

수중 치과 교정용 밴드 시멘트의 세포독성에 관한 실험적 연구

이 원 철¹⁾ · 박 수 병²⁾

고정식 교정 치료시 교정용 밴드가 장착된 치아의 치주조직 손상은 접착된 치아에서 보다 자주 발생한다. 일반 치과 치료에 사용되는 시멘트는 세포독성을 지닌 것으로 알려져 있으므로 치주조직과 직접 접촉하거나 구강 내에서 밴드 시멘트의 성분들이 용출되는 교정용 밴드 시멘트는 치주조직의 손상을 일으키는 원인이 될 수 있다. 그러므로 교정용 밴드 시멘트의 생체 친화성은 재료의 물성과 함께 중요하게 고려되어야 할 사항이다.

이 연구의 목적은 교정용 밴드 시멘트의 세포독성을 평가하는 것으로 현재 임상에서 널리 사용되고 있는 zinc phosphate cement (ZPC), glass ionomer (GI), resin modified glass ionomer (RMGI), compomer의 생체 친화성을 평가하기 위해 human gingiva fibroblast를 배양하고 이 세포에 대한 세포수 산정 및 세포 형태관찰, MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay, 한천중층시험 등의 세포독성 검사를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 세포수 산정 및 형태관찰 시험에서 GI > ZPC, RMGI, RMGI24, GI24 > compomer24, ZPC24, compomer 순으로 세포독성이 높게 나타났다.
2. MTT assay 에서는 GI > ZPC, RMGI > GI24 > ZPC24, compomer, RMGI24, compomer24 순으로 세포독성이 높게 나타났다.
3. 한천중층시험에서는 GI > GI24, ZPC, ZPC24, RMGI > RMGI24, compomer, compomer24 순으로 세포독성이 높게 나타났다.

(주요 단어 : 세포독성, 교정용 밴드 시멘트, Compomer)

서 론

산부식을 이용한 접착기술의 개발로 교정장치

직접 접착이 가능하게 되었지만¹⁾ 구치부에는 교정 장치의 안정된 유지를 위해 아직까지 교정용 밴드를 장착하고 있다.

고정식 교정 치료시의 부작용으로 치아 탈회^{2,3)}와 치주조직 손상⁴⁻⁷⁾을 자주 경험하게 된다. 이는 밴드가 장착된 치아에서 접착된 치아보다 흔히 관찰되고 있다.⁸⁻¹⁰⁾ 밴드가 장착된 치아에서 치아 탈회가 빈발하는 것은 밴드 시멘트의 높은 용해도로 인해 밴드가 쉽게 헐거워져 치태 침착이 증가되기 때문이지만, 치주조직의 손상이 보다 빈발하는 원인은 아직 명확히

¹⁾ 부산대학교 치과대학 교정학교실, 대학원생.

²⁾ 부산대학교 치과대학 교정학교실, 부교수.

교신저자 : 박수병

부산광역시 서구 아미동 1가 10번지

부산대학교 치과대학 교정학교실 / 051-240-7447

sbypark@pusan.ac.kr

원고접수일 : 2004년 1월 12일 / 원고최종수정일 : 2004년 5월 10일

/ 원고채택일 : 2004년 5월 28일

Table 1. Materials used in this study

Species	Type	Brand name	Manufacturer
Metal ring		band material	TOMY, Japan
Compomer	Light-cured	ultra Band-Lok	Reliance Orthodontic Products, Inc, USA
GI	self-cured	Precedent	Reliance Orthodontic Products, Inc, USA
RMGI	Light-cured	OpticBand	ORMCO, USA
ZPC	self-cured	Orthodontic cement	ORMCO, USA

설명되지 않고 있다. 치과 교정용 밴드의 경우 치은연 하로 위치되는 경우가 많고 치은연부위가 치아와 긴 밀히 접합되지 않아 많은 부분이 시멘트로 채워지게 된다. 따라서 밴드가 장착된 치아의 치주조직 손상이 접착된 치아보다 빈발하는 원인으로 교정용 밴드와 교정용 밴드 시멘트의 치주조직에 대한 재료의 생체 친화성을 고려해 볼 수 있다.

밴드, bracket 및 교정용 호선 등의 금속이온 용해에 의한 세포독성에 대해서는 실험적 연구 결과 우수한 생체 친화성을 가진 것으로 다수 보고¹¹⁻¹³⁾되고 있는데 반해, 아직 교정용 밴드 시멘트의 세포 독성에 대한 연구는 드문 실정이다.

이에 본 연구에서는 교정용 밴드 장착 시 사용되는 수종의 밴드 시멘트의 치주 조직에 대한 생물학적 친화성을 평가하고자 한다.

현재 임상에서 흔히 사용되는 시멘트는 zinc phosphate cement (ZPC), glass ionomer (GI), resin modified glass ionomer (RMGI), compomer 등이 있다. 특히, RMGI와 compomer는 최근 새롭게 개발되어 임상에 적용되고 있으므로 이들의 생체 친화성에 대한 평가가 반드시 필요하다.

연구재료 및 방법

연구 재료

시판되고 있는 교정용 밴드 시멘트 (ZPC, GI, RMGI, compomer)를 적용한 세포군을 실험군으로 하고 시편 없이 배양한 세포군을 대조군으로 하였다(Table 1).

