

저장용액의 온도에 따른 치주인대세포의 생존율

조재현 · 김성오 · 최형준 · 이제호 · 손흥규 · 최병재

연세대학교 치과대학 소아치과학교실

국문초록

외상성 손상 후 치아 탈구 시 치아를 저장하는 저장용액의 종류와 온도가 치주인대세포의 생존율에 어떠한 영향을 미치는지 연구하기 위하여 치주인대세포를 10% fetus bovine serum(FBS) 함유 α -minimal essential medium(α -MEM)에서 37°C 5% CO₂ 공기 혼합 배양기에서 배양하고 4, 25, 37°C의 Hank's balanced salt solution(HBSS)과 α -MEM, 우유(S회사, P회사), tap water에 저장하고 60분이 지난 후 각 군에 대해 치주인대세포의 생존율을 측정하기 위하여 MTT assay를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 4°C 저장용액의 치주인대세포의 생존율은 α -MEM과 P회사우유에서 가장 높았고 HBSS, S회사우유, tap water 순으로 낮았다.
2. 25°C 저장용액의 치주인대세포의 생존율은 α -MEM에서 가장 높았고 P회사우유, HBSS, S회사우유, tap water 순으로 낮았다.
3. 37°C 저장용액의 치주인대세포의 생존율은 α -MEM과 P회사우유, HBSS, S회사우유에서 높았고 tap water에서 가장 낮았다.
4. α -MEM의 치주인대세포의 생존율은 4°C에서 가장 높았고 25°C와 37°C 순으로 낮았으며 HBSS에서는 4°C에서 높았고 25°C와 37°C에서 낮았다.
5. S회사와 P회사우유에서 치주인대세포의 생존율은 4°C와 25°C에서 높았고 37°C에서 낮았다.

이상의 결과를 종합해볼 때 외상으로 인해 치아가 탈구되었을 때 탈구된 치아의 저장용액으로 HBSS 용액이 추천되고 있으나 이 연구에서 4°C와 25°C 우유에서 치주인대세포의 생존율이 높았으므로 사고 현장에서 쉽게 구할 수 있고 치주인대세포의 생활력 보존에도 유리한 낮은 온도의 우유에 탈구된 치아를 보존하는 방법도 좋을 것으로 생각된다.

주요어 : 치주인대세포, 저장용액, 온도, HBSS

I. 서 론

어린이에서 외상성 손상은 출생 후 유아가 기어다니기 시작하면서부터 발생하여 이 후 걸음마를 시작하면서부터 그 빈도

수가 증가하게 된다. 어린이가 유치원이나 학교에 다니는 나이가 되면 대부분 노는 도중에 사고를 당하거나 어떤 물건에 부딪치거나 동료와의 싸움, 자동차 사고 등의 원인으로 안면의 타박상과 함께 치아 진탕, 아탈구, 치관 파절, 치근 파절, 치아 탈구, 전위 등이 많이 나타난다^{1,2)}. 성장기 아동의 경우 치아손상의 30% 정도가 스포츠나 레포츠에 의한 것이라는 보고가 있으며, 이 경우 마우스가드 등을 이용하여 치아외상을 예방할 수 있다³⁾. 또한 치아가 치조와에서 완전 탈구 시 즉시 재식하는 것은 적절한 치주조직의 치유를 위한 최선의 방법이며, 치아의 정상 기능을 유지하고 치근 흡수나 유착을 막을 수 있다¹⁾.

교신저자 : 최 병 재

서울시 서대문구 신촌동 134

연세대학교 치과대학 소아치과학교실

Tel: 02-2228-8800

Email: bjchoi@yumc.yonsei.ac.kr

탈구된 치아를 재식하는 경우에 성공여부는 구강외 시간과 치주인대세포의 보존, 고정, 치근의 발육정도, 적절한 시기의 근관치료에 달려있으며⁴⁻⁶⁾ 치근 흡수를 방지하고 치아재식의 성공율을 높이기 위해서 재식할 때까지 치주인대세포의 생활력 보존이 중요하다. 재식 전에 치아를 저장하는 방법으로는 건조 상태로 놓거나 타액, 수돗물, 생리적 식염수, 달걀 흰자, 우유, 세포 배양액, 이온 음료 등에 담가둘 수 있다¹⁰⁾.

