

지연된 의도적 재식술을 통한 치주 조직 재생 방법의 고찰

연세대학교 치과대학 치주과학교실, 치주조직재생연구소¹⁾, 연세대학교 치과대학 보존과학교실²⁾,
인하대학교 의과대학 치과학교실³⁾

김 유 경^{1)*}, 김 동 주^{1)*}, 이 은 웅¹⁾, 임 현 창¹⁾, 이 중 석¹⁾,
정 의 원¹⁾, 윤 정 호³⁾, 김 의 성²⁾, 이 승 종¹⁾, 최 성 호¹⁾

ABSTRACT

Delayed intentional replantation: new approach for periodontal regeneration and establishment of theoretical background

¹⁾Research Institute for Periodontal Regeneration, Department of Periodontology, College of Dentistry, Yonsei University, ²⁾Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Yonsei University, ³⁾Department of Dentistry, School of Medicine, Inha University, Incheon, Korea
You-Kyoung Kim^{1)*}, Dong-Ju Kim^{1)*}, Eun-Ung Lee¹⁾, Hyun-Chang Lim¹⁾, Jung-Seok Lee¹⁾,
Ui-Won Jung¹⁾, Jeong-Ho Yun³⁾, Eui-Seong Kim²⁾, Seong-Jong Lee²⁾, Seong-Ho Choi¹⁾

Purpose: Delayed intentional replantation was introduced as a new alternative to treat the teeth with severe periodontal involvement. The purpose of this study was to elucidate the possibility of delayed intentional replantation and establish theoretical backgrounds.

Materials and Methods: Studies were performed into the following two subjects; ① Clinical evaluation of patients who underwent delayed intentional replantation using clinical and radiographic data. Severe periodontitis involved teeth were carefully extracted and proper time for delayed replantation was evaluated by analyzing inflammation markers (IL-6, TNF- α). ② Theoretical studies for efficacy of delayed intentional replantation using (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for preservation of periodontal ligament cells on root surface by minimizing inflammation and treatment of inflammatory extraction sockets.

Results: Meaningful success ratio and survival rate were found in delayed intentional replantation showing reduced bone loss and maintained bone level. Additionally, viability of EGCG applied periodontal ligament cells was much higher than control group. Also, EGCG promoted healing of inflammatory extraction sockets by inhibiting inflammatory cell proliferation.

Conclusion: Within the limitations of this study, 1-2 weeks after extraction is an appropriate time to do delayed intentional replantation. Also, EGCG provides helpful effects on viability of periodontal ligament cells and periodontium.

Key words : Delayed intentional replantation, Tooth extraction, Periodontitis, (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), Anti-inflammatory effect

Corresponding Author

최성호

(120-752) 서울시 연세로 50 연세대학교 치과대학 치주과학교실

Tel : +82-2-2228-3189, Fax : +82-2-392-0398, E-mail : shchoi726@yuhs.ac

I. 서론

치주 치료의 예후를 평가하는데 가장 중요한 요인 중 하나는 치주 조직의 지지 수준이다¹⁾. 고도의 치주 질환에 이환되었을 때 예지성 있는 치료 방법 중 하나는 역설적으로 발치이다. 치주 조직의 파괴가 치조골 정에서 시작하여 치근단까지 진행된 경우 적극적인 치주 치료 후에도 재생이 일어나기 매우 어렵다. 치주 질환의 감염원과 염증을 제거하기 위한 기구 조작(비외과적 및 외과적 술식)과 치은 열구내 국소적 항생제 적용과 같은 보조적인 요법을 통해 세균에 의한 감염을 제거하여 성공적인 치주 치료를 할 수 있지만²⁾ 치근의 복잡한 해부학적 구조와 이에 따른 기구 접근의 한계로 인해 완전히 제거되지 않은 세균은 감염 재발의 요인이 되며 결과적으로 치주 치료의 예후를 불량하게 한다^{3, 4)}. 또한 치근단까지 진행된 치주 염증은 세균의 제거를 더 어렵게 할 뿐만 아니라 치수 염증을 유발하기도 한다.

이러한 맥락에서 의도적 재식술은 치주적 예후가 매우 불량한 치아를 치료하는 데 있어 기존 치료 방법의 한계를 보완하는 대안으로 제시되었다. Lu(1986)⁵⁾와 Demiralp(2003)⁶⁾은 고도의 치주 조직 파괴가 일어난 치아를 발치하여 염증 조직을 제거한 후 재식하였을 때, 성공 사례를 보고하였다. 또한 Baltacioglu E(2011)⁷⁾은 치주적으로 회생 불가능한 치아를 발거한 후 enamel matrix derivatives(EMD)와 demineralized freeze-dried bone allograft (DFDBA)를 동반하여 재식하였을 경우 성공적인 결과가 나타남을 보고한 바 있으며 G. Nagappa (2013)⁸⁾은 고도의 치주염에 이환된 치아를 발거하여 구강 외에서 염증 조직을 제거하고 치근면을 활택하고 재식한 경우 양호한 치주 조직의 재생 결과를 보고하였다. 그러나 치아의 동요도가 크거나 치근 이개부가 병소로 이환된 경우, 발치와의 격벽이 파괴된 경우와 같이 치주 조직의 염증이 심한 경우 발거한 치아

재식의 성공률이 낮다는 것은 널리 보고되어 왔으며 따라서 고도의 치주염에 이환된 치아의 발거 후 재식 치료의 결과에 대한 예지성과 그 이론적 근거는 아직 정립되지 않은 것으로 보인다. 기존에 보고된 성공 사례가 있긴 하지만, 치주 염증이 최소한인 치아의 의도적 재식술과 치주 예후가 불량한 치아의 재식술은 다른 치유 양상을 보일 수 있으며, 여기에는 치근 표면과 발치와의 잔존할 수 있는 세균으로 인한 재감염의 위험성과 지지 조직의 부족에서 기인한 치아 동요도가 관여할 것이다.

Lee(2014)⁹⁾등⁹⁾은 치주적으로 회생 불가능한 치아를 발거한 후 염증 조직의 해소를 위해 일정기간을 지연하여 재식하였고 임상 및 방사선학적으로 성공적인 결과를 보고하였으며 저자들은 이를 “지연된 의도적 재식”이라 하였다. 이 방법은 발치와의 염증이 잔존된 채 염증이 치유되지 않은 상태에서 발치된 치아를 재식함으로써 재감염의 위험성이 높았던 기존 치료의 한계를 보완하여 치주염에 의해 발치된 치아 치료에 대안이 될 수 있을 것으로 사료된다.