세포배양

Human Gingiva Fibroblast (HGF-1 cell)세포를 배

양하여 실험에 사용하였다. HGF-1은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco BRL) 배지에 10%의 fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL), 100 units/ml penicilin과 100 µg/ml streptomycin (Gibco BRL)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 세포는 일주일에 2~3회 refeeding 하고 세포가 90%의 합류를 이루면 Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS, Gibco BRL)로 세척한 후 0.25% trypsin-0.1% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 계대배양하여 실험에 사용하였다. 계대배양시 각각의 passage number를 기록하였고 passage number가 4-7까지의 세포를 이용하였다.

실험 방법

시편 및 시편 추출액 준비

자가 중합형 시멘트 ZPC와 GI는 지시된 powder/liquid 비율에 따라 혼합하여 경화시키고 광중합형 시멘트 RMGI와 compomer는 광조사기(3M, UNITEK)를 통해 30초씩 광조사하여 경화시켰다. 시편의 크기를 균일화하고 또 임상적인 상황과 유사하게 만들기 위해 시멘트 시편을 metal ring(band material, Tomy)에 채운 후 경화시켜 각각의 시편을 내경 10 mm, 두께 1.5 mm의 크기로 제작하였다. 각 재료별 시편은 시간 경과에 따라 시멘트의 경화도 및 용해도 차이가 예상되어 경화 즉시 시편과 경화 후 24시간 경과한 시편을 각각 준비하였다. 경화 즉시 시편을 각각 ZPC, GI, RMGI, compomer로, 경화 후 24시간 경과한 시편을 각각 ZPC24, GI24, RMGI24, compomer24로 명명하였다. MTT assay에 이용할 시편은 각각 24시간동안 3 ml의 배양액에 추출하여 (liquid-surface ratio: 66.2 ml/ml) 0.2 µm의 syringe filter로 멸균여과하여 준비하였고 한천중층시험과

Table 2. Classification of cytotoxicity degrees and scores according to RGR

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

* RGR (Relative Growth Rate)(%)= (Mean numbers of living cell in sample/Mean numbers of living cell in control)×100.

세포수 산정시험에 이용할 시편은 Kawata 등¹⁴⁾이 이용한 방법을 변형하여 소독하였다. 먼저 제조된 시편을 증류수, 70% alcohol에 차례로 초음파세척하고, 다시 Dulbecco's phosphate buffered saline 용액 및 세포배양액에 각 2회 세척 후 실험에 사용하였다. MTT에 이용할 시편추출액의 pH를 pH meter (Metrohm, Germany)로 실온에서 각 실험군별 3회 측정하였다.

세포수 산정 및 세포형태 관찰

시간 경과에 따른 세포 성장에 대한 시편의 영향을 알아보기 위하여 각 실험군에 대하여 세포수를 산정하였다. 우선, 계대배양된 세포를 0.25% trypsin으로 처리하여 부유시킨 후 혈구계산판(hemocytometer)을 이용하여 ml당 세포수를 계산하여 12 multi-transwell plate에 well당 2.5×10^4 개/ml로 분주하였다. 24시간 경과 후, 시편을 transwell에 넣고, 1일, 4일, 7일, 10일, 13일간 둔 후 각각 0.25% trypsin을 처리하여 세포를 부유시킨 후, 혈구계산판을 이용하여 성장한 세포수를 산정하였다. 세포수 산정은 각 well 당 3회 반복시행하여 평균치를 구하였고, 실험군과 대조군 간의 통계학적 유의성은 일원분산검정(one-way ANOVA)을 이용하였다.

독성판정은 대조군에 대한 실험군의 상대 세포 증식도(Relative Growth Rate, RGR)를 계산하여 평가하였는데 이는 Nakamura 등¹⁵⁾의 세포독성지수에 근거하여 실시하였다(Table 2). 또한 각 배양 기간에 따라 위상차 현미경으로 세포의 형태를 관찰하였다.

MTT assay

HGF-1 세포를 96 well plate에 well당 10^4 개/ml가 되도록 분주하여 24시간 배양 후 경화 직후, 24시간 후 시편추출액을 각각 처리한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 24시간 후 각각의 well에서 상층의 배지를 제거한 다음 MTT solution (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)을 100 μ l씩 첨가하여 37°C에서 4시간 반응시킨 후, 상층을 제거하고 Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Cat. D-5879)를 100 μ l 넣어 실온에서 생성된 formazan 결정을 녹여 ELISA reader (Molecular Devices, Emax, precision microplate reader)로 570 nm에서 흡광도(optical density)를 측정하였다.

대조군과 실험군 간의 통계학적 유의성은 일원분산검정(one-way ANOVA)을 시행하였고 Duncan's multiple range test로 각 군간의 차이를 사후 검정하였다.

한천중층시험(Agar overlay test)

1.5% bactoagar를 포함한 overlay medium을 준비하여 45°C에서 보관한 후 배양접시에서 배지를 제거하여 3 ml의 overlay medium으로 대체하였다. agar를 실온에서 15분간 방치하여 편평하게 굳힌 후 0.01%의 neutral red(Sigma, U.S.A.)용액 1 ml를 넣고 1시간 동안 두었다가 과량의 용액을 제거하였다. 그 위에 시편을 올려놓고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 이 후 접시 바닥에 각 시편의 윤곽을 유성펜으로 표시한 후 시편을 제거하고 시편과 대조군 주위의 상태를 관찰하였다. 탈색지수

Table 3. Zone index criteria

Index	Description of zone
0	No detectable zone around or under sample
1	Zone limited to area under sample
2	Zone not greater than 0.5 cm in extension from sample
3	Zone not greater than 1 cm in extension from sample
4	Zone greater than 1 cm in extension from sample, but not involving entire plate
5	Zone involving entire plate