재식 전 저장용액의 평가에서 중요한 것이 저장액의 삼투압과 온도, 필수 영양소, pH, 세균 독소의 유무 등이다¹¹⁻¹³⁾. 일반적으로 세균의 독성 물질들은 37°C에서 최대한의 활성을 보이므로 이보다 낮은 온도에서 치주인대세포는 높은 생존율을 가진다. 또한 우리나라와 같이 사계절이 뚜렷한 경우 각 계절마다 확연한 온도 차이를 보이고 있다. 그러므로 계절 당 온도 변화가 심하기 때문에 탈구 시 저장용액에 담귀서 운반한다고 하더라도 시간이 지남에 따라 저장용액의 온도가 상승하여 치주인대세포의 생존율에 영향을 끼칠 수 있다.

이와 같이 탈구된 치아를 담그는 저장용액의 종류나 저장용액의 온도가 치주인대세포의 생존율에 중요한 영향을 미칠 수 있고 또한 치아재식의 성공 여부를 결정하게 된다.

따라서 본 연구는 4°C와 25°C, 37°C 온도에서 α-MEM과 HBSS, tap water, P회사/S회사 우유를 저장용액으로 사용하여 치주인대세포의 생존율을 비교해 보았고 이를 평가하기 위해 MTT assay로써 살아있는 세포의 효소 활성을 측정해보았다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 연구 재료

1) 치주인대세포의 배양

α-MEM 배지를 만들기 위해서 MEM 1 l + 2.2 g NaHCO₃ + 멸균된 증류수 700 ml를 넣고 6.8 정도의 pH를 만들기 위해서 NaHCO₃나 HCl을 한 방울 씩 섞어서 맞추었다. 이후 증류수를 더 넣어 1 l를 만들었다. 여기에 항생균-항진균제 10ml를 섞고 멸균된 500ml 병(고온증기멸균기 121°C 20분 멸균)에 filter unit(500ml)을 설치하여 여과시켜서 보통 5µm 이상의 세균을 걸러냈다. 이후 fetus bovine serum (FBS) 50ml 씩 각 병에 넣어주어 10% FBS가 포함된 α-MEM 배지를 만들었다.

이 후 교정용 목적으로 발거된 건강한 제 1소구치를 살균된 글로브를 끼고 살균한 거즈를 이용해 한 손에 잡고 치관부에서 치은 부착부 2mm까지를 5% NaOCl에 1분 간 위치시킨 후 치근 중간 1/3 부위에서 치주인대 조직을 #15 blade로 채취한 뒤 α-MEM(20% FBS 함유)와 함께 1000-1500 rpm 사이에서 5분 간 원심분리를 2회 시행하였다.

원심 분리된 조직은 25cm² 배양접시에서 20% FBS, 100

unit/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin, 0.5mg/ml amphotericin-B가 포함된 α-MEM 배지에 넣고 37°C, 100% 습도, 5% CO₂ 공기 혼합 배양기에서 배양하였다.

