대하여 tissue chamber slide (Nunc, Naperville, IL, USA)에 세포를 키운

**Table 1.** The composition of 3 metallic materials.

Material	Composition	Company
R (Stainless steel Crown)	Fe, Cr, Ni, Mn, C, Si, P, S	3M Dental Products (U.S.A)
B (Orthodontic Band)	Fe, Cr, Ni, Si, Mn, C, P, S	Tomy Co. (Japan)
W (Orthodontic Wire)	Fe, Cr, Ni, Mn, Si, C	Dentaurum (Germany)

**Table 2.** Classification of cytotoxicity degrees and scores according to relative growth rate

Classification	Score	Relative growth rate* (%)
None	0	> 100
Weak	1	75 - 99
Moderate	2	50 - 74
Marked	3	25 - 49
Strong	4	1 - 24
Extreme	5	0

\* RER = (Mean number of living cell in sample / Mean number of living cell in control) x 100

후 핵 염색이 우수한 Papanicolaou 염색을 하였다.

2) 세포수 산정 및 trypan blue 초생체 염색

시간 경과에 따른 금속시편의 세포증식에 대한 영향을 알아보기 위하여 각 실험군에 대하여 세포 수를 산정하였다. 우선 tissue flask에 배양된 세포에 0.5% trypsin을 처리하여 부유시킨 후 혈구계산판(hemocytometer)을 이용하여 ml 당 세포수를 계산하여 장경 6 cm의 둥근 tissue flask에  $2 \times 10^4$  개의 세포를 분주하였다. 1~2일 경과한 후 금속 시편을 넣고, 1일, 4일, 7일 그리고 11일째에 각각 trypsin을 처리한 후 세포를 부유시켜 혈구계산판에서 세포수를 산정하였다. 실험은 5회 반복하였으며, 그 산술평균치와 표준편차를 구하였다. 대조군과 실험군 간의 통계학적 유의성은 Student t-test를 이용하였다.

생존세포율(cell viability)을 측정하기 위하여 cell aliquot와 동량의 0.4% trypan blue dye (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 실온에서 첨가하여 반응시킨 후 trypan blue에 염색되지 않은 세포들을 혈구계산판으로 계산하였다. Trypan blue 초생체 염색을 이용한 세포독성 평가는 대조군에 대한 실험군의 상대증식을 (relative growth rate)을 계산하여 Nakamura 등<sup>18)</sup>이 제시한 지수 (Table 2)에 근거하여 평가하였다.

3) 세포사에 대한 검색

Tissue chamber slide에 monolayer로 부착되어 있는 대조군과 실험군에서 배양액을 제거하고 acridine orange (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 100µg/ml 과 ethidium bromide (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 100µg/ml 의 혼합액을 처리한 후, 즉시 형광현미경 하에서 관찰하였다<sup>19)</sup>. Acridine orange는 DNA와 intercalate하여 핵에서 밝은 녹색을 띠게 되고 RNA와 반응은 하나 intercalate하지 않아서 황적색을 나타내게 된다. Ethidium bromide는 오직 nonviable cell에만 반응을 나타낸다. 즉 organized structure를 가진 bright green chromatin의 핵은 생존세포를 나타내고, bright green chromatin이지만 condensed 혹은 fragmented structure를 보이면 early apoptotic nuclelel를 나타

낸다. Bright orange chromatin이면서 condensed 혹은 fragmented structure를 보이면 late apoptotic nuclei이고, bright orange chromatin이면서 organized structure를 보이면 necrotic cell nuclei이다.

4) 증식세포핵 항원(PCNA)에 대한 면역세포화학적 검사

Tissue chamber slide에  $1 \times 10^5$ 개의 세포를 심은 1일 내지 2일 후에 금속 시편을 넣었다. 금속 시편 첨가 후 1일, 4일, 7일 그리고 11일째에 다음의 실험을 수행하였다. Tissue chamber slide 내의 배양액을 제거한 후 phosphate buffered saline (PBS)로 3회 세척하고 70% alcohol 용액에 30분간 고정하였다. PBS로 세척 후 3% 과산화 수소수를 실온에서 10분간 처리한 후 제거하고 다시 PBS로 세척하였다. PBS에 1:200으로 희석한 PCNA 항체 (NeoMarkers, Fremont, CA, USA)를 실온에서 2시간 처리하였다. PBS 세척 후 biotin이 부착된 2차 항체 (Zymed Laboratories Inco., South SF, CA, USA)를 10분간 처리하고 세척 한 후 strepavidin-peroxidase 용액 (Zymed Laboratories Inco., South SF, CA, USA)을 처리하였다. PBS 세척후 3-amino-9 ethylcarbazole (Zymed Laboratories Inco., South SF, CA, USA)을 발색 반응이 나타날 때까지 5~10분간 처리하고 hematoxylin으로 대조염색을 한 후 universal mount (Zymed Laboratories Inco., South SF, CA, USA)로 봉입하였다.