Table 4. Lysis index criteria

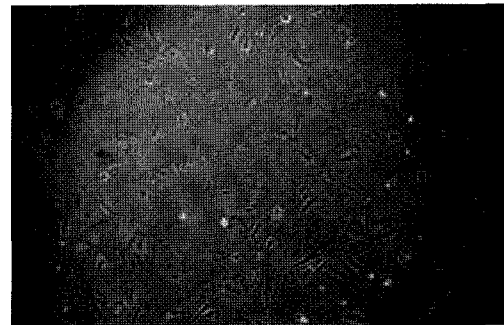
Index	Description of index
0	No observable lysis
1	Up to 20% of zone lysed
2	20-40% of zone lysed
3	40-60% of zone lysed
4	60-80% of zone lysed
5	over 80% lysed within zone

Table 5. Response index and cytotoxicity

Cytotoxicity	Response index
None	0/0
Mild	1/1-1/5, 2/1
Moderate	2/2-2/5, 3/1-3/5, 4/1-4/3
Severe	4/4, 4/5, 5/1-5/5



(A) Control group



(B) GI group

Fig 1. The morphology of HGF cell.

(A) Control group and each experimental group except GI group showed normal cellular morphology.
 (B) GI group showed severe morphological changes such as atrophy and necrosis.

(zone index)는 육안과 자로 시편주위의 배지에서 염색이 사라진 탈색부위를 측정하였고 용해지수(lysis index)는 탈색된 세포의 용해정도를 위상차 현미경으로 관찰하여 측정하였으며 그 결과에 따라 반응지수(response index)를 반응지수 = 탈색지수/용해지수 식으로 구하였다(Table 3, 4, 5).

연구결과

세포 형태 관찰

시편을 처리한 실험군과 대조군에 있어서 1, 4, 7, 10, 13일 배양기간에 따른 세포의 형태변화를 관찰하였다(Fig 1). GI 처리군을 제외한 전 실험군에서 대조

Table 6. Viable cell number of HGF cells ($\times 2.5 \times 10^4 / \text{ml}$)

Group	Day	1	4	7	10	13
Control		1.57 ± 0.21	2.77 ± 0.40	4.10 ± 0.52	5.23 ± 0.12	6.6 ± 0.32
Metal ring		1.33 ± 0.25	2.63 ± 0.15	3.83 ± 0.21	4.50 ± 0.35*	6.00 ± 0.36*
Compomer		1.27 ± 0.40	2.63 ± 0.15	3.13 ± 0.23*	3.47 ± 0.32*	5.53 ± 0.21*
Compomer24		1.20 ± 0.00	2.30 ± 0.17*	3.27 ± 0.12*	3.77 ± 0.42*	5.60 ± 0.36*
GI		0.67 ± 0.21*	1.43 ± 0.21*	1.23 ± 0.21*	1.93 ± 0.15*	2.67 ± 0.25*
GI24		1.13 ± 0.15*	2.27 ± 0.06*	3.10 ± 0.30*	3.50 ± 0.26*	5.97 ± 0.06*
RMGI		1.27 ± 0.06	2.23 ± 0.15*	2.60 ± 0.30*	3.07 ± 0.31*	4.33 ± 0.40*
RMGI24		1.30 ± 0.10	2.53 ± 0.25	2.87 ± 0.23*	3.53 ± 0.06*	4.57 ± 0.32*
ZPC		1.10 ± 0.20*	2.30 ± 0.17*	2.30 ± 0.17*	3.80 ± 0.44*	4.23 ± 0.38*
ZPC24		1.37 ± 0.31	2.50 ± 0.10	2.73 ± 0.15*	4.07 ± 0.25*	5.30 ± 0.44*

*p<0.05

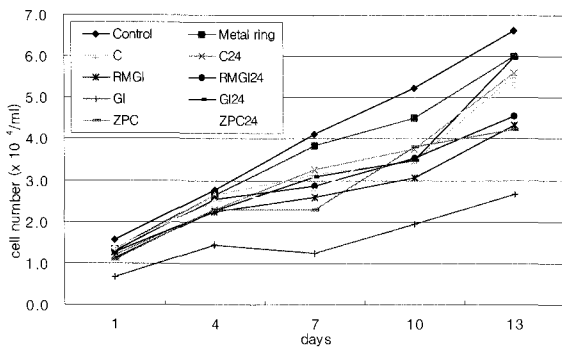


Fig 2. Growth curve of HGF cells.

군과 비교시 세포분화 및 밀도에 따른 차이는 보였으나 세포자체의 형태학적 차이는 없었다. GI 처리군의 경우는 처리 1일째부터 시편주위의 세포 돌기가 위축되고 피사가 일어났으며 시간이 지나면서 극히 일부의 세포만이 정상적인 형태로 성장하였다. ZPC 처리군의 경우 처리 1일째는 일부세포의 위축이 관찰되었으나 시간이 지남에 따라 대조군과 큰 차이가 없었다.

세포수 산정

각각의 실험군과 대조군에서 시간경과에 따른 세

포수를 산정하였다(Table 6, Fig 2).

metal ring의 경우 초기에 대조군과 유사한 형태로 성장하여 큰 차이점을 관찰할 수 없었다. compomer, compomer24의 경우 초기에 대조군과 유사한 형태로 성장하였으나 10일째 세포수의 감소가 나타났다. RMGI, RMGI24에서는 초기 세포수는 대조군과 큰 차이가 없었고 7일째부터 세포의 증식속도가 다른 실험군들에 비하여 느린 경향을 나타내었다. ZPC, ZPC24는 7일째 세포수가 감소하는 경향을 보였으나 배양기간이 지날수록 회복되어 정상적으로 증식하였다. GI에서는 초기에 세포들이 죽어 배양 13일째까지 증식속도가 아주 느렸고, GI24의 경우는 이보다는 빠른 증식도를 보였다. 세포 수에 있어 GI, ZPC는 1일째부터, compomer24, GI24, RMGI는 4일째부터 compomer, RMGI24, ZPC24는 7일째부터, metal ring은 10일째부터 대조군과 유의성 있는 차이를 보였다.