치주인대세포가 단층으로 증식하게 되면 배지를 제거하고 0.05% trypsin 1ml를 넣어주고 약 1분 간 흔들어주고 현미경으로 세포가 떨어졌는지 확인하였다. 이후 계속 배지로 씻어준 후 50ml tube에 넣어주고 1000-1500rpm 사이에서 원심분리를 5분 동안 해주고 배지를 빼내고 세포가 가라앉은 튜브에 배지 50ml를 넣어주고 섞었다. 이후 100mm 세포 배양접시에 10ml씩 나누고 미생물배양기에 넣어두었다. 이렇게 3-4 일 간격으로 계대 배양하여 세포의 균일한 특성을 갖는 4세대 세포를 만들었다. 이후 Dimethyl sulfoxide(DMSO) 1ml(10%) + 배지 ml + FBS 1ml(20%)를 넣어 주고 tube에 1ml씩 담고 -20°C 냉장고에 2시간 보관한 후 -70°C 냉장고에 보관했다가 질소탱크에 보관하고 필요할 때마다 세포를 꺼내어 사용하였다.

2) 저장 용액

α-MEM과 우유(S회사, P회사), HBSS, tap water를 사용하였다.

2. 연구 방법

1) MTT assay를 이용한 세포생존율 측정

4세대로 배양된 세포를 0.05% trypsin으로 처리하여 부착 세포를 분리시켜 원심분리한 후 trypan blue로 염색하여 세포수를 측정하고 96well의 배양접시에 각 well 당 104개의 세포가 존재하도록 10% FBS 함유 α-MEM 배양액 200µl를 넣은 후 공기 혼합 배양기에서 배양하였다.

배양 1일 후 세포가 배양 접시 바닥에 완전히 부착된 상태를 확인한 후 배양액을 제거하고 α-MEM 배지, 우유(S회사, P회사)와 HBSS, tap water 200µl를 주입하였다.

4°C, 25°C, 37°C의 세 가지 온도에 60분 동안 배양한 후 저장용액을 제거하고 100µl의 MTT 용액을 각 well에 첨가 후 4시간 동안 37°C 5% CO₂ 공기 혼합 배양기에서 세포 배양을 실시하였다. 세포 배양 후 배양액을 제거하고 200µl DMSO 용액을 첨가하여 형성된 formazan 결정을 용해시킨 후 ELISA reader를 파장 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 본 실험은 각 군마다 세 가지 온도에 따라 3회 반복 시행하였다.

2) 통계 분석

온도와 저장용액과의 유의성 있는 차이가 있는지 알아내기 위하여 2-way ANOVA를 시행하였으며, 각 저장용액에서의 온도에 따른 차이와 세 가지 온도에 따른 저장용액간의 차이를 알아보기 위해 Duncan's Grouping을 이용하였다.

Ⅲ. 연구 성적

1. MTT assay를 이용한 저장용액에서의 치주인대세포의 생존율

1) 각 저장용액의 온도에 따른 치주인대세포의 생존율 (Table 1)

a. α-MEM

4℃, 25℃, 37℃로 온도가 증가함에 따라 치주인대세포의 생존율은 유의성 있게 감소하였다.

b. HBSS

4℃에서 치주인대세포의 생존율은 높았고 25℃, 37℃에서 낮았다.

c. S사 우유

4℃, 25℃에서 치주인대세포의 생존율은 높았고 37℃에서 낮았다.

d. P사 우유

4℃, 25℃에서 치주인대세포의 생존율은 높았고 37℃에서 낮았다.

e. tap water

4℃, 25℃, 37℃에서 치주인대세포의 생존율은 낮았다.

2) 각 온도에 따른 저장용액간의 비교(Table 2)

a. 4℃

치주인대세포의 생존율은 α-MEM과 P-milk에서 가장 높았고 HBSS, S-milk, tap water 순으로 낮았다.

Table 1. Comparison of the mean optic density of the storage medium depending on temperature and Duncan's Grouping. There's statistical significant by Duncan's Grouping.

storage medium	temperature(℃)	Mean±SD	n	Duncan's Grouping
α-MEM	4	0.28±0.02	20	A
	25	0.26±0.03	20	B
	37	0.24±0.02	20	C
HBSS	4	0.26±0.04	20	A
	25	0.24±0.03	20	B
	37	0.23±0.03	20	B
S-milk	4	0.25±0.04	20	A
	25	0.24±0.04	20	A
	37	0.22±0.03	20	B
P-milk	4	0.28±0.04	20	A
	25	0.26±0.04	20	A
	37	0.23±0.02	20	B
tap water	4	0.18±0.04	20	A
	25	0.18±0.02	20	A
	37	0.17±0.03	20	A

Table 2. Comparison of the temperature according to the storage medium. There's statistical significant by Duncan's Grouping.