PCNA는 핵에서 염색반응이 인지된다. 각 대조군과 실험군에 대하여 PCNA가 양성으로 나타나는 세포를 헤아려서 PCNA labeling index를 구하였다.

$$PCNA \text{ labeling index} = PCNA(+) \text{ 세포수} / \text{총 세포수} \times 100$$

5) 신호전달 MAP kinases에 대한 western blot assay

① 단백질 추출

각 대조군과 실험군의 배양세포를 수거하여 1,000×g에서 5분간 원심분리하여 pellet을 얻은 후 동량의 RIPA 완충액 (Tris-HCl pH 7.4, NaCl 100mM, NP-40 1%, sodium deoxycholate 0.5%, MgCl<sub>2</sub> 5mM, pepstatin 0.1mM, antipain 0.1mM, chymostatin 0.1 M, leupeptin 0.2mM, aprotinin 0.1mM, soybean trypsin inhibitor 0.5mg/ml)을 첨가하였다. 충분히 섞어서 4℃에 15분간 두었다가 1ml syringe로 10~20회 stroke하였다. 4℃, 15,000rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 얻은 후 단백질정량하고 분주하여 -80℃에 보관하였다.

② SDS polyacrylamide gel electrophoresis<sup>20)</sup>

추출한 단백질 20µg을 SDS-sample buffer (Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, SDS 4%, sucrose 10%, 2-mercaptoethanol 5%)에 녹여서 10분 동안 끓인 후 12% SDS-polyacrylamide slab gel을 사용하여 분획하였다. Coomassie blue 염색을 하여 단백질 시료의 동량 loading을 check하였다.

③ Western blot assay

Gel은 nitrocellulose membrane에 60V에서 2시간 동안 전기적 전이를 하였다. 단백질이된 nitrocellulose membrane은 다시 Ponceau S염색으로 동량 전이됨을 확인하였다. Membrane을 실온에서 1시간 동안 10% 탈지 분유를 포함하고 있는 TBS 완충액에 담그었다. 그 후 적절하게 희석된 ERK1, ERK2, p38 (Calbiochem, San Diego, CA, USA) 및 JNK (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 대한 일차항체를 1시간 동안 처치하였다. TBS-0.1% Tween 20 용액 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)으로 3회 세척 후 alkaline phosphatase가 부착된 2차 항체를 30분간 처치하였다. 다시 TBS-0.1% Tween 20 용액으로 3회 세척한 후 niro-blue tetrazolium/S-bromo-4-chloro-3-indoyl-1-phosphate (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)로 발색반응을 관찰하였다.

Ⅲ. 연구성적

1. 배양세포의 성장 및 증식

① 세포수 산정

대조군에서 HGF-1의 시간 경과에 따른 세포수는 증가되었는데, 7일째까지는 급속도로 증가되다가 11일째에는 완만한 증가양상을 보였다 (Table 3). 실험군에서도 대조군과 유사한 세포수의 증가를 보였으나 양 군 사이에 유의한 차이는 나타나지 않았다 (p>0.05).

② 생존 세포수의 상대증식율

Papanicolaou 염색상 monolayer의 HGF-1는 방추형세포

**Table 3.** Mean crude cell count\* of human HGF-1 cells according to time sequence

Sample \ Day	1 day	4 day	7 day	11 day
Control	7.42±0.61	47.18±5.14	122.76±5.13	222.66±5.5
R	7.54±0.53	49.20±6.90	124.86±2.33	223.10±4.74
B	7.04±1.04	47.68±5.04	124.10±3.09	222.42±3.73
W	7.36±0.75	47.66±4.86	123.88±4.99	223.76±4.42

\* x 10<sup>4</sup> cell/ml

**Table 4.** Relative growth rate(%) and scores of cytotoxicity\* according to time sequence

Sample \ Day	1 day	4 day	7 day	11 day
R	>100(0)*	100(0)*	>100(0)*	100(0)*
B	>100(0)*	>100(0)*	98(1)*	100(0)*
W	100(0)*	96(1)*	97(1)*	98(1)*

로 돌기상 세포질과 중앙에 위치한 핵을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1). Trypan blue 염색 (Fig. 2)에서 핵이 청색으로 염색되는 죽은 세포 (Fig. 2b)이며, 생존 세포수를 계산하여 각 대조군에 대한 실험군의 relative growth rate (RER)와 그에 상응하는 cytotoxicity score를 구하였다 (Table 4). 급속시료의 종류와 시간경과에 따른 대조군과의 비교에서 stainless steel crown (R)은 대조군과 유사하였고, 교정용 band (B)는 7일째에 RER이 98%이었으며, 교정용 wire (W)는 4일, 7일 그리고 11일째에 RER이 각각 96%, 97% 및 98%이었다. 교정용 wire에서 다소 생존율이 감소되는 경향을 나타내었으나, 유의성은 없었다 (p>0.05).

2) 세포사에 대한 검색

Acridine orange/ ethidium bromide 염색으로 대조군과 실험군에서 대부분 viable cell의 형태인 bright green nuclei와 red cytoplasm이 나타났으며 (Fig. 3a, 3b), 시간이 경과함에 따라 B군과 W군에서 드물게 초기 세포괴사 형태인 organized structure를 가진 red nuclei의 세포들이 관찰되었다 (Fig. 3c).

3) 증식세포핵항원 (PCNA)의 발현

증식세포 핵항원의 발현은 대조군과 R군은 시간 경과에 따라 유사한 양상을 나타내었고 (Table 5, Fig. 4a 및 4b), B군은 전 시일에 걸쳐서 대조군보다 약간 높은 경향을 나타내었다 (Table 5 및 Fig. 4c). W군은 대부분 대조군에 비하여 약간 낮은 경향을 나타내었다. 그러나 이들간에 통계학적 유의성은 없었다 (p>0.05). 모든 군에서 PCNA의 발현이 4일째에 최고조를 나타내었고 7일째에 감소되다가 11일째에는 현저한 감소와 더불어 약한 염색강도를 나타내었다 (Table 5 및 Fig. 4d).