대조군에 대한 실험군의 상대 세포 증식도(Relative Growth Rate, RGR) 및 세포독성지수를 산출하였다(Table 7).

Metal ring은 미약한 세포독성을 compomer, ZPC24, compomer24는 모두 미약한 정도에서 중등도 세포독성을 나타내었고 GI24, RMGI, RMGI24, ZPC는 중등도의 세포독성을 GI는 세포독성 지수 3을 보여 강한 세포독성을 나타내었다.

Table 7. Relative Growth Rate (RGR %) and cytotoxicity

Group	day	1	4	7	10	13
Control		100	100	100	100	100
Metal ring		85.1(1)	95.2(1)	93.5(1)	86.0(1)	90.5(1)
Compomer		80.8(1)	95.2(1)	76.4(1)	66.2(2)	83.4(1)
Compomer24		76.6(1)	83.1(1)	79.7(1)	72.0(2)	84.4(1)
RMGI		80.8(1)	80.7(1)	63.4(2)	58.6(2)	65.3(2)
RMGI24		83.0(1)	91.6(1)	69.9(2)	67.5(2)	68.8(2)
GI		42.5(3)	51.8(2)	30.1(3)	36.9(3)	40.2(3)
GI24		72.3(2)	81.9(1)	75.6(1)	66.9(2)	90.0(1)
ZPC		70.3(2)	83.1(1)	56.1(2)	72.6(2)	63.8(2)
ZPC24		87.2(1)	90.4(1)	66.7(2)	77.7(1)	79.9(1)

(): mean score of cytotoxicity

Table 8. pH of the extract

Group	pH
Control	8.22 ± 0.02
Metal ring	8.25 ± 0.01
Compomer	8.23 ± 0.04
Compomer24	8.21 ± 0.02
RMGI	8.23 ± 0.01
RMGI24	8.24 ± 0.01
GI	6.26 ± 0.05*
GI24	7.39 ± 0.02*
ZPC	6.40 ± 0.03*
ZPC24	8.00 ± 0.04*

*p<0.05

MTT assay

시편 추출물의 pH 측정

시편 경화 직후 와 24시간 경화 후 시편을 3 ml의 배양액에 24시간동안 침적하여 얻은 추출물로 pH를 측정하였다(Table 8). 침적 초기에 GI 시편에서 불투명하고 노란 추출물이 용출되어 나왔고 ZPC시편

에서도 GI보다는 약하나 추출물이 용출되어 나와 배양액의 변색 이 관찰되었다. pH 측정 결과 추출물이 육안으로 관찰되는 GI, ZPC의 경우는 각각 6.26, 6.40로 낮았고 나머지 시편에서는 배양액의 변색도 없었고 pH도 대조군과 유사하여 pH 8.0정도를 나타내었다.

MTT assay

ZPC, GI, RMGI, compomer 시편을 각각 경화 직후 와 24시간 후에 3 ml의 배양액에 24 시간동안 침적하여 얻은 추출물을 세포에 적용하고 MTT 법을 이용하여 대조군에 대한 백분율로 얻은 상대 흡광도를 측정하였다(Table 9, Fig 3).

Duncan's multiple range test를 시행한 결과 metal ring, compomer, compomer24, RMGI 24, ZPC24는 대조군과 유의한 차이 없이 높은 흡광도를 나타내었고 GI, GI24, ZPC, RMGI는 대조군과 유의한 차이를 보여 세포독성을 나타내었다. GI24의 경우 대조군과 유의성 있는 차이를 보였으나 metal ring, compomer, compomer24, RMGI24, ZPC24와는 유의한 차이를 보이지 않았다. ZPC, RMGI는 모든 군과 유의한 차이를 보였으나 GI에서 보다는 높은 흡광도를 나타내었다. GI는 가장 낮은 흡광도를 보였고 모든 군과 유의한 차이를 보여 가장 높은 세포독성을 나타내었다.

Table 9. Relative absorbance of HGF with MTT assay

Group	OD ₅₇₀	Relative absorbance(%) ^{a)}	Duncan Grouping
Control	0.386±0.05	100	A
Metal ring	0.363±0.03	94.2	A B
Compomer	0.350±0.03	90.7	A B
Compomer24	0.370±0.02	95.9	A B
RMGI	0.278±0.03*	72.0	C
RMGI24	0.367±0.03	95.2	A B
GI	0.207±0.02*	53.7	D
GI24	0.336±0.03*	87.0	B
ZPC	0.251±0.03*	65.1	C
ZPC24	0.347±0.03	89.9	A B

a) Relative absorbance (%) = $\frac{OD_{570} \text{ of control} - OD_{570} \text{ of sample}}{OD_{570} \text{ of control}} \times 100$

*p<0.05

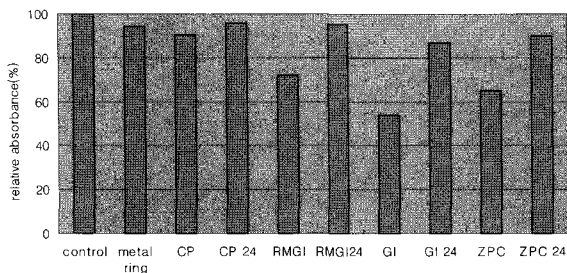


Fig 3. Relative absorbance (%) of HGF exposed to extract solution of the experimental materials with MTT assay.