이러한 임상 적용 가능성에도 불구하고 지연된 의도적 재식 치료에 대한 연구는 아직 초기 단계이며 예지성 있는 치료로 자리매김하기 위해서는 지연 재식의 시기 결정과 지연 기간 동안 치아를 보관하는 방법 등이 확립되어야 할 것이다. 근본적으로 손상된 치주 조직이 회복되고 치주인대세포의 생활력이 보존되는 것이 이 치료의 선행 조건일 것이다^{5, 9)}. 일정 기간 발치와의 염증이 해소되는 동안 치주 인대 세포의 생활력을 최대한 유지하는 방법에 대한 연구와 염증성 발치와에서 염증 정도를 빠르고 최소한의 수준으로 낮추는 연구가 “지연된 의도적 재식”을 이루기 위해 필요하다. 또한 “지연된 의도적 재식” 후 치아의 생존율을 평가하는 것은 기존의 의도적 재식과 비교하여 치료의 결과를 예견하는데 의미가 있을 것이다.

II. 연구재료 및 방법

본 연구에서는 지연된 의도적 재식에 관한 연세대학교 치과대학 치주과학교실에서 시행한 일련의 연구들을 기반으로 그 결과를 보고하고자 한다(Table 1).

1. 임상적 접근 : 지연된 의도적 재식 시행 후 성공군과 실패군의 임상 및 방사선학적 특성 비교²⁾

지연된 의도적 재식술의 성공률을 높이는 방법의 연구에 앞서 기존의 의도적 재식술에 비해 지연된 의도적 재식술이 향상된 치료 결과를 나타내어 효용성이 있는 치료 방법인지 알아보기 위한 연구가 시행되었다. 연세대학교 치과 보존과에서는 2000년 3월부터 2010년 7월까지 1) 특이할 만한 전신 병력 및 치주 수술의 금기증이 없고, 2) 6mm 이상의 치주낭을 갖거나, 방사선 사진상 60% 이상의 골소실이 나타나거나, Miller의 분류에 의한 2도 이상의 동요도 중 적어도 하나를 포함하며 3) 발치보다는 치아를 보존하기를 원

하는 요건을 충족하는 24세-72세 사이의 27명의 환자(남자 17명, 여자 10명) (IRB number : 2-2012-0035)에서 지연된 의도적 재식을 시행한 후 장기간의 결과를 관찰하여 성공한 군과 실패한 군에서의 임상 및 방사선학적 비교를 시행하였다.

주의깊게 발거한 치아를 초음파 스케일러 및 다이어몬드 버를 사용하여 치근면 활택을 시행한 다음 항생물질(1000nm dexamethasone solution, 4 ° C)에 10-14일간 보관하였다(Figure 1). 이후 super EBA(Harry J. Bosworth Co., Skokie, IL, USA)를 사용하여 retro-grade filling 하고 발치 외에 재식한 후 인접치와 고정하고 교합간섭이 없도록 교합조정을 시행한 후 매 3개월마다 평가하였다. 술 후 치료의 성공 여부를 평가하기 위해 치은 부종, 탐침 깊이, 치은 출혈, 동요도 평가를 통해 감염 여부를 확인하고 술 후 1개월 후 방사선 사진을 기준으로 정기 내원시마다 치근단 방사선 사진을 촬영 (SIGMA, GE Medical System Instrumentarium Co., Tuusula, Finland)하여 방사선 사진상 (PiView STAR, Infinit, Seoul, Korea)에서 측정할 전체

Table 1. List of included studies

| Author | Main title | Journal |
|-------------------|---|---|
| Lee et al. | Intentional delayed replantation of periodontally hopeless teeth: The retrospective study | J Periodontal Implant Sci 2014 ;44:13-19 |
| Im et al. | Anti-inflammatory effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-stimulated fibroblasts and stem cells derived from human periodontal ligament | J Periodontal Implant Sci 2011 Feb;41(1):10-6 |
| Yun et al. | Effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on maintaining the periodontal ligament cell viability of avulsed teeth: a preliminary study | J Periodontal Implant Sci 2011 Feb;41(1):10-6 |
| Cho et al. | The effect of orally administered epigallocatechin-3-gallate on ligature-induced periodontitis in rats | J Periodont Res 2013 Apr 48: 781-89 |
| Kim et al. | Changes in periodontium after extraction of a periodontally-involved tooth in rats | J Periodontal Implant Sci 2012 Oct 42(5):158-65 |
| Yun et al. | Inhibitory effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechingallate on the expression of matrix metalloproteinase-9 and on the formation of osteoclasts | J Periodont Res 2004; 39; 300-307 |
| Surangi C. et al. | Evaluation of vitrification for cryopreservation of teeth | Periodontal Implant Sci 2010;40:111-118 |

치근 길이에서 치조골 하방 치근 길이를 빼는 방법으로 골소실 정도를 조사하였다.

2. 근거 확보 연구

지연된 의도적 재식의 이론적 근거를 확보하고자 2가지 방향으로 접근하여 연구를 진행하였다; 1) “치근 표면”의 치주 인대의 생활력 보존과 염증 수준 최소화, 2) 염증성 “발치와”의 처치. 이를 위해 본 연구들에서는 녹차 추출물을 이용하였다. 녹차 추출물의 주성분 중 하나인 polyphenol의 항암 및 항염 효과, 심혈관계 질환에서의 치료 효과는 많이 알려져 있고^{10, 11)} 본 연구에서는 그 중 가장 널리 연구되고 있는 (-)-Epigallocatechin-3-gallate(EGCG)의 항염 작용을 기반으로 하여 EGCG가 치아의 치주 인대 세포 및 치주 조직의 치유에 미치는 효과를 연구하였다. 본

연구에 시행된 임상 및 동물 실험은 연세대학교 치과 대학 병원의 기관감사위원회의 평가(IRB)와 동물 실험 윤리위원회의 평가를 준수하였다.

1) 치근표면의 치주인대의 생활력 보존과 염증 수준 최소화 - 발거된 치아를 보관할 매질의 선택

(-)-Epigallocatechin-3-gallate(EGCG)의 치아 조직 생활력 보존에 대한 평가 실험에서 Jung(2011)등¹²⁾은 건강한 치주 상태를 가진 비글견 5마리에서 발치 겸자를 사용하여 최대한 치주 조직에 손상을 주지 않고 치주인대세포를 보존하도록 주의하여 30개의 대구치를 발치하였다. 30개의 치아를 hemi-section하여 총 50개의 치아가 실험에 사용되었다. 5개씩 총 10개의 군으로 나누어 70% 알코올로 3번 소독한 후 phosphate-buffered solution (PBS)로 세척하고 0, 10, 100 μM농도의 EGCG에

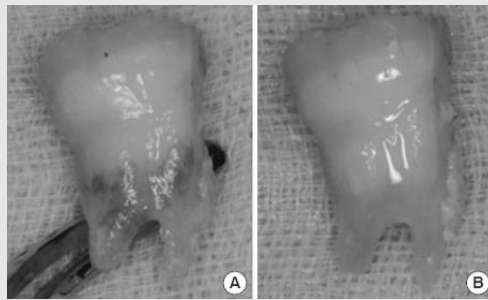


Fig. 1. Extraction and preparation of a tooth before storage
 A) The tooth subjected to delayed replantation was extracted atraumatically.
 B) The tooth surface was debrided and polished with an ultrasonic scaler a fine diamond bur.