4) 신호전달 MAP kinases의 발현

① ERK1 및 ERK2의 발현

대조군과 실험군 간의 ERK1 및 ERK2의 발현경향은 유사하였으며, 시간이 경과함에 따라 ERK1 및 ERK2의 발현이 현저하게 감소되었다 (Fig. 5).

② JNK의 발현

대조군과 실험군에서 JNK의 발현경향은 유사하였으나, 4일

**Table 5.** PCNA labeling indexes according to time sequence

Sample \ Day	1 day	4 day	7 day	11 day
Control	74	77	66	24
R	74	77	67	25
B	77	78	68	26
W	75	75	65	24

째에 감소하다가 7일째와 11일째에 최고조의 발현을 나타내었다 (Fig. 6).

③ p38의 발현

대조군과 실험군에서 p38의 발현 정도의 경향은 유사하였으나, 1일째에 비하여 4일째에는 감소하였으며, 7일째에 다시 증가하였다. 11일째에 가장 낮은 발현정도를 나타내었으나, 모두 1일째보다는 발현정도가 약하였다 (Fig. 7).

IV. 총괄 및 고찰

구강 내에 장착되는 금속재의 가장 중요한 요건은 우수한 물리적 성질을 가져야 할 뿐 아니라, 화학적으로도 안정해서 인체에 유해한 부식산물이 생성되어서는 안 된다<sup>21)</sup>. 특히, 연조직내에 매식된 상태에서 장시간이 경과되어야 하는 용도에 사용되는 금속재에서는 생체조직에 대한 세포친화성이 매우 중요한 요소로 생각되었다. 현재 이러한 치과용 비귀금속 합금들은 비교적 양호한 성질을 가지고 있으나 구강내에서 장시간 적용되는 경우 변색이나 부식이 유발되는데<sup>22-24)</sup>, 금속의 부식에 관여하는 것으로는 수분, 대기, 산염기액, 화학물질, 온도, 산소, 염소이온, sulfide, pH 등을 들 수 있으며, 구강은 이런 요인들이 다양하게 변화하고 있는 동적인 환경으로, 금속의 부식에 쉽게 노출될 수 있다고 하였다.

본 연구에 사용된 stainless steel은 미국 철강협회 (American Iron & Steel Institute)제정의 Type 302와 304가 주로 사용되어지며, 구성성분은 크롬(18~20%) 니켈(8~10%) 그리고 소량의 망간과 규석, 탄소(0.1%) 인 것으로 알려져 있다<sup>21)</sup>. 이 성분 가운데 Cr은 stainless steel 합금의 표면에 Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>의 부동태 피막을 형성하여 변색이나 부식을 방지하며 이로 인해 생체 적합성은 상당히 향상된다고 하였다<sup>25, 26)</sup>.

본 연구는 소아치과 임상에서 일반적으로 많이 사용되고 있는 3종의 금속재에 대한 세포독성을 인체 섬유모세포(HGF-1)를 대상으로 실험하였으며, 섬유모세포는 비교적 배양이 용이하고, 외부 자극에 대해 세포 분열을 하며 결체조직의 기질 합성을 하고, 조직의 흡수 속도 등을 변화시키는 성질을 갖고 있으므로, 세포 배양법에 광범위하게 이용되고 있다.

금속 재료에 있어서의 세포 독성의 발현 기전은 금속이온이 배양액 내로 용출되어 배양액내의 단백질이나 다당류에 작용하는 경우와 금속이온이 그대로 배양액 내에서 저지 요소로써 작용하는 경우가 있다. 이와 같이 용출된 금속이온은 섬유모세포의 세포막을 투과하여 세포 원형질 내로 침입함으로써 세포핵 또는 세포 내에 존재하는 여러 효소에 영향을 주어 세포 내 대사 기구에 작용함으로써 세포를 변성시키거나 위축시키고, 나아가서는 사멸에까지 이르게 하는 것으로 추측된다<sup>29)</sup>.

Craig와 Hanks<sup>30)</sup>는 합금에 의한 세포독성 반응에서 합금 조성성분의 용출은 불가피하다고 하였다. Wataha 등<sup>31)</sup>은 용출되는 합금성분의 양을 결정하여 용출과 합금의 조성, 미세구조 및

합금의 독성 관계에서 상호 연관성이 있다고 하였다.