한천중층시험(Agar overlay test)

Agar ovelay medium에 각각의 올려 놓고 24시간 배양 후 탈색 및 용해정도를 측정하였다(Table 10). 탈색정도는 육안으로 관찰하였는데 GI에서 탈색정도가 탈색지수 3으로 가장 넓게 나타났고, GI24에서 탈색지수 2로 시편 보다 넓은 탈색을 보였으며 ZPC, ZPC24, RMGI에서는 탈색지수 1로 시편 직하부에 탈색을 보여 그 범위가 좁았고, 나머지 군에서는 탈색이 되지 않았다.

Table 10. Various indices of agar overlay test

Group	Zone index	Lysis index	Response index
Control	0	0	0/0
Metal ring	0	0	0/0
Compomer	0	0	0/0
Compomer24	0	0	0/0
RMGI	1	1	1/1
RMGI24	0	0	0/0
GI	3	1	3/1
GI24	2	1	2/1
ZPC	1	1	1/1
ZPC24	1	1	1/1

위상차 현미경을 이용한 세포용해지수는 군마다 큰 변화가 없이 모든 시편에서 세포의 형태는 거의 동일했고 GI, GI24, ZPC, ZPC24, RMGI에서만 일부 원형의 용해세포가 관찰되었다.

이상의 탈색지수와 용해지수의 결과에 따라 반응 지수를 구하였고 이에 따른 세포독성도를 평가한 결

과 GI는 중등도의 세포독성을 GI24, ZPC, ZPC24, RMGI는 미약한 세포독성을 나타냈고 metal ring, compomer, compomer24, RMGI24는 세포독성을 나타내지 않았다.

총괄 및 고안

치과 재료에 있어서 생체친화성(biocompatibility)은 물성 못지 않게 중요한 사항이다. 이 중 시멘트는 가장 광범위하게 임상에서 사용되고 있어 이에 대한 생체 친화성 연구가 많이 행해졌다. 일반적으로 시멘트는 막 경화된 상태에서 대부분 세포독성 반응을 일으키지만, 시간이 경과함에 따라서 또 타액의 완충작용에 의해서 그 독성은 감소한다.¹⁶⁾

고정식 교정 치료시 밴드가 치은연하에 위치하는 경우가 많고 밴드와 치아 사이의 접합도가 낮아 시멘트로 빈 공간을 채우게 된다. 따라서 시멘트는 치은연하 치주조직과 접촉하게 되어 치주조직의 손상이 발생할 가능성이 높다. 이에 치과 교정용 밴드 시멘트의 생체 친화성 검사가 요구된다.

치과재료의 독성이나 과민반응을 평가하는 방법은 제1단계 초기검사, 제2단계 동물실험 및 제3단계 임상 전단계 검사로 구성되어 있다.¹⁷⁾ 이 중 세포독성 시험은 초기검사에 속하는 것으로 실험방법이 비교적 간단하고 재현성이 높으며, 정확한 결과를 얻을 수 있고, 또한 표준화에 의해 다량의 시편을 평가할 수 있는 경제적인 실험방법이다.^{18,19)} 이러한 세포독성 실험은 세포수를 산정하여 세포의 성장을 측정하는 방법, 세포의 형태변화를 관찰하는 방법,²⁰⁾ 방사선동위원소를 이용하는 방법^{21,22)} 발색반응을 이용하여 흡광도를 측정하여 생존도를 측정하는 방법,²³⁾ 효소기능 측정법^{24,25)} 세포내 대사량 측정법²⁶⁾ 등 여러 가지가 있다.

독성 실험의 결과에는 여러 인자가 영향을 미치며 세포의 유형, 재료의 물리적 성상, 세포와 재료가 접촉하는 방법 및 세포손상을 측정하는 방법에 따라서도 다르게 나타나고²⁷⁾ 재료를 추출하는 방법, 시편의 표면적과 추출배지의 부피비, 세포-재료 접촉유형 등에 따라서도 오류를 유발할 수 있어서²⁸⁾ 여러 연구자들의 연구 결과를 상호 비교하기는 어렵다. 또한 같은 재료를 대상으로 평가한 경우도 실험방법에 따라 상이한 결과를 보이는 경우도 있으므로 두 가지 이상의 방법을 사용하는 것이 보다 정확한 결과를 얻을 수 있다.

치과재료는 대부분 불용성이며 두가지 성분으로 공급되어 이 재료들을 혼합하여 사용하거나 광중합을 통해 사용한다. 본 연구에서는 현재 임상에서 사용되는 치과 교정용 밴드 시멘트인 ZPC, GI, RMGI, compomer를 각각 시험하였으며 이들은 자가 중합 및 광중합을 통해 경화하는 재료로 조직과는 고형체로 직접 접촉하거나 타액에 의해 그 성분이 추출되어 간접적으로 접촉하게 된다. 이에 본 연구에서는 재료와의 직접 접촉에 의해 영향을 미치는 세포수 산정법, 배지에 침적하여 그 추출물을 이용하는 MTT assay, 고형체로부터 확산 가능한 물질이 한천배지를 통하여 세포와 접촉하는 한천중층시험을 이용하여 세포독성의 차이를 평가하였다.