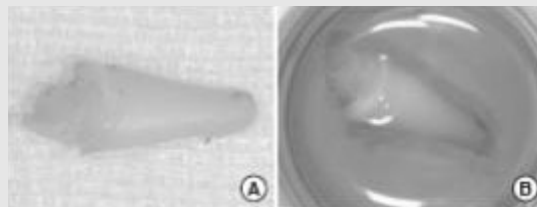


Fig. 2. Extraction and preservation of teeth from Beagle dogs.
 A) The teeth of Beagle dogs were extracted atraumatically.
 B) The teeth were preserved in 24-well plates in storage media containing (-)-Epigallocatechin-3-gallate at various concentrations

보관하였다(Figure 2). 그리고 발치 후 기간에 따라 ① 즉시군, ② period 1(매질에 4일간 보관 후 매질 없이 2일간 보관), ③ period 2(매질에 8일 보관 후 매질 없이 2일간 보관), ④ period 3(매질에 12일간 보관 후 매질 없이 2일간 보관)의 4개의 군으로 나누어 각 군의 치근면에 있는 세포의 생활력을 평가하였다. 각 실험군은 0.5 mg/mL의 MTT 용액이 적용되었으며 37 °C에서 3시간 동안 배양한 후 치아를 제거하고 남은 용액의 광밀집도(optical density)를 microplate reader(Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Ca, USA)로 검사하여 치근면 조직의 생활력을 평가하였다.

Jung(2012)등¹³⁾은 또한 매질로 선택된 EGCG가 어떤 기전을 통해 항염 작용을 하는지에 대한 연구에서 충치 없이 건강한 치아를 가진 성인(11-19세)에게서 발치된 치아로부터 추출한 치주인대 섬유모세포(hPDLFs)와 줄기세포(hPDLSCs)를 사용하였다. 교정적 목적으로 발치된 치아를 Eagle medium(α -MEM; GIBCO, Grand Island, NY, USA)로 씻은 다음 α -MEM, 10% fetal calf serum (GIBCO), 100U/mL penicillin, 100 μ g/mL 스트렙토 마이신 용액에서 37 °C, 5% CO₂ 환경에서 배양하였다. 채취된 섬유모세포(hPDLFs)와 줄기세포(hPDLSCs) 4개의 군으로 나누어 ① 대조군, ② EGCG 단독 처리군, ③ *P. gingivalis* 유래 lipopolysaccharide(LPS)만 처리한 군, ④ EGCG와 *P. gingivalis*를 함께 처리한 군에서 1,3,5,7일 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay 및 bromo-deoxyuridine assay를 이용하여 세포 독성 및 증식 효과를 평가하였다. 또한 처치 0,6,24,48 시간 후에 real-time polymerase chain reaction(PCR)을 이용하여 hPDLFs와 hPDLSCs에서의 염증 매개 물질인 interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6(IL-6), tumor necrosis

factor- α (TNF- α), osteoprotegerin(OPG), receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand(RANKL)과 RANKL/OPG의 유전자 발현을 조사하였다.

추가적으로 Surangi C. Dissanayake(2010)¹⁴⁾ 등은 저온 유리화 보관이 치주인대세포 보존에 효과적 인지에 관한 연구를 시행하였다. 1 단계에서 치주인대 세포를 배양하고 100% 저온 보관 매질과 100% 유리화 매질 ESF40(40% ethylene glycol(WAKI Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japa), 18% Ficoll70(SIGMA, St. Louis, USA), 0.3M sucrose(Junsei Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan)이 F-medium에 용해된 용액)에 2주간 각기 다른 온도에 보관하였다. 2단계에서는 매질의 비율을 조절하여 T1(75% vitrification media + 25% F-media), T2(50% vitrification media + 50% F-media), T3(25% vitrification media + 75% F-media)으로 실험군을 설정하여 액화 질소에 2주와 4주 동안 보관한 후 치주인대 세포의 생존력을 MTT assay를 이용하여 평가하였다 (Table 2, 3).

2) 염증성 “발치와”의 처치

고도의 치주염으로 인해 발치된 치아의 발치와는 심한 치조골 파괴 및 다량의 염증세포가 침윤되어 있어 치아의 재식 후 치주 조직의 재감염을 유발할 수 있으므로 지연된 재식을 시행하기에 적절한 시기를 결정하기 위해서 발치와의 치유 양상에 대한 평가 실험이 진행되었다. Kim(2012)등¹⁵⁾은 28마리의 쥐를 무작위로 8마리 대조군과 20마리 실험군으로 나누어 하악 제1대구치에 ligature ligation을 시행하여 치주염을 유발하였다. 치주염이 유발된 하악 제1대구치를 2주 뒤 발치한 후 시간의 변화에 따른(발치 후 0, 3, 7, 10일) 발치와의 치유 양상을 조직학 및 면역화학적 방법으로 조사하였다.

Table 2. Cell grouping in step 1 according to storage media and storage conditions

| PDL cell group identification | Storage media | Storage temperature (°C) | Stored in |
|-------------------------------|---|--------------------------|-----------------|
| C1 (positive control group) | 100% conventional media | -196 | Liquid nitrogen |
| C2 group | 100% conventional media | -20 | -20°C freezer |
| V1 group | 100% vitrification media | -196 | Liquid nitrogen |
| V2 group | 100% vitrification media | -20 | -20°C freezer |
| V3 group | 25% of vitrification Media added at 20°C kept for 20 minutes followed by adding 100% vitrification media at 4°C | -96 | Liquid nitrogen |
| Negative control group | 100% conventional media | -4 | Refrigerator |

PDL: periodontal ligament.

Table 3. Cell grouping in step 2 according to storage media and storage conditions

| PDL cell group identification | Storage media | Storage condition |
|-------------------------------|--|------------------------|
| C1 (positive control group) | 100% conventional media | -196°C liquid nitrogen |
| V1 group | 100% vitrification media (V1 media) | -196°C liquid nitrogen |
| T1 group | 75% vitrification media+25% F-media (T1 media) | -196°C liquid nitrogen |
| T2 group | 50% vitrification media+50% F-media (T2 media) | -196°C liquid nitrogen |
| T3 group | 25% vitrification media+75% F-media (T3 media) | -196°C liquid nitrogen |
| Negative control | 100% conventional media | 4°C refrigerator |

PDL: periodontal ligament.