	4℃		25℃		37℃	
	mean	Duncan's Grouping	mean	Duncan's Grouping	mean	Duncan's Grouping
α-MEM	0.28	A	0.26	A	0.24	A
P-milk	0.28	A	0.26	A	0.23	A
HBSS	0.26	A	0.24	B	0.23	A
S-milk	0.25	B	0.24	B	0.22	A
tap water	0.18	C	0.18	C	0.17	C

- b. 25℃
치주인대세포의 생존율은 α-MEM에서 가장 높았고, P-milk, HBSS, S-milk, tap water 순으로 낮았다.
- c. 37℃
치주인대세포의 생존율은 α-MEM, P-milk, HBSS, S-milk에서 높았고, tap water에서 가장 낮았다.

IV. 총괄 및 고찰

어린이가 유치원이나 학교에 다니는 나이가 되면 대부분 노는 도중에 사고를 당하거나 어떤 물건에 부딪치거나 동료와의 싸움, 자동차 사고 등의 원인으로 안면의 타박상과 함께 치아진탕, 아탈구, 치관 파절, 치근 파절, 치아 탈구, 전위 등이 많이 나타난다. 영구 전치가 맹출하는 7세 전후의 아동에서는 치근이 짧고 치주인대가 느슨하여 치아와 지지조직의 손상 시 치아탈구가 자주 발생한다. 이런 완전탈구된 치아의 치료법은 재식술을 들 수 있는데 이는 치조와에서 이탈된 치아를 가능한 한 빠른 시간 내에 재식립하는 술식이다. 일반적으로 재식술의 성공여부는 치조와내로 재식시킬 때까지의 경과시간과 치조와 부위에서 치조골과절이나 심한 연조직의 손상이 없어야 하며, 또한 치주인대를 보호하는 것이 중요하다. 치아를 즉시 재식하는 것은 사고 시 아이의 심리적 상태, 보호자의 지식이나 자신감 부족, 확실하게 동의된 지침 등이 부족하기 때문에 어려울 수 있다. 그래서 탈구 후 전문가나 치과병원에 가기 전까지 치주인대세포의 생활력을 유지하기 위해 치아를 저장하는 저장액 선택이 중요하다^{1,10)}.

재식 전 저장 상태에서 치주인대세포의 생존에 영향을 주는 것은 건조 상태, pH, 삼투압, 필수영양소 함유, 세균과 독소의 유무, 온도 등이 있다¹⁴⁻¹⁶⁾. 건조시에는 치주인대의 섬유세포보다 조골세포의 활성도가 증가하여 시간이 지날수록 유착이 발생한다고 하였다. 세포 성장의 최적의 pH는 7.2~7.4이고 pH 6.6~7.8 사이에서도 생존할 수 있으며 최적도가 낮을수록 세포 부종을 감소시키고 생활력을 상승시키며 치유능력을 증진시켜 회복력 또한 상승시킨다^{17,18)}. 세포막의 통합성 유지를 위해서는 세포외액과 등장성인 용액을 사용해야 한다. 삼투압이 낮은 저장액에서는 세포막에 비가역적인 손상을 주게 되는데 Blomloef⁹⁾는 NaCl을 타액에 첨가함으로써 삼투압을 높여 식염수와 유사한 수준까지 생존력이 향상됨을 보고하였다. Alacam 등¹¹⁾은 식염수는 Ca²⁺, Mg²⁺같은 대사용 필수 이온이 결여되어 있으나 우유에는 이외에도 필수영양소가 있어서 세포 보호 효과를 갖는다고 하였다. 이는 생리적 설탕 용액이 식염수보다 생존율이 높은 이유로 glucose가 있기 때문인 것과 같은 이유이다. Soeder 등²⁰⁾은 우유, 식염수, 타액, 타액과 같은 삼투압의 설탕 용액을 대상으로 한 실험에서 같은 삼투압의 설탕 용액보다 타액에서 낮은 생존율을 보였는데 이는 같은 삼투압 이기는 하지만 타액내의 세균 때문에 세포파괴가 촉진되었기 때문이라고 보고하였다. Lekic 등¹⁶⁾에 의하면 우유와 대기 상태