본 연구의 결과, 실험기간 동안에는 금속재 영향하의 실험군과 대조군 사이에 섬유모세포의 증식 양상은 차이를 보이지 않아 실험군에서도 정상적인 세포분열이 진행되고 있음을 관찰할 수 있었다. 치과용 금속재는 구성성분에 따라 세포증식도에 미치는 영향이 다양하게 보고되고 있다. 순수 Ni 시편은 정상적인 세포증식에 미약한 영향을 주며 succinate dehydrogenase의 활성도를 중등도로 억제하나, 순수 Cu 시편은 현저한 세포수 감소 혹은 세포사를 초래할 뿐 아니라 succinate dehydrogenase의 활성도를 심하게 억제한다는 것이 잘 알려져 있다<sup>29)</sup>. 금의 경우, 최와 김<sup>32)</sup>은 Cu를 주성분으로 한 합금은 심한 세포독성을 나타내며 Co-Cr계와 Ni-Cr계 합금은 미약한 세포독성을 나타내고, Ti계 합금은 세포독성이 가장 미약하다고 보고하였다. 더 나아가 이 등<sup>33)</sup>은 Ti계의 구조적으로 유도한 결정화 유리는 세포독성이 거의 없다고 보고하였다. 한편, Wataha 등<sup>34)</sup>은 이러한 금속재에 대한 실험실적 생체적합성 연구는 실험에 이용된 세포주에 따라 상이한 결과가 나올 수 있다고 하였으며, mouse fibroblast 세포주인 Balb/c 3T3 세포주는 금속재에 가장 민감하며 human fibroblast 세포주인 WI-38은 덜 민감한 것으로 보고한 바 있다.

본 연구에서도 B군과 W군의 7일째 이후부터 trypan blue에 염색되는 nonviable cell들이 관찰되었는데, 이들은 acridine orange / ethidium bromide 염색에서 세포괴사의 형태적 소견을 나타내었다. 일반적으로 세포사는 그 기전과 원인 그리고 형태적 소견에 따라 괴사 (necrosis)와 고사 (apoptosis)로 구분하고 있으나, 최근에는 양자의 구분이 불분명하거나 함께 일어나는 경우도 보고되고 있다<sup>35)</sup>. 치과용 금속재에 대한 세포독성의 결과로 세포사가 초래된 경우에 대한 세포사의 유형에 대한 분석은 아직 보고가 없었다. 본 연구에서 관찰된 세포 괴사는 대조군과 R군에서는 거의 발견되지 않았으나 배양 중 죽은 세포는 떨어져 나가서 slide에 부착되지 않았을 가능성이 있으며 B군과 W군들에서 관찰된 세포들도 volume이 유지된 초기의 괴사 형태를 나타내어 확실하게 band와 wire에 의해 유도된 세포사로 보기는 어려웠다. 즉 HGF-1에 대한 연구대상 금속재들의 세포독성에 대한 가장 기본적인 증식 세포 수 산정에 있어서 대조군과 차이가 없었고, 관찰된 세포사의 형태는 생물학적 의의가 없는 것으로 판단되었다.

증식세포 핵항원 (Proliferating cell nuclear antigen, PCNA)은 세포주기의 S기에서 DNA 복제를 담당하는 DNA polymerase의 cofactor<sup>36)</sup>로서 기능이 잘 알려져 있는 세포증식에 대한 가장 보편적인 지표자(marker)중 하나이다. 증식세포 핵항원의 발현은 세포주기의 S phase에 국한되어 있지 않고 세포주기에 진입한 모든 세포들에서 PCNA의 발현을 관찰할 수 있었으나, 세포분열이 왕성할 때는 발현량이 증가된다. 증식세포 핵항원 이외에도 세포주기 진행을 시사하는 Ki-67 단백질 발현, 그리고 S phase에 복제된 DNA에 incorporation되는 <sup>3</sup>H-thymidine 및 BrdU를 통하여 세포의 증식에 대한 연구가 가

능하다. 치과용 금속재의 세포증식에 대한 분석에 있어서 상기 분자들을 이용하여 연구한 예는 거의 드물었는데, 최근 Locci 등<sup>17)</sup>이 <sup>3</sup>H-thymidine incorporation을 이용하여 세포증식에 대해 분석하였고, 그는 304 steel과 316 steel이 Ag, Pd 등을 포함하고 있는 brazing alloy보다 세포독성이 적다고 보고하였다. 본 연구에서는 대조군과 실험군 모두 1일과 4일째에 PCNA의 발현의 최고조를 보이고, 7일부터는 PCNA labeling index의 감소와 면역염색강도의 감소를 보여주었고, 11일째에는 현저히 저하되어 있었다. 이는 평균세포수의 증가양상에 상응하는 현상으로 간주되었다. 시간경과에 따른 PCNA의 발현 양상에 있어서 실험군들은 대조군과의 비교에서 유의한 차이를 나타내지 않아, 본 실험에서 이용한 금속재들에 의한 HGF-1의 이상 증식은 관찰할 수 없었다.

최근에 구조적 유사성을 가지나 기능은 각기 다른 serine-threonine protein kinases의 family인 MAP kinases가 알려졌는데, 여기에는 ERKs<sup>12,13)</sup>, JNKs<sup>14)</sup>, p38<sup>15)</sup> 그리고 ERK5/Big MAP kinase 1<sup>16)</sup>의 뚜렷한 4group들이 있다. MAP kinases에 의한 신호전달은 세포증식, 분화, 발생, 노화, 및 세포사 등의 다양한 세포 사건들을 조절한다<sup>13,37,38)</sup>. 문헌 고찰에 의하면, 치과용 금속재의 인체에 대한 생물학적 영향에 대한 연구에서 신호전달과 관련된 분자적 연구는 없었다. ERKs는 여러 가지의 세포성장 관련 자극에 의하여 활성화되어 세포 증식을 유도하며 궁극적으로는 형질전환을 일으킨다고 잘 알려져 있다<sup>13,38-40)</sup>. 본 연구에서 ERK1과 ERK2의 발현은 대조군과 실험군 모두에서 배양 1일째에 최고조를 나타내다가 4일째부터는 감소되는 경향을 나타내었다. 이는 세포수 산정과 PCNA labeling index의 변화양상과 일치하는 소견이었으며, 정상적인 인체의 치은에서 기원된 섬유모세포의 세포배양에 있어서 유지되는 초반부의 세포 증식과 후반부의 세포 증식의 감소와도 일치되는 소견을 보였다. 즉 본 연구에 사용한 금속재들은 HGF-1의 비정상적 증식 혹은 발암과정의 초기 사건과는 무관함을 시사하였다.