치주 질환의 특징 중의 하나인 치조골 흡수는 파골 세포(osteoclast)와 골흡수 효소인 matrix metalloproteinases(MMPS)에 의해 유도되는 무기질과 유기질 소실에 의해 발생되는데 Yun(2004)등¹⁶⁾은 EGCG의 골 흡수 억제 효과에 대한 연구에서 쥐의 두 개골에서 추출한 조골세포(osteoblast)에 *P. gingivalis* 추출물을 넣은 뒤 20 μM EGCG로 처리하여 MMP-2, -9, -13 mRNA 발현 양상을 reverse transcription polymerase(RT-PCR)를 이용하여 조사하였다. 또 쥐의 골수와 두개골 조골 세포를 같이 배양한 배지에 tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP)를 이용하여 파골세포의 형성에 EGCG가 미치는 영향에 대해 조사하였다.

Cho(2013)등¹⁷⁾은 잇몸에 ligature ligation을 시행하여 치주염을 유발시킨 48마리의 Sprague-Dawley rat에서 ligature를 제거하고 EGCG와 PBS를 구강으로 주입하고 1, 2, 4주 뒤에 희생하였다. 조직학적 분석, TRAP염색 및 면역화학적 분석을 시행하여 대조군과 실험 군간의 염증 표지 인자 IL-6 및 TNF의 발현 양상을 관찰하여 골소실량 및 파골세포의 활성량을 조사하였다.

Ⅲ. 연구 결과

1. 지연된 의도적 재식 시행 후의 성공률의 변화

지연된 의도적 재식에 의해 총 27개의 치아를 재식한 후 3-21개월 동안 주기적인 경과 관찰 결과 7개가 실패하여 전체적인 누적 생존률은 66.4%로 보고되었다. 성공한 군에서는 특별한 증상이 없었으며 골소실량이 68.45%에서 34.66%로 유의미하게 감소하였다. 또한 재식 후 3개월 후에 골 생성량은 45.02%로 유지되었고 치조골의 높이 또한 이후로도 유지되었다. 재식 후 유착은 5개의 치아에서 나타났으며 치근 흡수 양상은 보이지 않았다. 반면 실패한 7개의 치아에서는 발치와 하방에 골이 생성되었으나 발치와와 치근 사이의 방사선 투과성의 간격이 방사선 사진상 뚜렷하게 나타났으며 시간이 지날수록 두꺼워지고 확장되는 양상을 나타내었다. 결과적으로 동요도가 증가하여 재식 후 6개월 이내에 제거하였다(Figure 3, 4).

2. 치근표면의 치주인대의 생활력 보존과 염증 수준 최소화에 대한 연구

치주인대세포의 생활력은 발치 직후 가장 높았고 치근면에 잔존한 세포의 수는 시간에 따라 점차 감소하였다. EGCG의 농도에 따른 세포 생활력은 0, 10, 100 μ M의 EGCG 실험군 중 100 μ M에서 다른 군보다 현저히 높았으며 period 2-3기간 동안 발치 후 감소되었던 세포 생활력이 회복되었다. 전체적으로 EGCG 처리군은 대조군에 비해 세포 생활력 및 생존력이 높았고 10 μ M군보다 100 μ M군에서 현저히 높았다(Figure 5, 6).

HPDLFs와 hPDLSCs에 *P. gingivalis*와 EGCG를 처리한 실험에서 EGCG 단독 처리군에서는 세포 증식이 감소하였다. 또한 *P. gingivalis* 단독 처리군에서 염증 표지인자들이 증가한 반면, EGCG를 함께 처리한 군에서 감소하였다(Figure 7, 8).

보관 매질의 온도에 관한 평가에서 100% 유리화 매질군에서 세포 생존력이 가장 낮았고 2주 실험군에서 유리화 매질의 비율이 감소할수록 세포 생존력이 증가하였다. 4주 실험군에서 T2 그룹에서 가장 높은 세포 생존력을 보였지만 T2 그룹에서는 2주 및 4주간의 차이가 없었다. 최대의 세포 생존력은 100% 저온보관 매질(-196 °C)에 보관하였을 때로 나타났다(Figure 9).

3. 염증성 발치와의 처치에 대한 연구

조직학적 검사 결과 염증 세포의 침윤은 발치 후 3일 후 가장 높고 점진적으로 감소하였다. 면역조직학적 분석 결과에서도 IL-6와 TNF- α 의 농도가 발치

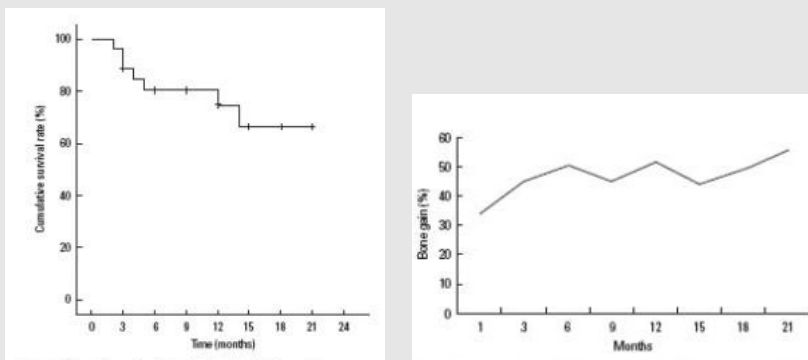


Fig. 3. Cumulative survival rate of teeth replanted after a delay. The rate of bone gain(%) 1 to 21 months after tooth replantation
Seven replanted teeth out of twenty seven teeth failed, and the overall cumulative survival rate was 66.4%. The amount of bone gain was 45.02% three months after replantation and maintained a consistent level.

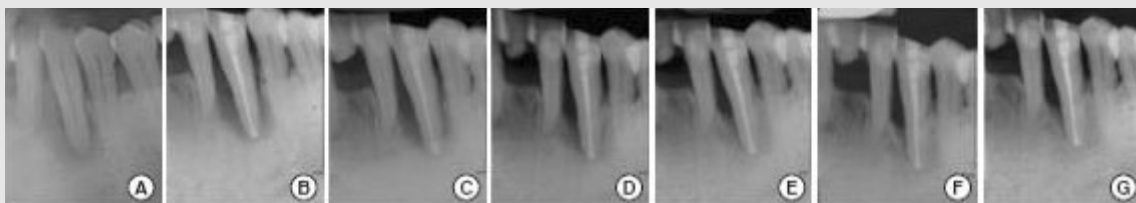


Fig. 4. Radiographs taken before (A) and 1(B), 3(C), 6(D), 12(F) and 15(G) months after replantation. After delayed replantation, periodontal regeneration occurred by periodic follow up.