에서 4, 23℃에 15, 30, 60, 120분에 저장 시 4℃에서 세포 생존력이 높았다고 한다. 이는 온도가 낮을수록 세포 부종이 감소하고 세포 생존력이 상승하며 상치 치유 능력을 증진시켜 회복력을 상승시키기 때문이다. 우유와 HBSS에 4, 20℃에 0, 1, 3, 6, 10, 16, 24, 36, 48, 72 시간 저장 후 6, 10 시간 후 4℃에서 생활력 있는 세포 수가 높았는데 이는 부착된 세포의 이주와 적은 표본수 때문이라고 Huang 등²¹⁾은 주장하였다. 또한 4℃(38.5%)에서 20℃(78.6%)보다 치주인대세포의 부착이 낮은 것은 갑작스러운 온도 변화에 의한 것이라고 하는 등 통상의 개념과는 다른 결론을 내렸다. Schwartz와 Andreasen⁹⁾은 4, 20, 37℃에서 60, 120, 180분 후 생활력 있는 세포수를 셀 결과 우유에서 저장 시에는 거의 모든 세포가 살아있었고 타액에서는 시간과 온도에 의존적으로 세포 수가 감소하였다고 한다.

이렇듯 치주인대세포의 생존율을 높이기위해선 적절한 온도와 저장용액을 선택해야 한다.

American Association of Endodontics(1994)에서는 탈구된 치아의 저장용액으로 등장성인 용액인 Hank's Balanced Salt Solution을 추천하였다²²⁾. 이런 HBSS에는 무기 이온과 glucose, phenol red 등을 포함하고 있는데 이 중 나트륨과 칼륨은 세포의 긴장력, 투과성에 영향을 미치고 칼슘과 마그네슘은 세포막의 유지와 세포의 내부 구조를 유지하는데 중요하고 인과 bicarbonate는 용액의 버퍼 능력을 주고 glucose는 세포의 에너지원으로 사용되고 phenol red는 pH indicator로 사용된다²³⁾. 우유는 유사한 생리적 삼투압^{24,25)}, 영양요소들의 세포 보호 효과와 pH buffering system(약산성 pH = 6.5~6.8) 등을 가지고 있다²⁶⁾. 또한 Oslon 등²⁷⁾에 의하면 platelet derived growth factor(PDGF)는 치주인대세포를 유사 분열 시키는 효과가 있다고 하였으며 Belford 등²⁸⁾은 우유로부터 중배엽성에서 유래된 세포의 활성을 촉진하는 growth factor를 추출하였다. Harkacz 등²³⁾에 의하면 지방 함유가 다른(0g/240ml~8g/240ml) 우유에서 지방 함량이 많을수록 holes과 지방의 조합이 높은 세포 손상을 일으킬 수 있다고 하였고 Marino 등²⁹⁾에 의하면 long shelf-life milk와 일반 pasteurized milk에서 1,2,4,8 시간 후의 세포 생존율을 비교한 실험에서 유의성 있는 차이를 보이지 않았다. 그렇지만 전자가 6개월 정도의 저장 기간을 가지고 있고 냉장 보관이 필요 없기 때문에 학교, 운동장, 경기장 등에서 쉽게 이용 가능하다고 보고하였다. 본 실험에서는 10% FBS 함유 α-MEM, P회사/S회사 우유, HBSS, tap water 등을 탈구된 치아의 저장용액으로 평가해 볼 때 α-MEM에서 가장 많은 세포가 활성화 상태로 존재하였으며 우유, HBSS, tap water 순으로 감소함을 알 수 있었다. 이는 치주인대세포의 저장 환경을 다른 것으로 바꾸는 것보다는 처음 배양되었던 α-MEM에서 생존율이 가장 높게 나온 것 같다. 또한 HBSS보다 우유에서 결과가 좋았던 것은 growth factor와 glucose 이외의 필수 영양소 함유로 인한 세포 보호 효과를 가지기 때문인 것 같다. P사와 S사 우유의 치주인대세포 생존율이 차이가 난 이유는 우유는 원유품질과 열처리방식에 따라 포함 세

