

# Collagenase와 esterase가 상아질 접착강도와 nanoleakage에 미치는 영향

정영정 · 한세현 · 김종철 · 이상훈 · 김정욱 · 김영재 · 장기택

서울대학교 치과대학 소아치과학교실 및 치학연구소

## 국문초록

본 연구는 상아질 접착계면에서 collagenase와 esterase가 접착강도와 극미세누출에 미치는 영향을 살펴보기 위해 시행하였다. 발치된 치아의 교합면 상아질에 Single Bond 2(SB)와 Clearfil SE bond(SE)를 사용하여 상아질-레진 접착시편을 제작하고, 시편을 인산완충용액(PBS)에 24시간(I), 또는 PBS(II), collagenase 용액(III), esterase 용액(IV)에 4주간 보관한 후 질산은 용액으로 염색하였다. 시편의 미세인장접착강도( $\mu$ TBS)와 질산은 침투 면적을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. SB군의 접착강도가 II ~ IV군에서 SE군에 비해 낮은 값을 나타내었다( $p < 0.05$ ). SB군은 II ~ IV군의 접착강도가 I군에 비해 낮은 값을 보였으나( $p < 0.05$ ), SE군의 접착강도는 I ~ IV군간에 차이를 보이지 않았다( $p > 0.05$ ).
2. SB군의 질산은 침투 면적이 SE군에 비해 높았으며( $p < 0.05$ ), SB군과 SE군에서 질산은 침투 면적은 I ~ IV군간에 차이를 보이지 않았다( $p > 0.05$ ).
3. 접착강도와 질산은 침투 면적은 SE군의 I, II, III군에서 음의 상관관계를 보였다( $p < 0.05$ ).

**주요어** : Collagenase, Esterase, 접착강도, 극미세누출

## I. 서 론

상아질과 혼성층 사이에 변연 간극(marginal gap)이 없는 경우에도 혼성층이나 혼성층 하방에 작은 이온이나 분자가 침투하는 현상이 관찰되는데, Sano 등<sup>1,2)</sup>은 이를 극미세누출(nanoleakage)이라고 하였다. 미세누출(microleakage)이 수복물 계면에 작용하는 여러 응력으로 인해 발생하는 복합레진-상아질 계면의 접착 실패이고, 수  $\mu$ m 크기의 변연 간극을 유발하여 미생물의 이동 경로를 제공하는데 비해, 극미세누출은 접착 실패의 지표로 볼 수 없고 그 크기가 50 nm 이하로 작아 세균은 침투할 수 없다<sup>3)</sup>.

극미세누출의 관찰에는 계면 내로 잘 침투하면서 적절한 대조도를 제공하는 질산은( $AgNO_3$ ) 염색이 주로 사용된다<sup>4-6)</sup>. 은 이온은 유기물, 특히 교원섬유가 있을 때 쉽게 금속은으로 환원될 수 있어, 노출된 교원섬유가 은 입자에 의해 강하게 염색된

다. 은 결정은 3 ~ 5 nm의 직경으로, 장시간 처리시 작은 결정이 융합하여 직경 15 ~ 50 nm까지 커질 수 있다<sup>7)</sup>.

극미세누출 현상은 상아질-레진 계면의 모든 부분, 즉 완전히 또는 부분적으로 탈회된 상아질층, 혼성층, 접착레진층 모두에서 관찰되며, 여러 가지 원인에 의해 나타날 수 있다. 임상적으로 극미세누출의 부정적인 효과에 대한 근거는 아직까지 거의 없지만, 산이나 단백질 분해 효소와 같은 세균 대사산물의 이동 경로로 작용할 수 있어<sup>8)</sup>, 상아질 접착이 약화되는 환경을 제공할 수 있을 것으로 생각된다<sup>9-11)</sup>.

최근 구강 내 효소가 레진 수복물에 미치는 영향에 대한 관심이 증가하고 있다. 여러 연구에서 esterase가 Bis-GMA, TEGDMA 등의 레진 성분에 대한 분해작용을 나타냄이 보고되었으며<sup>12,13)</sup>, Bis-GMA와 같은 레진 성분이 esterase의 활성을 증가시켜 레진 분해가 더욱 촉진될 수 있다는 보고도 있었다<sup>14)</sup>.

구강 내 상아질 접착 수복물에 대한 연구에서 혼성층을 구성

교신저자 : 장 기 택

서울시 종로구 연건동 275-1 / 서울대학교 치과대학 소아치과학교실 / Tel: 02-2072-2682 / E-mail: jangkt@snu.ac.kr

원고접수일: 2008년 2월 4일 / 원고최종수정일: 2008년 4월 23일 / 원고채택일: 2008년 5월 6일

하는 교원섬유의 분해가 관찰되었는데<sup>15)</sup>, 교원섬유는 치태 내 세균과 타액선, 혈액구에서 분비되는 단백질 분해효소나 상아질 내에 존재하는 matrix metalloproteinases(MMPs)에 의해서 분해될 수 있다<sup>16-18)</sup>. MMPs는 상아질 접착과정에서의 여러 요인 즉, 기계적 자극<sup>19,20)</sup>, 탈회로 인한 수산화인회석 결정의 제거<sup>21)</sup>, 레진 단량체나 3차 아민과 같은 상아질 접착제 성분<sup>22)</sup> 등에 의해 활성화될 수 있다.