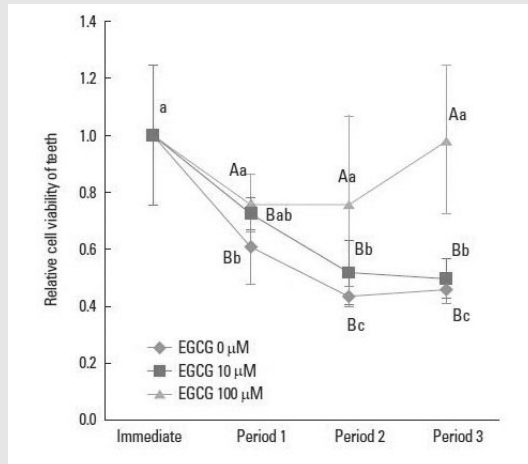


Fig. 5. Changes in cell viability of the tooth surface, according to the preservation period. The teeth were treated with 0,10, or 100 μM (-)-Epigallocatechin-3-gallate(EGCG), after which cell-viability assays (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) were performed at various points in time : immediate, period 1(preservation with EGCG for 4days and one further days without it), period 2(for 8days with EGCG and 2 further days without it), and period 2(for 12 days with EGCG and 2 further days without it).

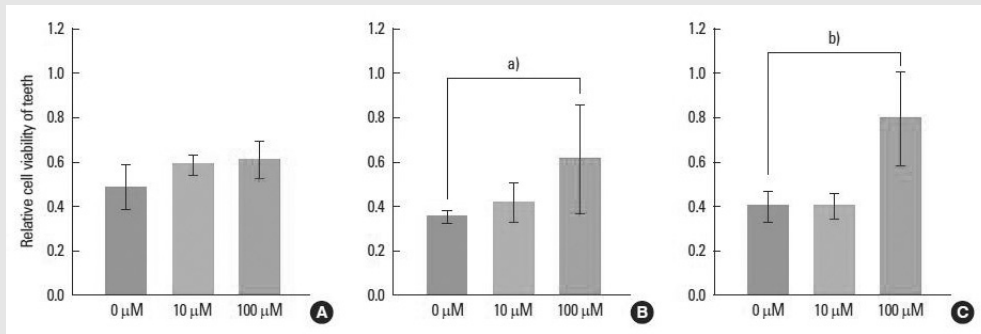


Fig. 6. Differences in cell viability according to the concentration of (-)-Epigallocatechin-3-gallate(EGCG). 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assays were performed for the extracted teeth after periods1(A),2(B) and 3(C). The teeth were treated with 0,10, or 100 μM EGCG for 4,8, or 12 days depending on the period. a) Statistically significant difference between those teeth treated with 0 and 100 μM EGCG(P<0.1). b) Statistically significant between those treated with 0 and 100 μM EGCG(P<0.05).

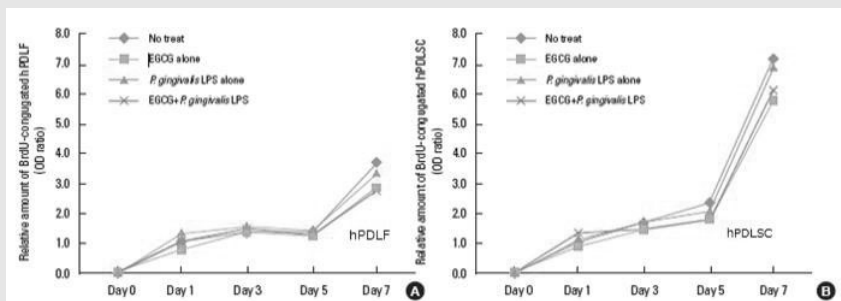


Fig. 7. Proliferative changes of human periodontal ligament fibroblasts (hPDLFs) and human periodontal ligament stem cells (hPDLSCs) treated with Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide(LPS) and (-)-Epigallocatechin-3-gallate(EGCG). In general, hPDLFs(A) and hPDLSCs(B) proliferated continuously during the experimental period, with an exponential increase in cell growth being observed from days 5 to 7.

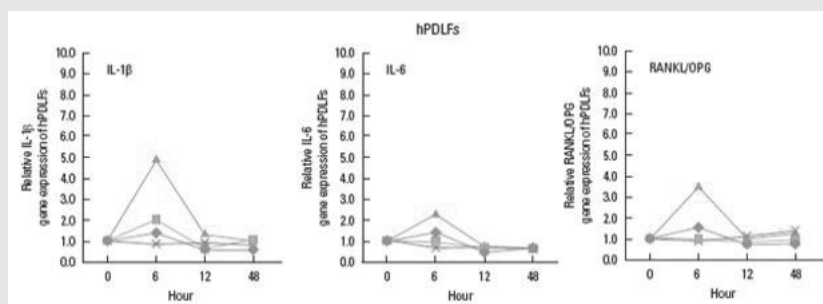


Fig. 8. Effects of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide(LPS) and/or (-)-Epigallocatechin-3-gallate(EGCG) on inflammatory and osteoclastnecrosis-related mRNA expressions. EGCG-treated cells(human periodontal ligament fibroblasts [hPDLFs] and human periodontal ligament stem cells [hPDLSCs]) showed similar or lower gene expressions than those cells of 'No treat'. The gene expressions of '*P. gingivalis* LPS' alone were highly increased at 6 hours, but those increased gene expressions were down-regulated in 'EGCG+ *P. gingivalis* LPS' group by the additional treatment of EGCG.

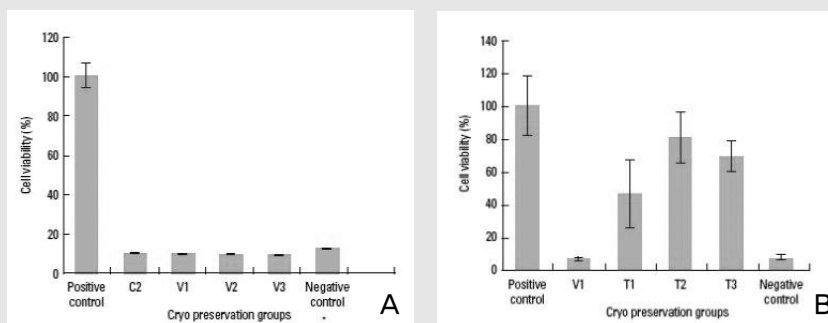


Fig. 9. A) The viability of periodontal ligament cells by different storage conditions in step 1. Mean values normalized using the positive control. Columns and bars represent the mean of three independent experiments \pm SD. C2 : 100% conventional media, -20°C freezer stored, V1 : 100% vitrification media, -196°C Liquid nitrogen stored, V2 : 100% vitrification media, -20°C freezer stored, V3 : 25% of vitrification media added at 20°C kept for 20 minutes followed by adding 100% vitrification media at 4°C , -96°C Liquid nitrogen stored, Negative control: 100% conventional media, -4°C refrigerator stored. B) The viability of periodontal ligament cells after 4-weekpreservation in step 2. Mean values normalized using the positive control. Columns and bars represent the mean of three independent experiments \pm SD. The T2 group shows around 80% cell viability compared to the positive control. There is no statistically significant difference in the viability of T2 group cells stored for 2 weeks vs. 4 weeks ($P>0.05$). Viability of T3 group cells had reduced in 4-week storage compared to 2-week storage, and the reduction was statistically significant ($P<0.05$). T1 : 75% vitrification media + 25% F-media, T2 : 50% vitrification media + 50% F-media, T3 : 25% vitrification media + 75% F-media

후 3~7일 사이에 가장 높았으며 발치 10일에 가장 낮은 수치를 나타내었다(Table 4, Figure 10).