JNK와 p38은 stress 혹은 TGF- $\beta$ 와 같은 cytokine에 의하여 일차적으로 활성화되며 세포고사 및 세포 성장에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으나, 이러한 상반된 세포사건과 관련된 자세한 기전은 잘 알려져 있지 않다<sup>13,38)</sup>. p38은 배양시간이 경과함에 따라 감소, 증가 그리고 감소하는 불안정성을 나타내었으나, 대조군과 실험군 사이에 유의한 차이가 없어서 배양 환경에 의하여 발현의 조절이 이루어지는 양상으로 생각하였다. JNK는 특이하게 배양 후 4일째에 발현이 감소되었다가 시간 경과에 따라 더욱 증가하는 양상을 보여 stress에 대한 HGF-1의 반응으로 생각되었다. 그러나 대조군과 실험군들 모두 유사한 양상을 보여 본 연구대상인 치과용 금속재료들에 의해 유도되었다고 볼 수는 없었고, 세포수 산정, 세포사의 검정, 증식세포핵항원의 발현 및 ERK1/2의 발현의 결과를 종합해 보면, 배양일이 경과함에 따라 세포의 증식과 성장이 감소 억제되는 환경 조건이 HGF-1에 대한 stress로 작용하였을 것

으로 본다.

## V. 결 론

본 연구는 소아치과 임상에서 흔히 사용되는 stainless steel crown, 교정용 band 와 wire 세 종류의 금속재에 대하여 배양한 HGF-1를 이용하여 세포 친화성에 대한 세포적 및 분자적 접근을 시도하여 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 세포생물학적으로 가장 기본적인 배양세포의 시간경과에 따른 세포수 산정에 있어서 모든 실험군은 대조군과 7일째까지 급격한 증가를 보이고 11일째에는 완만한 증가를 보이는 양상을 동일하게 보였으며, B군과 W군의 7일과 11일째에 드물게 관찰되는 세포사의 유형은 초기 괴사였다.
2. 증식세포핵항원의 labeling index는 대조군과 실험군 모두에서 HGF-1 배양 1일째와 4일째에 증가하고 11일째에는 현저하게 감소하는 양상을 보여 배양 환경 하에서의 정상적인 세포의 성장과 증식을 시사하였다.
3. 신호전달체계를 담당하는 MAP kinases에 대한 분자적 연구에서 ERK1 및 ERK2, p38 그리고 JNK의 발현에 있어서 대조군과 실험군은 유사한 양상을 나타내었다. JNK의 발현은 배양시간이 경과함에 따라 더욱 증가하였는데, 이는 세포증식 및 성장의 감소와 배양 환경으로 인한 stress에 기인한 것으로 생각되었다.

결론적으로 본 연구의 대상이었던 stainless steel crown, 교정용 band 와 wire 의 3종의 금속재는 단기간의 배양세포를 이용한 세포친화성 검정에 있어서 세포적 및 분자적 위해 양상을 나타내지 않았다. 그러나 임상 적용에 있어서의 궁극적인 안정성에 대해서는 장기간 노출이 가능한 배양조건 확립 혹은 동물 실험을 통한 연구가 필요할 것으로 사료되었다.

## 참고문헌

1. Humphrey WP : Use of chrome steel in children's dentistry. Dent Surv 26:945, 1950.
2. Full CA, Walker JD, Pinkham JR : Stainless steel crowns for deciduous molars. J Am Dent Assoc 89:360-364, 1974.
3. Kim MI : The phase diagrams and metallic materials. J Kor Dent Mater 5:5-13, 1971.
4. Niemi L, Hensten-Pettersen A : In vitro cytotoxicity of Ag-Pd-Cu-based casting alloys. J Biomed Mater Res 19:549-61, 1985.
5. Evans EJ : Toxicity of hydroxyapatite in vitro. Biomaterials 12:574-576, 1991.
6. ANSI/ADA Document No. 41 for recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. J Am Dent Assoc 99:697, 1079.