이에 본 연구는 두 종류의 상아질 접착제를 사용하였을 때 상아질 접착계면에서 collagenase와 esterase가 접착강도와 극미세누출에 미치는 영향을 살펴보기 위해 상아질-레진 접착시편을 인산완충용액(PBS)에 24시간, 또는 PBS, collagenase 용액, esterase 용액에 4주간 보관한 후 미세인장접착강도와 질산은 침투 면적을 측정, 비교하고 투과전자현미경으로 접착계면을 관찰하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 실험재료(Materials)

최근에 교정 치료를 위해 발거된 소구치 중 우식이 없고 수복물이 없는 건전한 치아를 수집하여 실험에 사용하였다. 상아질 접착제로 산부식-수세 접착제인 Adper™ Single Bond 2(3M ESPE, USA)와 자가부식 접착제인 Clearfil SE bond(Kuraray, Japan)를 사용하였고(Table 1), 복합레진은 Filtek Supreme Universal A2 shade(3M ESPE, USA)를 사용하였다. 산부식제는 35% 인산(Scotchbond™ Etchant, 3M ESPE, USA)을 사용하였고, 광중합기는 Curing light 2500(3M Dental Products, USA: 500 mW/cm<sup>2</sup>)을 사용하였다. 상아질 접착 시편의 보관액으로는 인산완충용액(phosphate buffer solution: PBS), collagenase 용액, esterase 용액을 사용하였는데, PBS는 phosphate buffer 분말(P3744, Sigma, USA)을 증류수에 용해시켜 제작하였으며 0.0027M 염화칼슘, 0.137M 염화나트륨을 포함한다(25℃, pH 7.4).

Collagenase 용액은 type I collagenase(C0130, Sigma,

USA) 분말을 PBS에 0.1%의 농도로 용해시켜 제작하였고, esterase 용액은 porcine liver esterase(E3019, Sigma, USA) 분말을 PBS에 4 U/mL의 농도로 용해시켜 제작하였으며, 사용 직전까지 -20℃에서 보관하였다. 극미세누출을 관찰하기 위해 사용한 질산은 용액의 제작은 25 g의 질산은 결정(Acros Organics, USA)을 증류수 25 mL에 용해시킨 후, 농축(28%) 암모니아수(Duksan Pure Chemical Co., Korea)를 첨가하여 은 입자가 암모늄 이온과 반응하여 디아민 은 이온([Ag(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>) 착체(complex)를 형성하면서 용액이 검게 변하였다가 다시 투명해질 때까지 적정하였다. 이 용액을 50 mL이 되도록 증류수로 희석하여 만든 50 wt% 암모늄 질산은 용액(pH 9.5)을 사용하였다.

### 2. 시편 제작

교정 치료를 위해 발거된 우식이 없고 수복물이 없는 건전한 소구치 60개를 수집하여 치아 표면의 이물질을 제거하고, 4℃의 0.5% Chloramine-T 용액에 보관하였다. 미리 제작된 아크릴 블록에 교정용 아크릴릭 레진을 이용하여 소구치의 치관이 노출되도록 매몰하고, 레진이 충분히 경화되도록 1시간 동안 실온의 수조에 보관하였다. 실험은 Fig. 1과 같이 진행하였고, 각 군의 실험 조건은 Table 2와 같다.

저속 diamond saw(Isomet, Buehler, USA)를 이용하여 교합면 법랑질을 제거하고, 연마기(Struers Dap-V, Struers, Denmark)에서 노출된 상아질 표면을 주수하에 320 grit 실리콘 카바이드 페이퍼로 연마하여 도말층으로 덮인 접착면을 재현하였다. 임의로 두 군(SB군, SE군)으로 나누어 제조사의 지시대로 상아질 접착제를 적용하고 광중합하였다(Table 1). 복합레진을 최종 두께 4 mm가 되도록 3회에 나누어 적층 충전하고, 각 층은 20초간 광중합하였다. 중합이 완료된 후 치아를 24시간 실온의 수조에 보관한 후, 단면적 0.9 mm × 0.9 mm, 길이 6 ~ 8 mm인 직육면체가 되도록 저속 diamond saw를 이용하여 주수하에 절단하고, 24시간 동안 상온의 PBS에 보관하였다.

**Table 1.** Dentin adhesives used in the study

Adhesives	Lot #	Composition	Application
Single Bond 2	5CM	BIS-GMA, HEMA, dimethacrylates, polyalkenoic acid copolymer, initiator, ethanol/water, camphoroquinone, 10%(wt) 5nm silica	Etch for 15s, rinse for 15s, blot dry with Kimwipes, apply 2 consecutive coats, gently air dry, light cure for 10s
Clearfil SE bond	Primer: 00581A Bond: 00823A	Primer: MDP, HEMA, hydrophilic dimethacrylate, photoinitiator, water Bond: MDP, HEMA, hydrophilic dimethacrylate, BIS-GMA, microfiller	Apply primer for 20s, blow air gently, apply bonding agent, light cure for 10s

3. 시편의 보관과 질산은 염색

각 군의 상아질 접착 시편을 4군으로 나누어, I군은 상온의 PBS에 24시간 보관하고, II군은 PBS, III군은 collagenase 용액, IV군은 esterase 용액에 4주간(37℃) 보관하였으며, PBS와 효소 용액은 2일마다 교환하였다. 각 군의 시효 처리 후 시편을 식염수로 세척하고, 상온의 PBS에서 24시간 보관하였다. 시편의 접착계면 주변 1 mm를 제외하고 2겹의 nail varnish를 도포한 후 10분간 증류수에 보관하였다. 시편을 50 wt% 압모늄 질산은 용액에 침지하여 암실에서 24시간 보관 후, 흐르는 물에서 남아있는 과잉의 질산은을 수세하고, 형광등 아래에서 8시간 동안 현상액에 담가 은 이온을 금속 은 입자로 환원시켰다. 50% 압모늄 질산은 용액에 의한 염색은 혼성층 및 접착층 내에 물이 포함되어 있거나 친수성 고분자가 있는 부위를 더 어민 은 이온 착체가 쉽게 침투할 수 있는 성질을 이용하는 것이다.