파골세포의 형성 및 MMPs의 발현에 미치는 EGCG의 영향에 대해 조사한 연구에서 20 μM 농도의 EGCG에서 파골세포 형성은 억제되었고 *P. gingivalis*에 의해 촉진되는 MMP-9 mRNA의 발현 또한 감소하였다. 반면 MMP-2,13은 *P. gingiv*

*alis*와 EGCG의 영향을 받지 않았다(Figure 11).

Ligature ligation을 통해 치주염을 유발한 쥐에서 EGCG 경구 투여 초기에 IL-6 발현이 감소하였고 투여 4주군에서 TNF의 발현도 감소하였다. EGCG를 처리한 군에서는 백악법랑경계에서 치조골에 이르는 거리에서 긴 접합 상피와 콜라겐의 파괴가 감소한 반면, 대조군에서는 치주염 유발인자가 제거

Table 4. Staining intensity of tested cytokines in the extraction socket of the control group

| Cytokines | Day 0 | Day 3 | Day 7 | Day 10 |
|---------------|-------|-------|-------|--------|
| IL-6 | ++ | +++ | ++ | + |
| TNF- α | ++ | +++ | ++ | + |

IL-6 : interleukin-6, TNF- α : tumor necrosis factor- α

Subjective scale : 0, no staining ; +, weak staining ; ++, moderate staining ; +++, strong staining ; + + + +, very strong staining

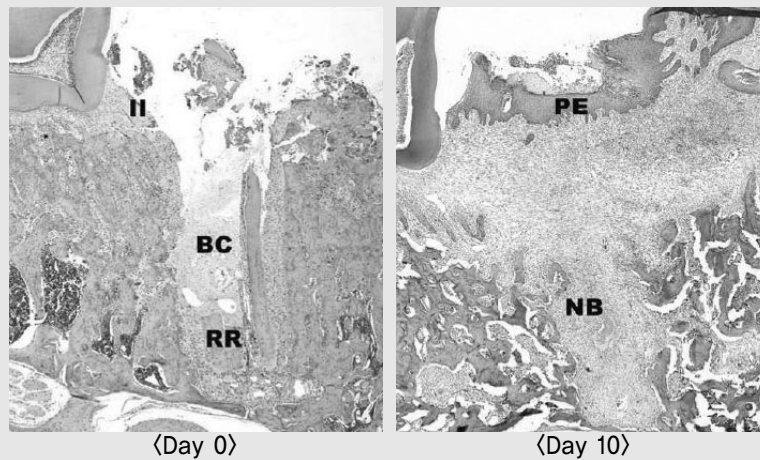


Fig. 10. Histologic view of the extraction socket at 0 and 10 days after tooth extraction in the control group. (H&E, x 40 ; scale bar, 1 mm) <day 0> II, inflammatory infiltrates, BC; blood coagulum, RR: root rest. <day 10> the proliferated epithelium(PE) from the sides of the wound to cover the wound surface except in the central the region and the newly formed bone(NB) regenerated next to the alveolar wall within the socket. II, inflammatory infiltrates.

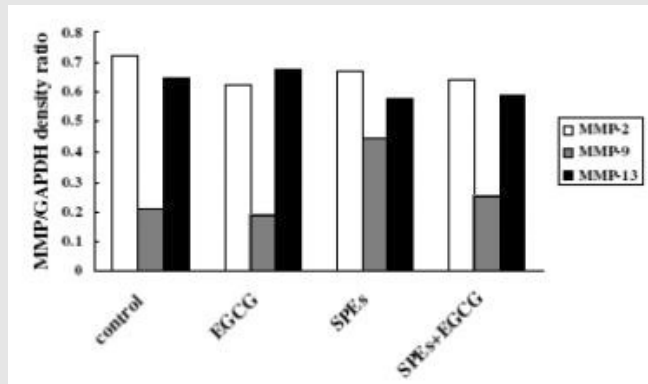


Fig. 11. The effect of sonicated *Porphyromonas gingivalis* extracts and (-)-Epigallocatechin-3-gallate(EGCG) on the expression of matrix metalloproteinases(MMP)-2, -9 and -13 mRNA. Primary osteoblastic cells were treated for 24-h with (1) no treatment, (2) 20 μ M of EGCG alone, (3) 1 μ g/ml of sonicated *P. gingivalis* extracts (SPEs) alone and (4) 20 μ M of EGCG + 1 μ g/ml of SPEs. The expression of MMP-2, -9 and -13 mRNA was analyzed by RT-PCR. The data are representative of duplicate experiments

된 이후에도 소실된 골은 회복되지 않았다. 또한 대조군과 EGCG 투여군 간에 IL-6의 발현 감소는 치조골에서보다 결합 조직에서 두드러졌으며 TNF와 IL-6의 감소는 파골세포의 수와 활성을 감소시켜 골소실을 감소시켰다(Figure 12).

IV. 고찰

본 논문에서는 고도의 치주염으로 치주 조직의 파괴가 일어난 치아의 치료를 위해 지연된 의도적 재식술을 시행하였을 때의 치료 결과 및 치아 보관 및 치주 조직의 치유에 영향을 미치는 EGCG의 항염 효능에

관한 연구를 진행하였다.