7. Hensten-Pettersen A, Helgeland K : Evaluation of biologic effects of dental materials using four different cell culture techniques. *Scand J Dent Res* 85:291-296, 1977.
8. Hensten-Patterson A, Helgeland K : Sensitivity of different human cell lines in the biologic evaluation of dental resin based material. *Scand J Dent Res* 89:102-107, 1981.
9. Leirskar J, Helgeland K : A methodologic study of the effects of dental materials on growth and adhesion of animal cells in vitro. *Scand J Dent Res* 80:120-133, 1972.
10. Brunner KT, Mauel J, Cerottini JG, et al. : Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on Cr51-labelled allogenic target cells in vitro: Inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* 14:181-196, 1968.
11. Tyas M : A method for the in vitro toxicity testing of dental restorative materials. *J Dent Res* 56:1285-1290, 1977.
12. Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, et al. : ERKs : a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65:663-675, 1991.
13. Seger R, Krebs EG : The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 9:726-735, 1995.
14. Minden A, Karin M : Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Biochim Biophys Acta* 1333:F85-104, 1997.
15. Ichijo H : From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene* 18:6087-6093, 1999.
16. Zhou G, Bao ZQ, Dixon JE : Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 270:12665-12669, 1995.
17. Locci P, Marinucci M, Lilli C, et al. : Biocompatibility of alloys used in orthodontics evaluated by cell culture tests. *J Biomed Mater Res* 51:561-568, 2000.
18. Nakamura M, Koda H, Kawahara H : A proposition for long-term biocompatibility test of dental materials *in vitro*. *Dent Mater J* 2:113-123, 1983.
19. Schwartz LM, Osborne BA : Cell Death. *Methods Cell Biol* 46:15-18, 1995.
20. Laemmli UK : Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685, 1970.
21. Robert GC, et al. : Restorative dental materials. 5th ed., St. Louis, C.V. Mosby Co. : 361-363, 1975.
22. Stenberg T : Release of cobalt from cobalt chromium alloy constructions in the oral cavity of man. *Scand J Dent Res* 90:472-479, 1982.
23. Goldschmidt PR, Cogen RB, Taubman SB : Effects of amalgam corrosion products on human cells. *J Periodontal Res* 11:108-115, 1976.
24. Magnusson B, Bergman M, Bergman B, et al. : Nickel allergy and nickel-containing dental alloys. *Scand J Dent Res* 90:163-167, 1982.
25. David FW : Characteristics and biocompatibility of alloys for orthodontic wire: Biocompatibility of Dental Materials. CRC Press Inc. 3:81-83, 1982.
26. Guess WL, Rosenbluth SA, Schmitt B, et al. : Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers. *J Pharm sci* 54:1545-1547, 1965.
27. Kawahara H, Yamagami A, Nakamura M : Biological testing of dental materials by means of tissue culture. *Int Dent J* 18:443-467, 1968.
28. Ralph WP : Science of dental materials. 7th ed., W.B.Saunders Co., 1973.
29. 이상훈, 손동수 : 소아치과 영역에서 사용되는 유치금속관의 섬유모세포 친화성에 관한 실험적 연구. *대한소아치과학회지* 17:33-50, 1990.
30. Craig RG, Hanks CT : Cytotoxicity of experimental casting alloys evaluated by cell culture tests. *J Dent Res* 69:1539-1542, 1990.
31. Wataha JC, Craig RG, Hanks CT : The release of elements of dental casting alloys into cell-culture medium. *J Dent Res* 70:1014-1018, 1991.
32. 최영운, 김교환 : 수중 치과용 비귀금속 합금의 세포독성에 관한 연구. *대한치과기재학회지* 20:7-19, 1993.
33. 이민호, 원대희, 배태성 : CaO · MgO · 2SiO<sub>2</sub>-3CaO · P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-MgO · TiO<sub>2</sub>계 Glass-Ceramic의 세포독성 평가 (Ⅲ). *대한치과기재학회지* 23:261-269, 1996.
34. Wataha JC, Hanks CT, Sun Z : Effect of cell line on *in vitro* metal ion cytotoxicity. *Dent Mater* 10:156-161, 1994.
35. Majno G, Joris I : Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of the cell death. *Am J Pathol* 146:3-15, 1995.
36. Haracska L, Johnson RE, Unk I, et al. : Physical and Functional Interactions of Human DNA Polymerase eta with PCNA. *Mol Cell Biol* 21:7199-7206, 2001.
37. Cano E, Mahadevan LC : Parallel signal processing

- among mammalian MAPKs. Trends Biochem Sci 20:117-122, 1995.
38. Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG : Signal transduction through MAP kinase cascades. Adv Cancer Res 74:49-139, 1998.
39. Mansour SJ, Matten WT, Hermann AS, et al. : Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. Science 265:966-970, 1994.
40. Brunet A, Pages G, Pouyssegur J : Constitutively active mutants of MAP kinase kinase(MEK1) induce growth factor-relaxation and oncogenicity when expressed in fibroblasts. Oncogene 9:3379-3387, 1994.



## 사진부도 설명

- Fig. 1. Papanicolaou staining of HGF-1 (a: 1st day after wire treatment, b: 11th day of control, x200). Spindle cells with central round nuclei are seen.
- Fig. 2. Trypan blue staining of HGF-1 (a: 4th day after S.S crown treatment, b: 4th day after wire treatment, x100). The unstained cells are viable cells (a). HGF-1 show occasionally blue colored dead cells (b), but mostly unstained.
- Fig. 3. Acridine orange/ethidium bromide staining (a: 5th day of control, b: 11th day after band treatment, c: 4th day after wire treatment). (a) and (b) show bright green nuclei and orange red cytoplasm, representing viable cells. Bright orange nuclei with organized structure, representing early necrotic cell are occasionally seen (c).
- Fig. 4. PCNA immunocytochemistry (a: 1st day of control, b: 4th day after band treatment, c: 7th day after stainless steel crown treatment, d: 11th day after wire treatment, a: x100, b, c, d: x200). The nuclei of HGF-1 show red colored PCNA(+) immunoreaction. Intensity slightly decreases in c and markedly decreases in d.
- Fig. 5. Western blot of ERK1 and ERK2 (C: control, R: stainless steel crown, B: band, W: wire). There are no differences between control and experimental groups. The expressions of ERK1 and ERK2 gradually decrease after 1st day in culture.
- Fig. 6. Western blot of JNK. (C: control, R: stainless steel crown, B: band, W: wire) There are no differences between control & experimental groups. Increased expression decreases on 4th day and remarkably increased expressions are noted on 7th day and 11th day.
- Fig. 7. Western blot of p38 (C: control, R: stainless steel crown, B: band, W: wire). There are no differences between control and experimental groups. Peaked expression is noted on 1st day, and next decrease, slight re-increase and decrease are followed.