4. 미세인장접착강도와 질산은 침투 면적의 측정

TEM 관찰을 위한 시편을 남겨두고 각 군의 나머지 시편을 cyanoacrylate glue로 홀더에 고정하고, 만능시험기(LF-PLUS, Lloyd Instrument, UK)를 이용하여 1분당 1.0 mm의 cross-head speed로 미세인장접착강도를 측정하였다. 상아질 쪽 파절면을 광학현미경(SZ 6045, Olympus Optical Co., Japan)에서 50배로 확대하여 CCD(Infinity 2, Lumenera, Canada)를 통해 디지털 이미지를 얻었다. 디지털 이미지를 흑백 이미지로 전환한 후, 이미지 분석 프로그램(i solution, IMT technology, Canada)으로 접착계면에서 은 침투 면적을 전체 접착 면적의 백분율로 정량화하였다.

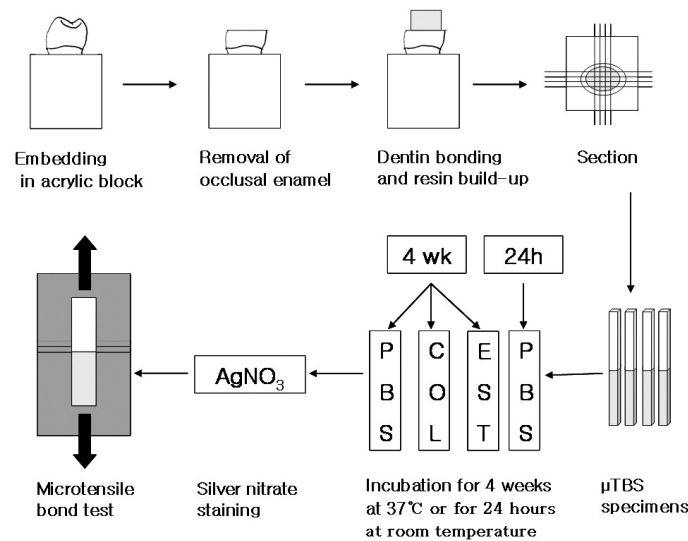


Fig. 1. Experimental design of the study. PBS: phosphate buffer solution, COL: 0.1% collagenase solution, EST: 4 U/mL esterase solution, AgNO<sub>3</sub>: 50 wt% ammoniacal silver nitrate solution.

Table 2. Experimental groups in the study

Group	Adhesive	Storage	Group	Adhesive	Storage
SB I	Single Bond 2	PBS, 24h	SE I	Clearfil SE bond	PBS, 24h
SB II	Single Bond 2	PBS, 4wk	SE II	Clearfil SE bond	PBS, 4wk
SB III	Single Bond 2	Collagenase, 4wk	SE III	Clearfil SE bond	Collagenase, 4wk
SB IV	Single Bond 2	Esterase, 4wk	SE IV	Clearfil SE bond	Esterase, 4wk

5. 투과전자현미경(Transmission electron microscopy; TEM)

TEM 관찰을 위한 시편은 조직 본래의 구조적 연속성을 보존하기 위해 탈회과정 없이 2.5% glutaraldehyde(in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.3)에서 1시간 동안 고정하고, 0.1 M cacodylate buffer를 사용하여 10분간 2회 수세하였다. 고정된 시편을 에탄올 용액(70%, 90%, 95%, 100%, 100%)에서 각각 90분간 탈수시킨 후, 접착제면의 주행방향에 맞춰 에폭시 레진(Epon812, SPI-Chem, USA)으로 60℃에서 12시간 동안 포매하였다. Diamond knife(Diatome, Diatome AG, Switzerland)가 부착된 Ultramicrotome(Leica Ultracut, Leica, Austria)으로 두께 100 nm(ultrathin section)의 절편을 제작하여 200-mesh copper grid에 모았다. 부가적인 염색 없이 80kV의 투과전자현미경(JEM -1200EXII, JEOL, Japan)으로 관찰하였다.

6. 통계 분석(Statistical analysis)

접착제, 보관 방법에 따른 미세인장접착강도와 은 침투 면적의 차이와, 각 변수 요인간의 상호작용을 평가하기 위해 SPSS 12.0K를 이용하여 two-way ANOVA, 사후검정으로 Tukey의 HSD 검정을 시행하였다. 미세인장접착강도와 질산은 침투 면적 간의 상관관계를 평가하기 위해 Spearman 상관분석을 시행하였다. 통계적 유의성은 유의수준 0.05에서 평가하였다.

Ⅲ. 연구성적

1. 미세인장접착강도(Microtensile bond strength:  $\mu$ TBS)

각 군의 미세인장접착강도의 평균과 표준편차는 Table 3에 요약하였으며, 시편 제작 중 또는 접착강도 측정 전에 파절이 나타난 경우와, 파절이 레진이나 상아질에서 관찰된 응집성 실패의 경우는 이 통계 분석에 포함하지 않았다. 2-way ANOVA에서 접착제 요인과 보관 방법 간의 상호작용은 통계적으로 유의하였으며, 이는 각각의 요인이 서로 다른 요인에 따른 미세인장접착강도에 영향을 주었음을 의미한다. II ~ IV군에서 SE군의  $\mu$ TBS가 SB군에 비해 높은 값을 나타내었다( $p < 0.05$ ).

SB군의  $\mu$ TBS는 I군에 비해 II ~ IV군에서 낮은 값을 보였으나( $p < 0.05$ ), II, III, IV군간에는 차이를 보이지 않았다( $p > 0.05$ ). SE군의  $\mu$ TBS는 모든 군에서 차이를 보이지 않았다( $p > 0.05$ ).

2. 질산은 침투 면적

각 군의 질산은 침투 면적, 질산은 침투 면적과 미세인장접착강도와의 상관계수는 Table 4에 요약하였으며, 시편 제작 중 또는 접착강도 측정 전에 접착 실패가 나타난 경우와, 접착 파절이 레진이나 상아질에서 관찰된 응집성 실패의 경우는 이 통계 분석에 포함하지 않았다. 2-way ANOVA에서 접착제 요인과 보관 방법 간의 상호작용은 통계적으로 유의하지 않았다.