균수나 영양소 파괴에 있어서 차이가 생길 수 있기 때문이다. P사의 제품은 1등급 우유의 세균수에서 8천 미만으로 타사(3만 미만)보다 3.5배 정도 적은 것을 보이고 있다.

4℃, 25℃, 37℃ 등 온도가 높을수록 각 저장용액에서의 치주인대세포의 생존율은 유의성 있게 감소하였는데 이는 온도가 낮을수록 세포 부종이 감소하고 세포 생존력이 상승하며 상처 치유 능력을 증진시켜 회복력을 상승시키기 때문이다. 특히 37℃에선 tap water를 제외한 나머지 저장용액간의 치주인대세포의 생존율 차이가 크게 나지 않았는데 이는 37℃에서 세균 독성이 활발히 진행됨을 알려준다.

또한 4℃에선 HBSS보다 우유에서 생존율이 높았던 것으로 미루어볼 때 외상으로 인한 치아 탈구 발생 시 일반적인 저장용액으로 HBSS가 추천되고 있으나 우유와의 비교에서 그 차이를 명확히 구분할 수 없으며 사고 현장에서 쉽게 구할 수 있고 치주인대세포의 생활력 보존에도 유리한 4℃ 냉장 보관된 우유에 치아를 담가오도록 추천할 수 있겠다. 더욱이 앞으로 여러 종류의 우유마다 그 차이를 밝혀내어 좀 더 치주인대세포 생존율을 높일 수 있는 제품에 담가오도록 많은 연구가 진행되어야겠다.

V. 결 론

외상성 손상 후 치아 탈구 발생 시 세 가지 온도를 달리하였을 경우 각 저장용액에 따른 치주인대세포의 생존율을 비교해 보고자 치주인대세포를 10% FBS 함유 α-MEM에서 37℃ 5% CO₂ 공기 혼합 배양기에서 배양하였다. 이후 치주인대세포를 HBSS와 α-MEM, 우유(S회사, P회사), tap water에 저장한 후 4, 25, 37℃에서 60분이 지난 후 각 군에 대해 MTT assay를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 4℃ 저장용액에서 치주인대세포의 생존율은 α-MEM과 P-milk에서 가장 높았고 HBSS, S-milk, tap water 순으로 낮았다.
2. 25℃ 저장용액에서 치주인대세포의 생존율은 α-MEM에서 가장 높았고, P-milk, HBSS, S-milk, tap water 순으로 낮았다.
3. 37℃ 저장용액에서 치주인대세포의 생존율은 α-MEM, P-milk, HBSS, S-milk에서 높았고, tap water에서 가장 낮았다.
4. α-MEM에서 치주인대세포의 생존율은 4℃에서 가장 높았고 25℃, 37℃ 순으로 낮았다.
5. HBSS에서 치주인대세포의 생존율은 4℃에서 높았고 25℃, 37℃에서 낮았다.
6. S사와 P사 우유에서 치주인대세포의 생존율은 4℃와 25℃에서 높았고 37℃에서 낮았다.