세포수 산정 시험²⁹⁾은 가장 간단한 방법으로 세포 배양 용기 중앙에 시험하고자하는 시료를 놓고 시간 경과에 따라 세포의 성장을 관찰하는 것으로 만약 시료가 독성이 없다면 성장이 계속 일어날 것이고 독성이 있다면 세포의 성장이 억제되고 병적인 양상을 보이며 용기에서 탈락하게 된다.

MTT assay²⁹⁾는 효소활성 시험 중 하나로 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)를 이용한다. 생존 세포의 미토콘드리아의 탈수소효소(dehydrogenase)가 노란색의 MTT를 붉은색의 푸른색의 MTT-formazan 결정으로 전환시키는 능력을 측정하며 이 때 생성된 formazan 결정의 광학적 밀도를 측정함으로써 세포 독성을 평가할 수 있다. 만약 세포독성에 의하여 탈수소효소의 활성이 저하되면 formazan이 형성되지 않는다.

한천중층시험(Agar overlay test)²⁹⁾은 막투과도의 변화에 근거한 방법으로서 재료로부터 직접 유리되는 성분의 급성 세포독성도를 발견하기 위한 방법이다. 한층의 배양세포 위에 용융온도가 낮은 agar와 neutral red와 같은 생체염료를 혼합하여 덮는다. 이 위에 시험대상 재료를 올려놓으면 agar는 재료와 세포 사이에 분리막 역할을 하게 된다. 만약 독성이 있을 경우 세포막이 파괴되어 neutral red가 유출되어 탈색이 일어난다.

본 연구에서 세포수 산정 및 세포 형태관찰, MTT assay, 한천중층시험을 통해 임상에서 흔히 사용되는 시멘트인 zinc phosphate cement (ZPC), glass ionomer (GI), resin modified glass ionomer (RMGI), compomer의 생체친화성을 평가한 결과 실험 방법에 따라 세포독성을 표현하는 방식은 다르나 GI의 독성이 가장 강하며, ZPC, RMGI, compomer 순으로 독성

이 약해짐을 알 수 있었다. 또한 시멘트를 24시간 동안 경화시킨 후에는 대부분의 시편에서 세포독성이 현저히 감소하여 대조군과 metal ring만을 처리한 군과 비슷하였다.

Zinc phosphate cement는 산화아연 분말과 인산수용액을 혼합하여 사용하고 분말과 액의 비율에 따라 그 성질이 좌우된다. 이전의 여러 생체친화성 실험에서 실험방법, 상품의 종류, 시편처리 방식의 차이로 인해 일치된 결과를 보이지는 않지만 약한 정도에서 중등도의 세포독성을 보였다.³⁰⁻³²⁾ 이의 원인으로는 초기 높은 용해도로 인한 zinc ions 및 다른 화합물의 유출과 인산수용액으로 인한 혼합 직후 낮은 pH로 생각된다.³³⁾ 시간이 지나 경화가 진행됨에 따라 용해도 감소와 pH의 증가로 세포독성은 감소하는 것으로 알려져 있으며³⁴⁾ 본 연구 결과 24시간 지난 군의 pH가 증가하고 세포독성은 감소하는 것으로 나타나 이전의 연구와 일치하였다.

Glass ionomer는 calcium aluminum fluorosilicate glass 분말과 polyacrylic acid, itaconic acid 수용액인 액을 혼합하여 사용하며, 산-염기 반응에 의해 경화된다. 불소를 방출하여 치아 탈회 예방에 효과적이다. GI는 경화 초기 물에 대한 용해도가 높으며 calcium, aluminum, fluoride가 유출된다.³⁵⁾ 초기 ion의 유출과 낮은 pH로 인해 강한 초기 세포독성이 나타나며 시간 경과에 따라 경화가 진행되면 세포독성의 감소가 나타난다. Smith는 GI는 경화 후 10분이 지나도 pH가 3정도 밖에 이르지 못한다고 보고하고 있다.³⁶⁾ 본 연구에서 GI 추출물의 pH가 가장 낮게 나타나 GI의 세포독성이 높게 나타나는 이유 중 pH의 영향이 큰 것으로 생각된다.

Resin-modified glass ionomer (RMGI)는 GI의 개량된 형태로 composite resin 성분의 함유로 GI의 반응 초기 용해도를 개선하였고 강도 또한 증가되었다. GI 고유의 산-염기 반응 외에 composite resin 성분으로 인해 광중합이 가능하다. 하지만 Geurtsen³⁷⁾ 등의 연구에 따르면 RMGI는 다양한 resin 성분을 함유하고 있어 HEMA, TEGDMA 등의 unpolymerized resin monomer가 유출된다. Hamid 등³⁸⁾은 연구에서 RMGI 및 compomer에서 HEMA가 유출되고 이는 치수 반응을 야기하고 환자 및 술자에게 알려지를 유발할 수도 있다고 하였다. 또한 GI에서 처럼 aluminum, fluoride, polyacrylic acid가 초기에 많이 유출된다.³⁷⁾ 본 연구에서는 경화 직후와 24시간 지난 군 간의 pH 차이가 나타나지 않고 대조군과 유의한 차이가 없어

초기에 유출되는 성분들이 RMGI의 세포독성에 주도적인 역할을 하는 것으로 생각된다.