**Table 3.** Microtensile bond strength(MPa)

Group	N	$\mu$ TBS	Group	N	$\mu$ TBS
SB I	35	44.92 $\pm$ 13.74 <sup>a</sup>	SE I	33	46.87 $\pm$ 14.13 <sup>a</sup>
SB II	35	27.70 $\pm$ 17.14 <sup>b</sup>	SE II	32	44.04 $\pm$ 17.23 <sup>a</sup>
SB III	31	24.88 $\pm$ 14.16 <sup>b</sup>	SE III	34	43.34 $\pm$ 21.80 <sup>a</sup>
SB IV	35	27.70 $\pm$ 19.86 <sup>b</sup>	SE IV	34	41.68 $\pm$ 18.34 <sup>a</sup>

Groups with same superscript letters in the same adhesive groups indicate that the values are not statistically different( $p > 0.05$ ).

**Table 4.** Silver penetration area(%) and correlation coefficient(R) between microtensile bond strength and silver penetration area

Group	Silver penetration	R	P-value	Group	Silver penetration	R	P-value
SB I	63.10 $\pm$ 8.34	-0.183	0.293	SE I	55.78 $\pm$ 11.30	-0.566	0.001
SB II	60.99 $\pm$ 10.25	-0.233	0.178	SE II	50.66 $\pm$ 11.86	-0.429	0.014
SB III	58.65 $\pm$ 10.68	-0.059	0.753	SE III	51.94 $\pm$ 12.77	-0.390	0.023
SB IV	56.70 $\pm$ 10.58	-0.016	0.927	SE IV	50.38 $\pm$ 10.89	-0.139	0.431

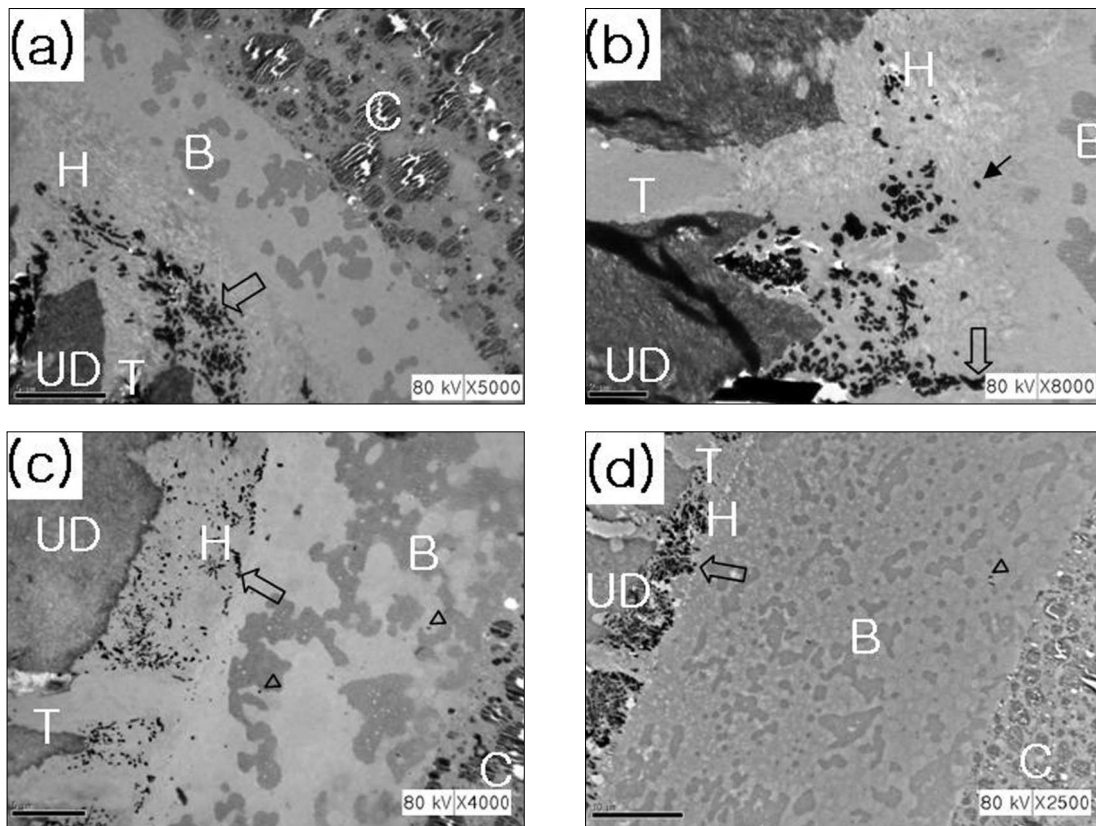
Groups with same superscript letters in the same adhesive groups indicate that the values are not statistically different( $p > 0.05$ ).

SB군과 SE군 모두에서 보관 방법에 따른 질산은 침투 면적의 차이는 유의하지 않았으나( $p>0.05$ ), I ~ IV군에서 SB군의 질산은 침투 면적이 SE군에 비해 높게 나타났다( $p<0.05$ ). 미세 인장접착강도와 질산은 침투 면적의 상관관계는 SB군에서 유의하지 않았으나( $p>0.05$ ), SE군의 I, II, III군에서는 유의한 음의 상관관계를 보였다( $p<0.05$ ).