1. 지연된 의도적 재식 시행 후 임상 및 방사선학적 평가 및 성공률의 평가

지연된 의도적 재식 시행 후 3~21개월의 치료 경과 관찰에서 실패군에서는 치근면 주위로 명확한 방사선 투과성 선이 시간에 따라 확장되고 두꺼워져 결국 발치하게 되었다. 이는 치근면 치주인대 조직의 생활력 소실에 의해 재식 후 치조골에서의 안정성 상실 및 발치와 내 잔존한 염증 조직에 의한 감염에 의한 것으로 보인다. Nasjilet(1975)등¹⁸⁾이 보고한 바와 같이 재식을 지연시키는 동안 치근면 치주인대세포의 생활력

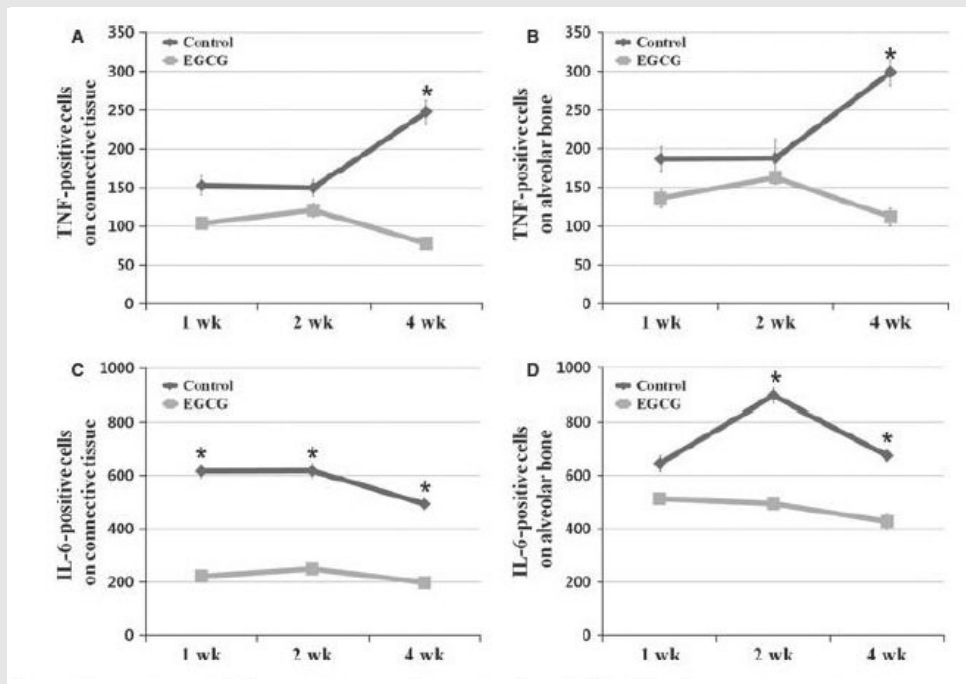


Fig. 12. Quantitative analysis of TNF and IL-6 immunostaining. Number of: (A) TNF-positive cells in connective tissue area; (B) TNF-positive cells in alveolar bone area; (C) IL-6-positive cells in connective tissue area; and (D) IL-6-positive cells in alveolar bone area. * $p < 0.05$ compared to control group. EGCG, (-)-Epigallocatechin-3-gallate; IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor.

보존이 재식 후 치주 조직 치유에 핵심적임을 알 수 있었고 더불어 발치와의 염증 해소가 지연 재식에 있어서 중요함을 알 수 있었다.

생존군에서는 특별한 방사선학적 증상이 나타나지 않았고 골소실량은 감소하였으며 골생성량은 지속적으로 유지되었다. 성공군에서 볼 수 있는 빠르고 충분한 골생성은 지연된 의도적 재식의 장점이며 누적 생존율 66.4%를 통해 재감염에 의한 실패 가능성에도 불구하고 치주염에 의해 발치가 적응증인 치아의 치료에 지연된 의도적 재식이 효용성이 있음을 확인할 수 있었다.

2. 치근표면의 치주인대의 생활력 보존과 염증 수준 최소화에 대한 연구

보관 매질로서 EGCG의 효능에 관한 여러 연구에 따르면 조골세포 및 섬유모세포 등의 세포에서 EGCG 적용시 세포 생존력, 생화학적 성질, 구조 및 기능을 3개월까지 유지할 수 있다고 보고된 바 있다¹⁹⁻²¹⁾. EGCG의 polyphenol 성분이 가진 phenol 구조가 산소 반응기의 자유 라디칼에 의한 산화반응을 중화시켜 세포막 및 DNA에 작용하여 세포 주기를 조절하는 기전을 통해 항산화 작용을 하는 것이 알려져 있다²²⁾. 본 연구에서는 100 μ M의 EGCG를 발치된 치아에 적용하였을 때 치주인대세포 생활력을 보존하여 되어 안정적인 상태로 유지시킬 수 있음을 확인하였다. 이를 바탕으로 고농도의 EGCG를 치아 보관 매질로 사용하였을 때 14일 이상 보관할 수 있을 것으로 생각된다.

HPDLFs 및 hPDLSCs에 미치는 EGCG의 영향에 관한 실험에서 MTT assay를 이용한 *P. gingivalis* 유래 LPS와 EGCG의 세포 독성 실험에서 50, 100 μ M의 EGCG와 50 μ M/mL *P. gingivalis* LPS 적용군에서 hPDLFs 및 hPDLSCs에서의 세포 독성 효과가 나타났으나

BrdU assay를 이용한 실험에서 EGCG에서는 세포 독성이 관찰되지 않았다. HPDLSCs는 hPDLFs에 비해 세포 증식력이 높았으며 EGCG는 세포 증식 및 성장을 억제하였다. 염증 매개 물질의 변화 실험에서 *P. gingivalis* 적용에 의해 유도하는 파골세포 형성을 매개하는 IL-1 β , IL-6, TNF- α , RANKL/OPG 비율이 증가한 반면 EGCG를 적용시켰을 때 감소하였는데 이에서 치주염 유발 세균인 *P. gingivalis* LPS에 대해 EGCG가 가진 항염 효과를 확인할 수 있다. 이러한 양상은 hPDLFs에서 보다 hPDLSCs에서 뚜렷했는데 이는 치주인대줄기세포가 가진 높은 세포 분화능 때문으로 생각되나 정확한 기전에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것이다.

추가적으로 발치된 치아의 보관 매질의 온도에 관한 실험에서 Suragi C.Dissanayake(2010)⁴⁾은 -196 °C에서 치주인대 세포 생존력 보존이 가장 잘 되는 것을 볼 수 있었다. 따라서 저온 매질을 사용하는 것 또한 세포 보존에 효과가 있을 것으로 생각된다.

3. 염증성 발치와의 처치에 대한 연구

염증성 발치와의 치유 기간에 대한 선행 연구가 시행되었다. 염증에 이환된 발치와에서 염증 표지인자인 IL-6 및 TNF- α 의 수치는 발치 3일경까지 증가하였고 이후 감소하여 발치 10일경에 가장 낮은 수치를 나타내었다. 발치와의 염증 상태가 발치 초기에는 더 증가하다가 이후 감소하여 시간 경과에 따라 발치와가 치유됨을 알 수 있다. 염증 세포가 침윤되어 치유가 일어나지 않은 발치와에 치아를 재식할 경우 재식된 치아의 안정성을 떨어뜨리며 재감염의 가능성이 높아질 수 있으므로 치아를 재식하기까지 1-2주간의 지연기간을 가지는 것이 발치와의 치유를 유도하여 재식 성공률을 높일 수 있음을 확인할 수 있었다.