Compomer는 composite resin에 불소 유리 glass가 함유된 또 다른 hybrid cement이다. RMGI보다 불소의 방출량은 적으나 치아 탈회 예방에 효과적이다. RMGI와 구성 성분이 유사하므로 HEMA, TEGDMA 등이 유출되어 세포독성을 보인다고 보고되고 있다.³⁷⁾ 하지만 본 연구에서는 아주 미약한 세포독성을 보였다. Compomer는 pH에서 대조군과 유의한 차이가 없고 광중합을 통해 충분히 경화되어 초기 용해도가 낮은 편이어서 RMGI 보다는 낮은 세포독성을 보이는 것으로 생각된다.

metal ring은 세포독성을 나타내지 않았으며 이전의 band의 금속 이온 유출에 의한 세포독성 연구와 일치되는 결과를 보였다.¹¹⁻¹³⁾ 시편의 크기를 균일화하고 또 임상적인 상황과 유사하게 실험을 적용하기 위해 각각의 시멘트 시편을 metal ring에 채운 후 경화시켜 사용하였다. metal ring은 유의한 세포독성을 보이지 않으므로 각각의 결과는 시멘트 자체의 세포독성이라 생각할 수 있다.

본 시험에서 사용한 ZPC, GI, RMGI, compomer는 모두 fluoride가 함유되어 있다. 최근의 여러 연구에서 fluoride에 의해 pulp cell의 성장 억제와 미토콘드리아의 활성 저하, 단백질 합성 저하가 일어남을 보고하였다. 즉 fluoride의 유출량에 비례하여 세포독성에 영향을 미치지 않는 것으로 어느 정도 세포독성을 가진 것으로 생각된다.^{39,40)} 본 실험에서도 fluoride의 함량이 비교적 높은 GI에서 유의성 있는 세포독성이 관찰되었다.

이상의 본 실험과 이전 연구결과를 평가 해 볼 때 시멘트의 pH와 시멘트에서 유출되어 나오는 성분들이 시멘트의 세포독성을 결정하는 주요인자임을 알 수 있었다. 따라서 시멘트의 독성에 가장 주도적인 역할을 하는 구체적인 성분에 대한 분석이 필요하다. 또한 생체 친화성에 대한 결과가 실험 방법마다 다양하게 나타나므로 실험 방법의 표준화가 필요하며, 더 나아가서 용해된 시멘트의 섭취로 인한 전신적인 독성을 평가하기 위해 동물실험 및 임상 전단계 검사가 시행되어야 할 것이다.

결론 및 요약

고정식 교정 치료시 밴드가 장착된 치아에서 치주 조직의 손상을 자주 경험하게 된다. 밴드 시멘트는 일

반적으로 세포독성을 가진 치과 재료로 알려져 있어 시멘트에 의한 자극이 치주 조직 손상의 한 원인으로 생각해 볼 수 있다. 이에 본 연구에서는 현재 임상에서 사용되는 치과 교정용 밴드 시멘트인 zinc phosphate cement (ZPC), glass ionomer (GI), Resin modified glass ionomer (RMGI), compomer의 생체 친화성을 알아보기 위해 세포수 산정 및 세포 형태 관찰, MTT assay, 한천중층시험 등의 세포독성 검사를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 세포수 산정 및 형태관찰 시험에서 GI > ZPC, RMGI, RMGI24, GI24 > compomer24, ZPC24, compomer > metal ring 순으로 세포독성이 높게 나타났다.
2. MTT assay 에서는 GI > ZPC, RMGI > GI24 > ZPC24, compomer, metal ring, RMGI24, compomer24 순으로 세포독성이 높게 나타났다.
3. 한천중층시험에서는 GI > GI24, ZPC, ZPC24, RMGI > RMGI24, compomer, compomer24, metal ring 순으로 세포독성이 높게 나타났다.