### 3. 투과전자현미경 관찰

TEM으로 접착계면을 관찰하였을 때, 혼성층 내로의 은입자 침투가 고르지 않은 양상을 보여 어떤 부분에서는 많은 양의 은입자 침투가 관찰되는 반면, 은입자가 전혀 침투하지 않은 부분도 관찰되었다. 산부식-수세 접착제를 사용한 SB군에서는 4

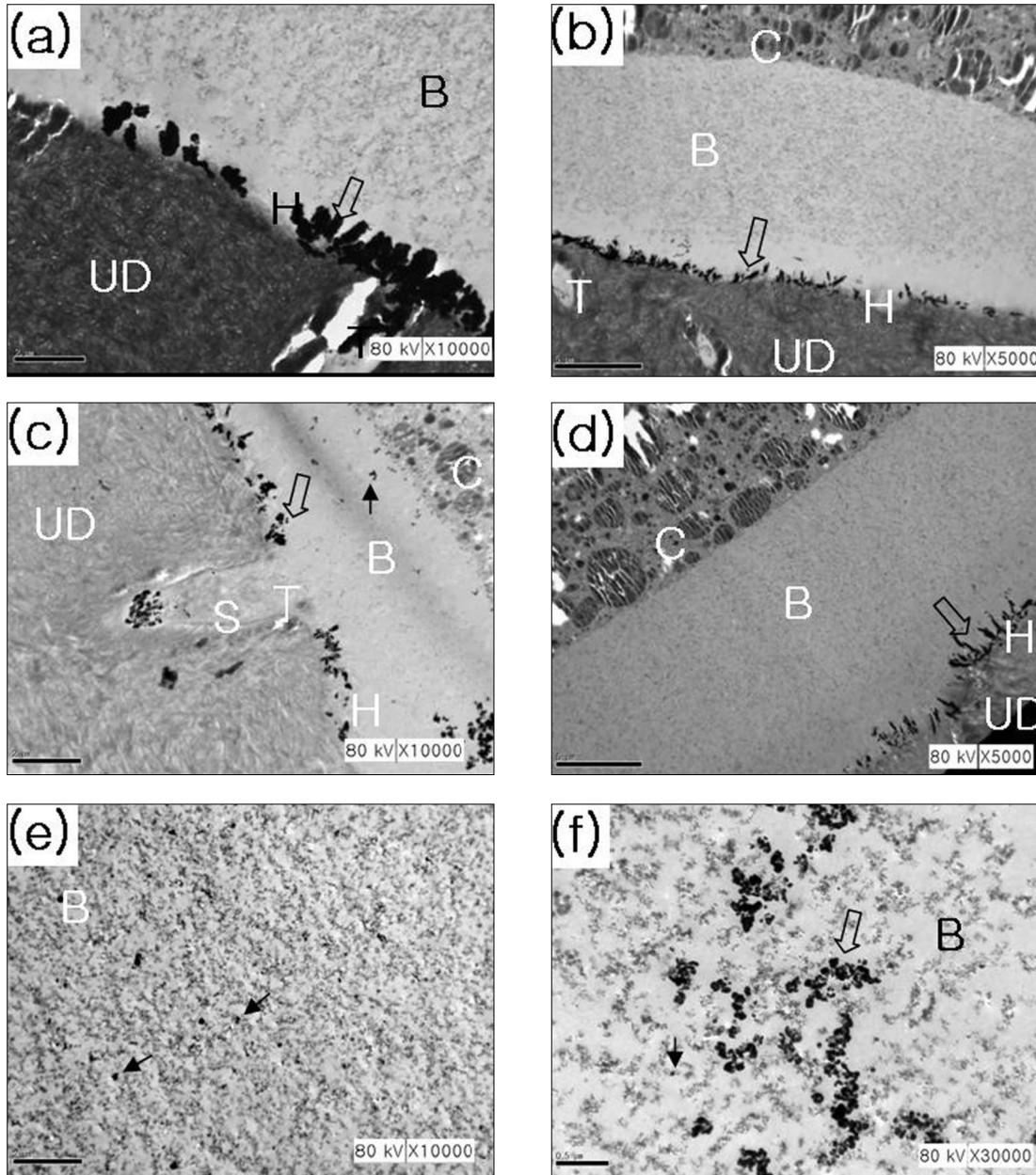
~ 5  $\mu\text{m}$ 의 두꺼운 혼성층과 접착레진층의 polyalkenoic acid 공중합체 성분이 관찰되었다(Fig. 2). SB I군에서 주로 혼성층 내의 하부에서 망상(reticular mode)으로 은입자가 침투한 양상을 보였고(Fig. 2a), SB II군에서는 은입자가 혼성층 상부에서도 관찰되었다(Fig. 2b). SB III군에서는 망상의 은 침투 양상이 혼성층에서 전반적으로 나타났으며(Fig. 2c), SB IV군에서는 가장 많은 양의 은입자 침투가 관찰되었다(Fig. 2d). 이 두 군에서는 상아세관 상방의 은입자가 수직으로 배열되는 경향을 보였고, 접착층 내에서 점상의 은입자가 관찰되기도 하였다. 자가부식 접착제를 사용한 SE군은 두께 0.5 ~ 1  $\mu\text{m}$ 의 부분적으로 탈회된 혼성층과 혼성층 내의 불균일한 은 침투 양상을 보였으며, 간혹 상아세관 입구에서 도말층(smear plug)이 관찰되기도 하였다(Fig. 3). 혼성층 내의 은 침투 양상은



**Fig. 2.** Undemineralized TEM micrographs of SB groups showing thick hybrid layer(4 ~ 5  $\mu\text{m}$ ) and non-uniform distribution of black silver deposits. (a) SB I. Reticular silver deposits(open arrow) are predominantly observed within the lower half of the hybrid layer representing the regions of incomplete resin infiltration. (b) SB II. Reticular silver deposits(open arrow) and isolated silver grains(arrow) are also present near the hybrid layer-adhesive interface. (c) SB III. With vertically oriented silver deposits over the dentinal tubules, large amount of silver uptake throughout the hybrid layer is observed. (d) SB IV. In addition to extensive silver staining within the hybrid layer, additional silver grains(open arrowhead) are present in adhesive layer. C: composite resin, B: bonding resin layer, H: hybrid layer, UD: undemineralized dentin, T: dental tubule.

SE I ~ IV군간에 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 3a ~ 3d).  
 접착레진층에 침투된 은 입자가 관찰되었으며(Fig. 3e), SE

III, IV군에서는 은 입자가 망상으로 나타나는 수트리(water  
 trees)의 양상도 관찰되었다(Fig. 3c, 3f).