사진부도 ①

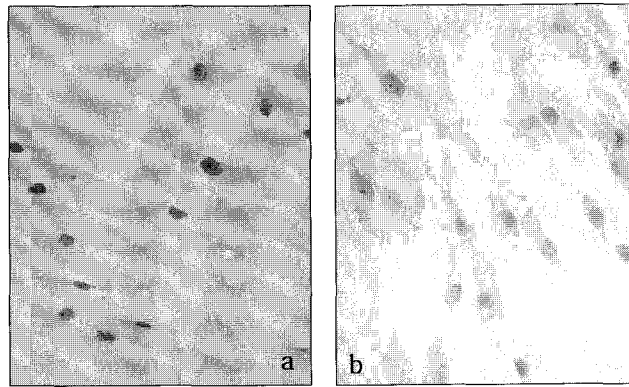


Fig. 1.

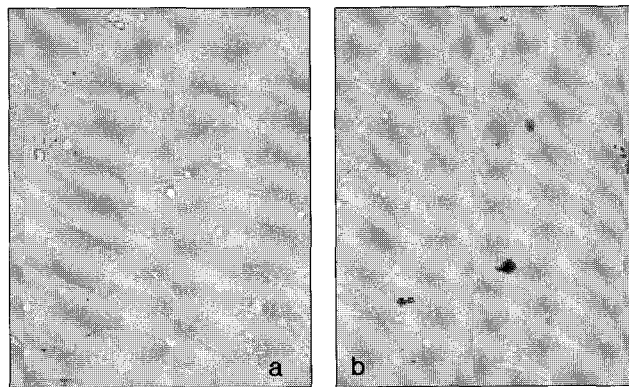


Fig. 2.

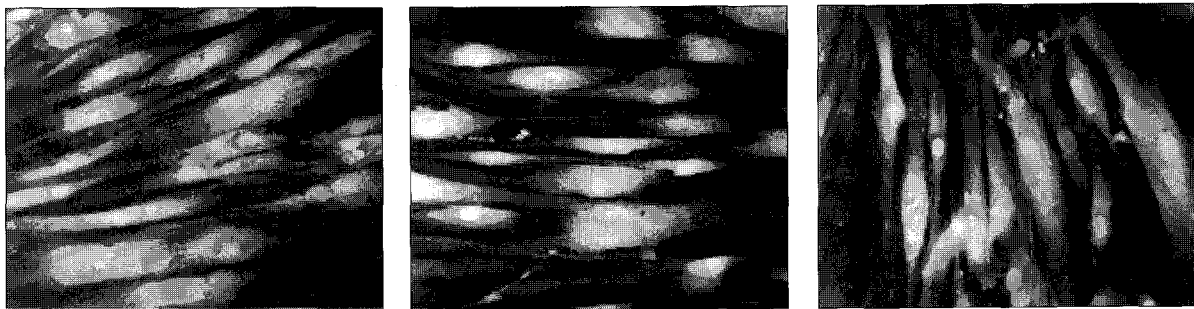


Fig. 3.

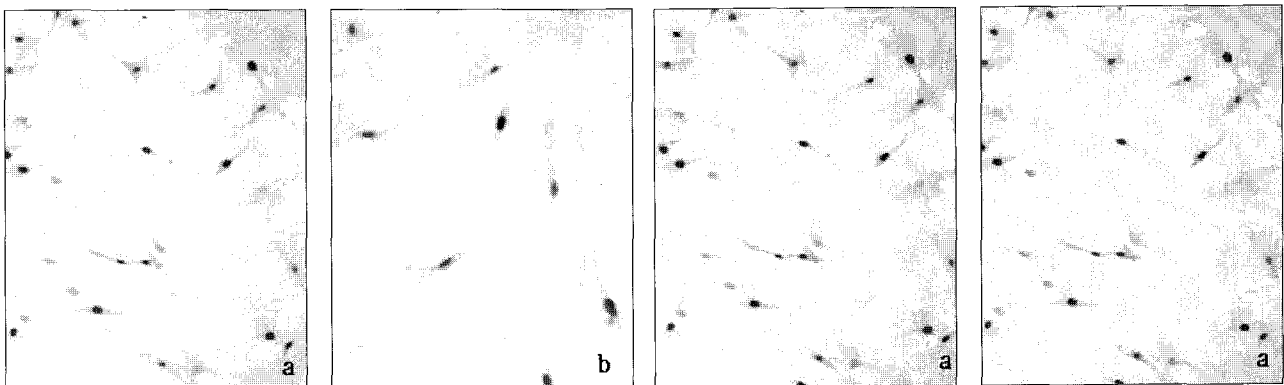


Fig. 4.