참 고 문 헌

1. Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. J Dent Res 1955;80:849-53.
2. Ogaard B. Prevalence of white spot lesions in 19-year olds: a study on untreated and orthodontically treated persons 5 years after treatment. Am J Orthod Dentofacial Orthop 1989;96:423-7.
3. Mizrahi E. Surface distribution of enamel opacities following orthodontic treatment. Am J Orthod 1983;84:323-31.
4. Zachrisson S, Zachrisson BU. Gingival condition associated with orthodontic treatment. Angle Orthod 1972;42:26-34.
5. Zachrisson BU, Alnaes L. Periodontal condition in orthodontically treated and untreated individuals. I. Loss of attachment, gingival pocket depth and clinical crown height. Angle Orthod 1973;43:402-11.
6. Kloen JS, Pfeiffer JS. The effect of orthodontic treatment on periodontium. Angle Orthod 1974;44:127-34.
7. Sadowsky C, BeGole EA. Long-term effect of orthodontic treatment on periodontal health. Am J Orthod 1981;80:156-72.
8. Ogaard B, Rolla G, Arends J. Orthodontic appliances and enamel demineralization. Part I. Lesion development. Am J Orthod Dentofacial Orthop 1988;94:68-73.
9. Alexander SA. Effects of orthodontic attachments on the gingival health of permanent second molars. Am J Orthod Dentofacial Orthop 1991;100:337-40.
10. Boyd RL, Baumrind S. Periodontal consideration in the use of bonds or bands on molar in adolescents and adults. Angle Orthod 1992; 62:117-26.
11. Mockers O, Deroze D, Camps J. Cytotoxicity of orthodontic bands, brackets and archwires in vivo. Dent Mater 2002;18:311-7.
12. Grimsdottir MR, Hensten-Pettersen A, Kullman A. Cytotoxic effect of orthodontic appliances. Eur J Orthod 1992;14:47-53.
13. 유동환, 국윤아, 김상철. 수중 교정용 band의 세포독성에 관한 실험적 연구. 대치교정지 1994;24:419-32.
14. Kawata Y, Shiota M, Tsutsui H, Yoshida Y, Sasaki H, Kinouchi, Y. Cytotoxicity of Pd-Co dental casting ferromagnetic alloy. J Dent Res 1981;60:1403-9.
15. Nakamura M, Koda H, Kawahara H. A proposition for long-term biocompatibility test of dental materials *in vitro*. Dent Mater J 1983;2: 113-23.
16. 고영무, 김경남, 김광만 등 치과 재료학. 서울: 군자출판사; 2001. p. 77.
17. ANSI/ADA Document No.41 for recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. JADA 1979;99:697-98.
18. Spanberg L. Kinetic and quantitative evaluation of material cytotoxicity *in vitro*. Oral Surg 1973;35:389-401.
19. Browne RM, Tyas MJ. Biological testing of dental restorative materials *in vitro* - a review. J Oral Rehabil 1979;6:365-74.
20. Kawahara H, Imanishi Y, Oshima H. Biological evaluation on glass ionomer cement. J Dent Res 1979;58:1080-6.
21. Bean TA, Zhuang WC, Tong PY, et al. Comparison of tetrazolium colorimetric and ⁵¹Cr release assays for cytotoxicity determination of dental biomaterials. Dent Mater J 1995;11:327-31.
22. Yoshii E. Cytotoxicity effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. J Biomed Mater Res 1997;37:517-24.
23. Cook JA, Mitchell JB. Viability measurements in mammalian cell systems. Anal Biochem 1989;179:1-7.
24. Tyas MJ. A method for the *in vitro* toxicity testing of dental restorative materials. J Dent Res 1977;56:1285-90.
25. Craig RG, Hanks CT. Reaction of fibroblasts to various dental casting alloys. J Oral Pathol 1988;17:341-7.
26. Helgeland K, Leirskar J. A further testing of the effect of dental materials on growth and adhesion of animal cell *in vitro*. Scand Dent Res 1972;80:206-12.
27. Hensten-Pettersen A, Helgeland K. Evaluation of biological effects of dental materials using four different cell culture techniques. Scand J Dent Res 1977;85:291-6.
28. Hensten-Pettersen A. Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. Int Endo J 1988;21:89-99.
29. 고영무, 김경남, 김광만 등 치과 재료학. 서울: 군자출판사; 2001. p. 67-70.
30. Meryon SD, Browne RM. Evaluation of the cytotoxicity of four dental materials *in vitro* assessed by cell viability and enzyme cytochemistry. J Oral Rehabil 1983;10:363-72.
31. Tyas, M.J. *In vitro* toxicity tests of zinc phosphate cement. J Oral Rehabil 1978;5:339-47.
32. Leirskar J, Helgeland K. Toxicity of some dental cements in a cell culture system. Scand J Dent Res 1977;85:471-9.
33. Schedle A, Franz A, Rausch-Fan X, et al. Cytotoxic effects of dental composites, adhesive substances, compomers and cements, Dent Mater 1998;14:429-40.
34. Hanks CT, Anderson M, Craig RG. Cytotoxicity effect of dental cements on two cell culture system. J Oral Pathol 1981;10:101-12.
35. Bapna MS, Mueller HJ. Leaching from glass ionomer cements. J Oral Rehabil 1994;21:577-83.
36. Smith DC, Ruse DN. Acidity of glass ionomer cements during setting and its relation to pulp sensitivity. JADA 1986;112:654-7.
37. Geurtsen W, Spahl W, Leyhausen G. Residual monomer/additive release and variability in cytotoxicity of light-curing glass-ionomer cements and compomer. J Dent Res 1998;77:2012-9.

38. Hamid A, Okamoto A, Iwaku M, Hume WR. Component release from light-activated glass ionomer cements. *J Oral Rehabil* 1998;25:94-9.
39. Chang YC, Chou MY. Cytotoxicity of fluoride on human pulp cell cultures in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2001;91:230-4.
40. Kan KC, Messer LB, Messer HH. Variability in cytotoxicity and fluoride release of resin-modified glass-ionomer cements. *J Dent Res* 1997;76:1502-7.

- ABSTRACT -

In vitro cytotoxicity of four kinds orthodontic band cements

Won-Chul Lee, Soo-Byung Park

Department of Orthodontics, College of Dentistry, Pusan National University

Orthodontic band cements are widely used in the fields of orthodontics, but they are commonly known as cytotoxic material. Within an oral cavity several ions and components are released from orthodontic band cements, thus causing inflammation or injury to the periodontal tissue. Therefore, it is very important to estimate the biocompatibility of orthodontic band cements.

The purpose of this study was to assess the cytotoxic effect of orthodontic band cements to HGF cells. A zinc phosphate cement, a glass ionomer, a resin modified glass ionomer, and compomer were used to evaluate three cytotoxicity assays: cell proliferation assay, MTT assay, and agar overlay assay.

The results were as follows:

1. In the cell proliferation assay, GI > ZPC, RMGI, RMGI24, GI24 > compomer24, ZPC24, compomer > metal ring lined up in order of cytotoxicity.
2. In the MTT assay, GI > ZPC, RMGI > GI24 > ZPC24, compomer, metal ring, RMGI24, compomer24 lined up in order of cytotoxicity.
3. In the agar overlay test, GI > GI24, ZPC, ZPC24, RMGI > RMGI24, compomer, compomer24, metal ring lined up in order of cytotoxicity.

Korean J Orthod 2004;34(4):351-62

※ **Key words:** Cytotoxicity, Orthodontic band cement, Compomer