**Fig. 3.** Undemineralized TEM micrographs of SE groups showing very thin hybrid layer(0.5 ~ 1  $\mu$ m) and non-uniform distribution of black silver deposits. (a) SE I. (b) SE II, (c) SE III, (d) SE IV. Despite different storage media and period, similar patterns of silver deposits in hybrid layer are observed in SE groups. Sporadic areas of nanoleakage(open arrow) are observed throughout the demineralized hybrid layers. (e) Adhesive layer of SE I. In addition to fumed silica clusters, additional silver grains(arrows) are present. (f) A high magnification view of the adhesive layer in SE IV shows water trees(open arrow) that are also observed in the adhesive layer in SE III(c). C: composite resin, B: bonding resin layer, H: hybrid layer, S: smear plug, T: dentinal tubule. UD: undemineralized dentin.

IV. 총괄 및 고찰

본 연구에서는 구강 내에서의 접착계면 분해를 재현하기 위해 가속 시효(accelerated aging) 조건으로 미세 시편(단면적 1 mm<sup>2</sup> 이하)과 고농도의 효소 용액을 사용하였다. 미세 시편의 사용으로 수분과 효소의 확산 거리를 짧게 하였으며, esterase 용액의 농도는 타액 내 hydrolase 활성<sup>23)</sup>의 100배에 해당하는 농도를 사용하였다. Collagenase 용액의 농도는 구강 내의 교원섬유 분해 활성 수준이 아직 알려져 있지 않기 때문에, 상아질 접착에서 교원섬유의 기여도를 연구하는 데 사용된 collagenase의 농도<sup>9)</sup>를 참고로 하였다.

SB군의 상아질 접착강도는 접착 24시간 후 측정하였을 때 SE군과 차이를 보이지 않았지만, 3종류의 보관용액에 4주간 보관한 후에는 크게 감소하여 접착강도의 변화를 보이지 않은 SE군에 비해 매우 낮은 값을 보였는데, 이러한 차이는 두 상아질 접착제의 성분과 접착기전의 차이 때문에 나타난다. SB군의 미세인장접착강도 감소는 부분적으로 접착제가 분자량이 큰 polyalkenoic acid 공중합체를 포함하는 데 기인한다<sup>24)</sup>. TEM(Fig. 2)에서 보이는 바와 같이 공중합체가 교원섬유의 망상조직에 걸러지면서 상분리(phase separation)가 일어나 교원섬유 상방에 분리된 겔(gel) 상태로 남게 되는데, 이러한 겔이 레진의 침투를 방해한다<sup>25)</sup>. 결과적으로 혼성층은 교원섬유와 낮은 분자량의 HEMA로만 구성되게 되어 강한 친수성을 띠게 되므로 접착계면에서 용매가 충분히 제거되지 못할 뿐만 아니라 수분 흡수가 쉽게 일어날 수 있다. SB군에서 접착강도 감소가 현저하게 나타나는 또 다른 이유는 산부식-수세 접착시스템의 경우에 산부식된 깊이의 기저부까지 접착레진이 침투하지 못하여 혼성층 기저부의 교원섬유는 노출된 상태로 남아있게 되어 가수분해에 취약한 상태로 존재하기 때문이다<sup>26,27)</sup>. 또한 접착제가 습윤 상아질 내로 잘 침투될 수 있도록 친수성 레진을 다량 포함하기 때문에 혼성층과 접착레진층이 높은 용해도와 수분 흡수를 보이므로, 수용액에서 레진 성분이 쉽게 용출되어 혼성층의 교원섬유 노출이 증가하여 가수분해에 더 취약한 상태가 된다<sup>28)</sup>.

4주 보관 후 SB군의 질산은 침투 면적은 보관용액에 따른 차이를 보이지 않았지만, TEM 사진(Fig. 2)에서 collagenase와 esterase 용액에 보관한 군의 혼성층에 대한 은 침투가 PBS에 보관한 군에 비해 더 두드러지게 나타나는 것이 관찰되었다. 이러한 변화는 외인성 collagenase나 esterase가 혼성층의 극미세누출을 증가시켜 장기적으로는 접착계면 약화에 기여할 수 있음을 암시하나, 본 연구의 보관기간 4주는 접착강도에 영향을 주기에는 짧았던 것으로 생각된다. 본 연구에서 관찰된 SB군의 접착강도 감소는 주로 수용성 환경에서의 접착계면 구성요소의 가수분해와 내인성 분해 기전에 의한 것으로 보인다.

SB군과 달리, SE군은 4주간 보관용액에 보관하였을 때 접착강도가 감소하지 않았는데 이는 자가부식 접착시스템이 산부식-수세 접착시스템보다 안정적인 접착계면을 형성한다는 이전

의 보고를 뒷받침한다<sup>10)</sup>. 이러한 결과는 자가부식 전처리제의 약산성으로 인해 상아질이 탈회될 때 교원섬유가 부분적으로만 노출되고, 탈회와 레진 침투가 동시에 일어나므로 레진 침투 깊이와 탈회 깊이의 차이가 없어, 가수분해에 취약한 상태의 교원섬유가 거의 존재하지 않는 데 기인한다<sup>29)</sup>. 그리고, Clearfil SE bond 접착제에 포함된 10-methacryloxydecyl dihydrogen phosphate(10-MDP)는 치아조직에 대한 적심성을 증가시킬 뿐만 아니라, 탈회된 상아질에 남아있는 수산화인회석 결정의 칼슘 이온과 매우 안정적인 화학 결합을 형성하여 미세기계적 유지 외에 추가적인 접착기전을 제공한다<sup>30)</sup>. 또한 용매를 포함하지 않고 광기시제(camphoroquinone)가 높은 비율로 포함된 접착레진이 별도의 층으로 적용되기 때문에<sup>31)</sup>, 높은 중합률과 낮은 수분 투과도를 보이는 접착레진층이 형성되어 2단계 산부식-수세 접착제에 비해 접착계면에서의 수분 흡수가 비교적 덜 일어나게 된다.