사진부도 ②

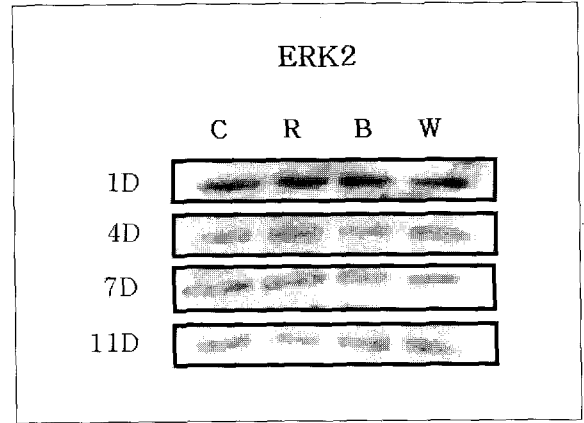
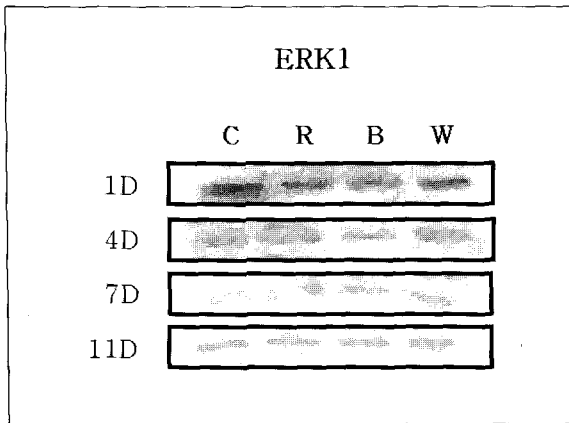


Fig. 5.

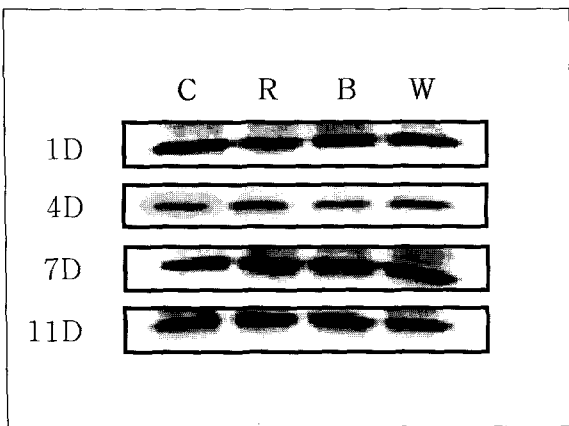


Fig. 6.

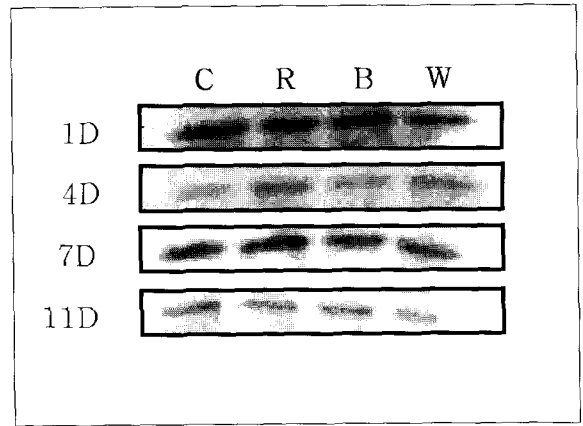


Fig. 7.

Abstract

A MOLECULAR BIOLOGIC STUDY ON BIOCOMPATIBILITY OF  
METALLIC DENTAL MATERIALS USED FOR CHILDREN WITH  
CULTURED HUMAN GINGIVAL FIBROBLASTS

Ju-Mi Kim, Tae-Sung Jeong, Shin Kim

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

For the purpose of evaluating the biocompatibility of 3 kinds of metallic materials frequently used in pediatric dentistry (stainless steel crown, orthodontic band, orthodontic wire), cellular and molecular studies, including cell growth and proliferation, screening of cell death with determination of types whether necrosis or apoptosis and changes in expressions of related signaling molecules were examined, using cultured human gingival fibroblasts (HGF-1). HGF-1 was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium, among which the 3rd to 6th generations of HGF-1 were used. The specimen were divided into stainless steel crown (R), band (B) and wire (W). The immunocytochemical study was done for the detection of anti-PCNA (proliferating cell nuclear antigen) labeling. With extracted protein, western blot was done for the detection of ERK1/2, JNK, and p38, using individual antibodies. Cultured cells proliferated, remarkably till 7 day and slightly at 11 day. There was no statistical significance in the counts of proliferating HGF-1 between control and experimental groups ( $p>0.05$ ). Relative growth rates were no statistically significant difference between control and experimental groups ( $p>0.05$ ). PCNA labeling indexes showing similar patterns in control and experimental groups. The expressions of ERK1 and ERK2, p38 were similar in control and experimental groups. The expression of JNK increased at 1st day, slightly decreased at 4th day and markedly increased at 7th and 11 day. Although the patterns of control and experimental groups were similar, the increased expressions of JNK at late period suggest a possible stress due to inhibited cell growth and proliferation, and worse culture condition. Conclusively, the 3 kinds of metal specimens used in this study did not induce cellular and molecular hazards during short term culture of HGF-1. But, for the better clinical stability, the establishment of long period culture and animal experiment was thought necessary.

**Key words** : HGF-1, Metallic dental material, Cytotoxicity, PCNA, MAP kinase