EGCG의 치주 조직에서의 항염 작용에 대한 실험에서 Yun(2004)⁶⁾은 EGCG가 *P. gingivalis*에

의해 유도되는 MMP-9 mRNA 의 발현을 억제함을 확인하였다. 또한 치주염이 유발된 쥐에 EGCG를 경구 투여하였을 때 결합 조직 및 치조골에서의 TNF와 IL-6 생성이 저해되었다. MMPs는 collagenase 및 gelatinase을 발현시키고 활성화 시키는 유전자로서 *P. gingivalis*에 의해 유도된다. TNF는 염증 유발 매개 인자로서 MMP의 발현을 유도하여 콜라겐 교원질을 파괴시키고 파골세포의 활성을 증가시킴으로써 치주 조직의 파괴를 유도한다. 또한 IL-6는 파골세포 생성과 활성을 증가시킴으로써 골흡수를 유도하는데 EGCG가 *P. gingivalis* 및 TNF, IL-6의 활성을 저해함으로써 MMP의 발현 및 파골세포의 형성 및 활성을 억제하여 치조골의 흡수를 저해하는 효과를 가짐을 알 수 있었다. 또한 정확한 기전은 밝혀지지 않았지만 EGCG가 파골세포 유사세포의 세포 자멸을 유도함으로써 골 흡수를 억제하는 TRAP staining에 의해 관찰되었다. 종합적으로 EGCG가 치주 조직에서 골흡수를 유도하는 염증 인자들에 대한 억제작용을 함으로써 염증성 치주 조직 치유에 효과적일 것으로 사료된다. *P. gingivalis*가 파골세포의 형성을 유도하는지의 여부는 아직 정확히 밝혀지지 않아 추가적인 연구가 필요할 것이다.

V. 결론

지연된 의도적 재식은 고도의 치주염에 의해 가망 없는 치아로 진단된 치아를 유지할 수 있는 효과적인 대안으로 제시될 수 있다. 지연된 의도적 재식이 성공하기 위해 고려된 발치와의 치유 및 치아 보관 매질의 선택하기 위해 시행된 실험에서 다음과 같은 결과를 얻을 수 있다.

1. 지연된 의도적 재식 시 고도의 치주염에 이환된 발치와의 치유가 일어나 재식하기에 적합한 시기는 발치 후 1~2주이다.
2. EGCG는 치주인대 생활력 보존에 유리한 환경을 제공한다.
3. EGCG는 염증세포의 성장 및 증식을 억제하고 파골세포의 형성을 억제하여 치아 및 치주 조직의 파괴를 방지하고 재생을 촉진한다.
4. 저온 매질 보관은 세포 보존에 효과적이다.

이상의 결과를 바탕으로 지연된 의도적 재식의 우수한 치아 및 치주 조직 보존 및 재생 효과를 확인할 수 있었다. 제한된 연구 결과이지만 발치를 요하는 치아의 치료를 대신할 방법으로 이용될 수 있을 것이며 추가적인 연구가 필요할 것이다.

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(A101578).

참 고 문 헌

1. Machtei EE, Hausmann E, Dunford R, et al. Longitudinal study of predictive factors for periodontal disease and tooth loss. *J Clin Periodontol* 1999;26(6):374-380
2. Lee EU, Lim HC, Lee JS, et al. Delayed intentional replantation of periodontally hopeless teeth: a retrospective study. *J Periodontal Implant Sci* 2014;44(1):13-19
3. Wang J, Jiang Y, Chen W, et al. Bacterial flora and extraradicular biofilm associated with the apical segment of teeth with post-treatment apical periodontitis. *J Endod* 2012;38(7):954-959
4. Siqueira JF, Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J* 2001;34(1):1-10
5. Lu DP. Intentional replantation of periodontally involved and endodontically mistreated tooth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1986;61(5):508-513
6. Demiralp B, Nohutcu RM, Tepe DI, Eratalay K. Intentional replantation for periodontally involved hopeless teeth. *Dent Traumatol* 2003;19(1):45-51
7. Baltacıoğlu E, Tasdemir T, Yuva P, et al. Intentional replantation of periodontally hopeless teeth using a combination of enamel matrix derivative and demineralized freeze-dried bone allograft. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2011;31(1):75-81
8. Nagappa G, Aspalli S, Devanoorkar A, et al. Intentional replantation of periodontally compromised hopeless tooth. *J Indian Soc Periodontol* 2013;17(5):665-669
9. Kratchman S. Intentional replantation. *Dent Clin North Am* 1997;41(3):603-617
10. Yang CS, Wang ZY. Tea and cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993;85(13):1038-1049
11. Krahwinkel T, Willershausen B. The effect of sugar-free green tea chew candies on the degree of inflammation of the gingiva. *Eur J Med Res* 2000;5(11):463-467
12. Jung IH, Yun JH, Cho AR, et al. Effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on maintaining the periodontal ligament cell viability of avulsed teeth: a preliminary study. *J Periodontal Implant Sci* 2011;41(1):10-16
13. Jung IH, Lee DE, Yun JH, et al. Anti-inflammatory effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-stimulated fibroblasts and stem cells derived from human periodontal ligament. *J Periodontal Implant Sci* 2012;42(6):185-195
14. Dissanayake SC, Che ZM, Choi SH, et al. Evaluation of vitrification for cryopreservation of teeth. *J Periodontal Implant Sci* 2010;40(3):111-118
15. Kim DJ, Cha JK, Yang C, et al. Changes in periodontium after extraction of a periodontally-involved tooth in rats. *J Periodontal Implant Sci* 2012;42(5):158-165
16. Yun JH, Pang EK, Kim CS, et al. Inhibitory effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate on the expression of matrix metalloproteinase-9 and on the formation of osteoclasts. *J Periodontal Res* 2004;39(5):300-307
17. Cho AR, Kim JH, Lee DE, et al. The effect of orally administered epigallocatechin-3-gallate on ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res* 2013;48(6):781-789
18. Nasjleti CE, Castelli WA, Blankenship JR. The storage of teeth before reimplantation in monkeys. A histologic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1975;39(1):20-29
19. Han DW, Park YH, Kim JK, et al. Long-term preservation of human saphenous vein by green tea polyphenol under physiological conditions. *Tissue Eng* 2005;11(7-8):1054-1064
20. Hyon SH. A non-frozen living tissue bank for allotransplantation using green tea polyphenols. *Yonsei Med J* 2004;45(6):1025-1034
21. Han DW, Hyon SH, Park JC, et al. Non-frozen preservation of mammalian tissue using green tea polyphenolic compounds. *Biomed Mater* 2006;1(1):R18-29
22. Bae JY, Kanamune J, Han DW, et al. Reversible

참 고 문 헌

regulation of cell cycle-related genes by epigallocatechin gallate for hibernation of neonatal

human tarsal fibroblasts. Cell Transplant 2009;18(4):459-469