수용액에서의 4주 보관이 SE군의 질산은 침투 면적에 유의한 영향을 주지 않았지만, TEM 사진(Fig. 3)에서 접착레진층에 수트리가 나타나는 것이 관찰되었다. 이러한 변화는 장기적으로는 접착력을 약화시킬 것으로 생각되며, 장기간(6~15개월) 수용성 환경에 노출될 경우에 Clearfil SE bond에서도 Single Bond에서와 같이 접착강도가 감소하는 것이 여러 연구에서 보고되었다<sup>32,33)</sup>.

질산은 침투 면적으로 측정한 극미세누출은 SE군보다 SB군에서 더 크게 나타났으며, 이러한 차이도 두 상아질 접착제의 접착기전 차이로 인해 나타난다. 상아질이 깊게 탈회되고 혼성층이 두껍게 형성될수록, 탈회 상아질과 혼성층, 접착레진층 내에서 극미세누출이 증가할 수 있다<sup>34)</sup>. 그러나, 혼성층의 단위부피당 침투된 은의 양을 비교한다면, TEM에서 보이는 바와 같이 얇은 혼성층을 형성하는 SE군에서 더 높은 극미세누출이 나타나는 것으로 평가될 수도 있다.

SB군에서 접착강도와 질산은 침투 면적간에 상관관계가 유의하지 않았으나, SE군에서는 esterase에 보관한 IV군을 제외한 세 군에서 접착강도와 질산은 침투 면적이 약하거나 중등도의 음의 상관관계를 나타내었다. 이러한 결과는 2단계 산부식-수세 접착제에서 9개월의 관찰기간 동안 접착강도와 극미세누출간에 상관관계가 명확하지 않았으나<sup>5)</sup>, 자가부식 접착제에서는 접착강도와 극미세누출이 유의한 상관관계를 보인 연구<sup>35)</sup>와 다소 일치한다. 그러나, 산부식-수세 접착제로 제작된 접착시편에서 접착강도와 극미세누출간에 음의 상관관계가 보고되기도 하였고<sup>36)</sup>, 반면에 Clearfil SE bond를 사용한 다른 연구<sup>6)</sup>에서는 두 변수간에 상관관계가 관찰되지 않았기 때문에, 이러한 차이가 상아질 접착시스템의 차이에 기인하는 것으로 보이지는 않는다. 향후 극미세누출이 장기적으로 접착계면의 약화, 접착강도의 감소, 수복물의 임상적 실패에 미치는 영향에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

본 연구에서 collagenase와 esterase가 상아질 접착강도와 극미세누출에 미치는 영향은 명확하지 않았고, 산부식-수세 접

착제인 Single Bond 2가 자가부식 접착제인 Clearfil SE bond에 비해 수용액에서 4주간 보관하였을 때 접착강도의 감소가 크게 나타났으며, 더 많은 양의 극미세누출을 보였다. Clearfil SE bond에서 접착강도와 극미세누출이 약하거나 중등도의 음의 상관관계를 나타내었다. 그러나, 현재 사용되고 있는 많은 상아질 접착시스템들은 접착과정, 접착제 성분과 산도 등이 다양하다. 따라서, 다른 종류의 상아질 접착제가 사용되었거나 경화상아질이나 연화상아질(affected dentin)과 같이 변형된 상아질이 접착기질로 사용되었다면 다른 결과를 보였을 수 있다. 향후 보다 효과적이고 안정적인 상아질-레진 접착을 도모하기 위한 접착기술과 접착제 성분의 개선에 대한 연구가 필요하다.

### 참고문헌

- Sano H, Shono T, Takatsu T, et al. : Microporous dentin zone beneath resin-impregnated layer. *Oper Dent*, 19:59-64, 1994.
- Sano H, Takatsu T, Ciucchi B, et al. : Nanoleakage: leakage within the hybrid layer. *Oper Dent*, 20:18-25, 1995.
- Van Meerbeek B, Yoshida Y, Lambrechts P, et al. : A TEM study of two water-based adhesive systems bonded to dry and wet dentin. *J Dent Res*, 77:50-59, 1998.
- Li H, Burrow MF, Tyas MJ : Nanoleakage patterns of four dentin bonding systems. *Dent Mater*, 16:48-56, 2000.
- Okuda M, Pereira PN, Nakajima M, et al. : Relationship between nanoleakage and long-term durability of dentin bonds. *Oper Dent*, 26:482-490, 2001.
- Guzman-Armstrong S, Armstrong SR, Qian F : Relationship between nanoleakage and microtensile bond strength at the resin-dentin interface. *Oper Dent*, 28:60-66, 2003.
- Hayet M : Positive staining for electron microscopy. Nostrand Reinhold Co., New York, 1975.
- Pioch T, Staehle HJ, Duschner H, et al. : Nanoleakage at the composite-dentin interface: a review. *Am J Dent*, 14:252-258, 2001.
- Gwinnett AJ, Tay FR, Pang KM, et al. : Quantitative contribution of the collagen network in dentin hybridization. *Am J Dent*, 9:140-144, 1996.
- Sano H, Yoshikawa T, Pereira PN, et al. : Long-term durability of dentin bonds made with a self-etching primer, in vivo. *J Dent Res*, 78:906-911, 1999.
- Spencer P, Swafford JR : Unprotected protein at the dentin-adhesive interface. *Quintessence Int*, 30:501-507, 1999.
- Jaffer F, Finer Y, Santerre JP : Interactions between resin monomers and commercial composite resins with human saliva derived esterases. *Biomaterials*, 23:1707-1719, 2002.
- Finer Y, Santerre JP : Biodegradation of a dental composite by esterases: dependence on enzyme concentration and specificity. *J Biomater Sci Polym Ed*, 14:837-849, 2003.
- Smith RE, Burmaster S, Glaros AG, et al. : Aromatic dental monomers affect the activity of cholesterol esterase. *Biochim Biophys Acta*, 1550:100-106, 2001.
- Hebling J, Pashley DH, Tjaderhane L, et al. : Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res*, 84:741-746, 2005.
- Uitto VJ, Suomalainen K, Sorsa T : Salivary collagenase. Origin, characteristics and relationship to periodontal health. *J Periodontal Res*, 25:135-142, 1990.
- Pashley DH, Tay FR, Yiu C, et al. : Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res*, 83:216-221, 2004.
- Jackson RJ, Lim DV, Dao ML : Identification and analysis of a collagenolytic activity in *Streptococcus mutans*. *Curr Microbiol*, 34:49-54, 1997.
- Zhou D, Lee HS, Villarreal F, et al. : Differential MMP-2 activity of ligament cells under mechanical stretch injury: an in vitro study on human ACL and MCL fibroblasts. *J Orthop Res*, 23:949-957, 2005.
- Collins JM, Ramamoorthy K, Da Silveira A, et al. : Expression of matrix metalloproteinase genes in the rat intramembranous bone during postnatal growth and upon mechanical stresses. *J Biomech*, 38:485-492, 2005.
- Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM : The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol*, 45:757-765, 2000.
- Nakashima Y, Sun DH, Maloney WJ, et al. : Induction of matrix metalloproteinase expression in human macrophages by orthopaedic particulate debris in vitro. *J Bone Joint Surg Br*, 80:694-700, 1998.