이상의 결과를 종합해볼 때 외상으로 인해 치아가 탈구되었을 때 탈구된 치아의 저장용액으로 HBSS 용액이 추천되고 있으나 이 번 연구에서는 사고 현장에서 쉽게 구할 수 있고 치주

인대세포의 생활력 보존에도 유리한 4℃ 냉장 보관된 우유에 치아를 담가오는 것이 좋은 방법으로 사료된다.

참고문헌

1. 대한소아치과학회 : 소아·청소년치과학, 1판, 서울, 신흥인터내셔널. 441-462, 1999.
2. Andreasen JO, Andreasen FM : Textbook and color atlas of traumatic injuries to the teeth. Ed. 3. Munksgarrd, Mosky Co., 1994.
3. 김경희, 김종수, 유승훈 : 소아환자에 있어서 외상방지를 위한 마우스가드의 치험례. 대한소아치과학회지, 32:537-541, 2005.
4. Kenny DJ, Barrett EJ : Pre-Replantation storage of avulsed teeth : fact and fiction. CDA J, 29:275-281, 2001.
5. Lin WL, McCulloch CA, Cho MI : Differentiation of periodontal ligament fibroblasts into osteoblasts during socket healing after tooth extraction in the rat. Anat Rec, 240:492-506, 1994.
6. Morris ML, Moreinis A, Patel R, et al. : Factors affecting healing after experimentally delayed tooth transplantation. J Endod, 7:80-4, 1981.
7. Nguyen NH : Factors influencing repair and regeneration following replantation. J Can Dent Assoc, 58:407-11, 1992.
8. Blomloef L, Andersson L, Lindskog S, et al. : Periodontal healing of replanted monkey teeth prevented from drying. Acta Odontol Scand, 41:117-23, 1983.
9. Schwartz O, Andreasen JO : Cryopreservation of mature teeth before replantation in monkeys. Int J Oral Surg, 12:425-436, 1983.
10. 최원경 : 수종의 저장용액에서 치주인대세포의 생존율 비교. 대한소아치과학회지, 26:427-438, 1999.
11. Alacam T, Gorgul G, Omurlu H, et al. : Lactate dehydrogenase activity in periodontal ligament cells stored in different transport media. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 82:321-323, 1996.
12. Lindskog S, Blomloef L, Hammarstrom L : Mitosis and microorganism in the periodontal membrane after storage in milk or saliva. Scand J Dent Res, 91:465-472, 1983.
13. Patil S, Dumsha TC, Shdiskis RJ : Determining periodontal ligament cell viability from exarticulated teeth stored in saline or milk using fluorescein diacetate. Int Endod J, 27(1):1-5, 1994.