23. Munksgaard EC, Freund M : Enzymatic hydrolysis of (di)methacrylates and their polymers. *Scand J Dent Res*, 98:261-267, 1990.
24. De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, et al. : Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res*, 82:136-140, 2003.
25. Van Meerbeek B, Conn LJ Jr, Duke ES, et al. : Correlative transmission electron microscopy examination of nondemineralized and demineralized resin-dentin interfaces formed by two dentin adhesive systems. *J Dent Res*, 75:879-888, 1996.
26. Agee KL, Pashley EL, Itthagarun A, et al. : Submicron hiati in acid-etched dentin are artifacts of desiccation. *Dent Mater*, 19:60-68, 2003.
27. Suppa P, Breschi L, Ruggeri A, et al. : Nanoleakage within the hybrid layer: a correlative FEISEM/TEM investigation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 73:7-14, 2005.
28. Ito S, Hashimoto M, Wadgaonkar B, et al. : Effects of resin hydrophilicity on water sorption and changes in modulus of elasticity. *Biomaterials*, 26:6449-6459, 2005.
29. Toledano M, Osorio R, De Leonardi G, et al. : Influence of self-etching primer on the resin adhesion to enamel and dentin. *Am J Dent*, 14:205-210, 2001.
30. Yoshida Y, Nagakane K, Fukuda R, et al. : Comparative study on adhesive performance of functional monomers. *J Dent Res*, 83:454-458, 2004.
31. Nunes TG, Ceballos L, Osorio R, et al. : Spatially resolved photopolymerization kinetics and oxygen inhibition in dental adhesives. *Biomaterials*, 26:1809-1817, 2005.
32. Toledano M, Osorio R, Osorio E, et al. : Durability of resin-dentin bonds: Effects of direct/indirect exposure and storage media. *Dent Mater*, 2006.
33. Armstrong SR, Vargas MA, Fang Q, et al. : Microtensile bond strength of a total-etch 3-step, total-etch 2-step, self-etch 2-step, and a self-etch 1-step dentin bonding system through 15-month water storage. *J Adhes Dent*, 5:47-56, 2003.
34. Paul SJ, Welter DA, Ghazi M, et al. : Nanoleakage at the dentin adhesive interface vs microtensile bond strength. *Oper Dent*, 24:181-188, 1999.
35. Okuda M, Pereira PN, Nakajima M, et al. : Long-term durability of resin dentin interface: nanoleakage vs. microtensile bond strength. *Oper Dent*, 27:289-296, 2002.
36. Reis A, Grande RH, Oliveira GM, et al. : A 2-year evaluation of moisture on microtensile bond strength and nanoleakage. *Dent Mater*, 23:862-879, 2007.

Abstract

EFFECTS OF COLLAGENASE AND ESTERASE ON DENTIN BOND STRENGTH  
AND NANOLEAKAGE

Young-Jung Jung, Se-Hyun Hahn, Chong-Chul Kim, Sang-Hoon Lee,  
Jung-Wook Kim, Young-Jae Kim, Ki-Taeg Jang

*Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry and Dental Research Institute, Seoul National University*

The purpose of this study was to evaluate the effects of collagenase and esterase on dentin bond strength and nanoleakage. Resin composites were bonded to occlusal dentin of premolars with Single Bond 2(SB) and Clearfil SE Bond(SE). After the microtensile specimens were prepared and stored in PBS for 24 hours(I) or, PBS(II), collagenase(III), esterase(IV) solution for 4 weeks, the specimens were stained with silver nitrate solution. Microtensile bond strength( $\mu$ TBS) and silver penetration area were measured and, the results were as follows:

1. For group II, III, and IV, the bond strengths of SB were lower than those of SB( $p < 0.05$ ). The bond strengths of SB II, III, and IV were lower than that of SB I( $p < 0.05$ ). There was no difference among the bond strengths of SE I ~ IV groups( $p > 0.05$ ).
2. Silver penetration areas of SB were higher than those of SE for all storage groups( $p < 0.05$ ). In SB and SE groups, there was no significant difference of silver penetration area among I ~ IV groups( $p > 0.05$ ).
3. SE I, II, and III showed inverse relationship between the bond strengths and the silver penetration areas( $p < 0.05$ ).

**Key words** : Collagenase, Esterase, Bond strength, Nanoleakage