14. Lin DG, Kenny DJ, Barrett EJ, *et al.* : Storage conditions of avulsed teeth affect the phenotype of cultured human periodontal ligament cells. *J Periodont Res*, 35:42-50, 2000.
15. Bibby KJ, McCulloch CA : Regulation of cell volume and Ca²⁺ in attached human fibroblasts responding to anisotonic buffers. *Am J Physiol*, 266:C1639-49, 1994.
16. Lekic PC, Kenny DJ, Barrett EJ : The influence of storage conditions on the clonogenic capacity of periodontal ligament cells : implications for tooth replantation. *Int Endod J*, 31:137-40, 1998.
17. Lekic P, Kenny D, Moe HK, *et al.* : Relationship of clonogenic capacity to plating efficiency and vital dye staining of human periodontal ligament cells : implications for tooth replantation. *J Periodont Res*, 31:294-300, 1996.
18. Paul J : Cell and tissue culture. 4th ed. London : E & S Livingstone, 52-119, 1970.
19. Blomloef L : Storage of human periodontal ligament cells in a combination of different media. *J Dent Res*, 60:1904-1906, 1981.
20. Soeder PO, Otteskog P, Andreasen JO, *et al.* : Effect of drying on viability of periodontal membrane. *Scand J Dent Res*, 85:164-168, 1997.
21. Huang SC, Remeikis NA, Daniel JC : Effects of long-term exposure of human periodontal ligament cells to milk and other solutions. *J Endod*, 22:30-33, 1996.
22. Freshney : Culture of animal cells : A Manual of basis technique. 3rd ed. 84-103, 1999.
23. Harkacz OM Sr, Carnes DL Jr, Walker WA 3rd : Determination of periodontal ligament cell viability in the oral rehydration fluid gatorade and milks of varying fat content. *J Endod*, 23:687-690, 1997.
24. Blomloef L : Milk and saliva as possible storage media for traumatically exarticulated teeth prior to replantation. *Swed Dent J*, 8:1-26, 1981.
25. Rozenfarb N, Kupietzky A, Shey Z : Milk and egg albumen are superior to human saliva in preserving human skin fibroblasts. *Pediatr Dent*, 19:347-8, 1997.
26. Blomloef L, Otteskog P : Viability of human periodontal ligament cells after storage in milk or saliva. *Scand J Dent Res*, 88:436-40, 1980.
27. Oslon BD, Mailhot JM, Anderson RW : Comparison of various transport media on human periodontal ligament cell viability. *J Endod*, 23:676-79, 1997.
28. Belford DA, Rogers ML, Regester GO : Milk derived growth factors as serum supplements for the mature permanent incisors in monkeys. *Swed Dent J*, 4:101-110, 1980.
29. Marino TG, West LA, Liewehr FR, *et al.* : Determination of periodontal ligament cell viability in long shelf-life milk. *J Endod*, 26:699-702, 2000.

Abstract

A COMPARATIVE STUDY OF PRESERVING ABILITY
OF HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT CELLS STORED
IN DIFFERENT TEMPERATURED STORAGE MEDIA

Jae-Hyun Jo, D.D.S., Seong-Oh Kim, D.D.S., Ph.D., Hyung-Jun Choi, D.D.S., Ph.D.,
Jae-Ho Lee, D.D.S., Ph.D., Heung-Kyu Son, D.D.S., Ph.D., Byung-Jai Choi, D.D.S., Ph.D.

Department of Pediatric Dentistry, College of Dentistry School, Yonsei University

To compare the survival rate of periodontal ligament cells preserved in storage media with good availability at the time of an avulsion injury, periodontal ligament cells were incubated in α -MEM culture medium containing 10% FBS in condition of 37°C, 5% CO₂. These cells were then cultured in HBSS, α -MEM, milk(S. co., P. co.) and tap water at the temperature of 4, 25, 37°C each in 60 min. The groups were measured by MTT assay.

The results were as follows :

1. Among the storage media at 4°C, α -MEM and P-milk had the highest preserving ability of periodontal ligament cells, while that of HBSS, S-milk and tap was low in order.
2. Among the storage media at 25°C, α -MEM had the highest preserving ability of periodontal ligament cells, while that of P-milk, HBSS, S-milk, tap water was low in order.
3. Among the storage media at 37°C, the preserving ability of periodontal ligament cells was very high in α -MEM, P-milk, HBSS and S-milk. it's lowest in tap water.
4. The preserving ability of periodontal ligament cells in α -MEM was high at 4°C and it's low in order of 25°C, 37°C, but in HBSS was high at 4°C and it's low at 25°C, 37°C.
5. The preserving ability of periodontal ligament cells in S-milk and P-milk was high at 4°C, 25°C and it's low at 37°C.

In conclusion, HBSS is the storage medium of choice in an avulsion, but in this study it is preferable to choose milk at 4°C for tooth since it is easy to get and affect cell viability.

Key words : Periodontal ligament cells, Storage media, Temperature, HBSS(Hank's Balanced Salt Solution)