

## NACA 처리에 따른 치주줄기세포 사멸 억제 효과

이 경 희<sup>‡</sup>

<sup>‡</sup>동서대학교 치위생학과 교수

### Protective Effect of NACA on Periodontal Stem Cell

Lee Kyunghee<sup>‡</sup>

<sup>‡</sup>*Dept. of Dental Hygiene, Dongseo University, Professor*

#### Abstract

**Purpose** :Periodontal ligament stem cells maintain tissue homeostasis in periodontal ligament. The purpose of this study was to determine the characteristics of periodontal ligament stem cells isolated from premolar teeth and observe protective effects against oxidative damage caused by Triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA) following treatment with N-acetylsysteine amide (NACA) drug known as enzymatic antioxidants.

**Methods** : Primary periodontal ligament stem cell (PDSC) culture was performed from simply extracted human premolar of orthodontic patients. The characteristics of the primary cultured PDSCs was analyzed using the FACS system. PDSCs was incubated with TEGDMA and NACA. The cell proliferation and survival was determined using WST-1 assay. Collected data were analyzed using SPSS Window 20.

**Results** : Primary cultured PDSCs grow on the floor and develop rapidly in a cluster form from up to 14 days. The morphology of PDSCs showed the spindle-shaped cells and grew directionally. FACS analysis, In addition, positive expression of visible cells were observed in mesenchymal stem cell biomarkers. PDLSCs cell viability was significantly decreased at high concentration in both 3 and 6 hours after TEGDMA treatment. We observed a decrease in the number of cells as well as a morphological change of PDLSCs. Antioxidative effect was notable since the death of PDLSC death was significantly inhibited compared to the control group at 24 and 48 hours after NACA treatment.

**Conclusion** : Therefore, based on the results of this study, further research should be encouraged considering the development of clinical treatment methods using various antioxidants as well as regenerative engineering techniques utilizing periodontal ligament stem cells.

---

**Key Words** : antioxidant, N-acetylsysteine amide, periodontal stem cells, TEGDMA

\*교신저자 : 이경희, kyhee@dongseo.ac.kr

논문접수일 : 2020년 5월 27일 | 게재승인일 : 2020년 6월 26일

※ 이 논문은 2020년도 동서대학교 "Dongseo Cluster Project" 지원에 의하여 이루어진 것임 (DSU-20200002).

## I. 서론

치주질환, 외상 및 과도한 외부의 힘 등은 병리학적 상태에서 치주조직을 파괴시켜 성인의 치아구조 변형과 소실을 유발한다(Mortazavi & Baharvand, 2016). 치주조직의 치료와 재생 측면에서 치주인대 줄기세포(periodontal ligament stem cell; PDLSC)는 다양한 세포로 분화하는 능력과 풍부한 공급원으로써 이식과 치료에 있어 중요한 임상 요법으로 인식되고 있다. 특히, 줄기세포는 자가증식 능력과 다양한 세포로 분화 가능한 다분화 특징을 가지고 있으며 그중에서도 성체줄기세포의 개발과 이용은 윤리적 문제의 용이성을 가지고 있어 여러 가지 조직의 재생과 관련 대체 물질로 그 의미가 높다. 교정 및 타 치료의 목적으로 발치된 치아로부터 분리된 치주인대 줄기세포는 자가 증식능력과 조골세포, 시멘트 모세포 및 섬유 모세포로 분화할 수 있어 성체 줄기세포 중에서도 주목할 만한 세포주이다(Zhu 등, 2015). 고령화 인구의 증가로 구강 건강유지에 관한 관심이 증가하고 있으며, 치과 임상 치료적 측면에서 다양한 재료들의 발전과 함께 자가이식 가능한 치주인대 줄기세포를 활용한 손상된 치아 주위조직의 복구는 세포 기반 치료의 긍정적인 가능성을 제시할 수 있다.

수복 치료에 널리 사용되는 복합재 중 하나인 triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA)는 가장 일반적으로 사용되는 공 단량체(co-monomer)이나, 중합되지 않은 TEGDMA는 구강 환경 내로 쉽게 용출된다(Reichl 등, 2012). TEGDMA의 세포 독성 작용은 다양한 세포에서 보고되었으며(Schertl 등, 2019), 그 기전으로는 TEGDMA가 세포 내 글루타티온(glutathion)의 수준을 감소시켜 항산화 작용을 억제하는 활성산소종(ROS) 매개 세포 독성을 유발하여 산화적 손상을 일으키는 것으로 보고되었다(Volk 등, 2012). 활성산소종은 핵과 미토콘드리아 사이의 신호전달을 포함하여 비정상적인 미토콘드리아의 자가 포식 및 병원체로부터의 보호 등 세포의 생존에 중요한 작용을 한다. 하지만, 산화적 손상 동안 발생하는 과도한 양의 활성산소종은 세포에 해로운 작용을 유발하고 DNA를 손상시키는 세포자멸사(apoptosis)의 매개 역할을 하여 세포 손상을 유발한다(Durner 등,

2011). TEGDMA에 의해 유도된 산화적 손상은 염증성 사이토카인과 키모카인 등의 인자들에 의해 치주인대 섬유모세포의 형태 파괴와 세포 사멸사를 유발하여 치주염을 일으킨다(Choe 등, 2012). 특히, 산화적 손상은 구강 내 줄기세포의 생성 분화 잠재력을 손상하기 때문에(Nakashima 등, 2017), 세포의 자유 라디칼과 활성산소종의 생성 및 항산화 작용의 세포 내·외 균형은 건강한 치주조직의 유지와 손상된 치주조직의 줄기세포를 이용한 성공적인 치료 및 재생에 있어서 특별히 고려되어야 할 점이다.

항산화제의 하나인 N-acetylsysteine amide (NACA)는 글루타티온(GSH)의 전구물질로 세포의 산화/환원 상태를 유지하는 데 중요한 역할을 하는 내인성 항산화제인 글루타티온(GSH)의 생성을 향상시킨다(Hall 등, 2019). NACA는 글루타티온 합성에 관여하는 친수성 구조물로 세포의 산화 손상에 대한 보호 작용을 한다(Wang 등, 2017). 특히, 글루타티온 전구물질의 약물인 NACA는 노화와 관련된 항산화제 기반 치료제로써 산화적 손상에 대한 세포와 미토콘드리아를 보호하는 작용을 통해 세포사멸사를 억제함으로써 세포생존에 관여하는 잠재적인 능력이 보고되고 있다(Kularatne 등, 2020). 치과계에서는 아직 이러한 활성산소에 관한 연구와 더불어 산화적 손상을 감소시키기 위한 여러 가지 약물 개발 및 그 효과에 관한 연구가 매우 부족한 실정이다.

이에 본 연구에서는 성체 치주인대 줄기세포주를 분리 배양하고 TEGDMA에 의해 치주인대 줄기세포의 산화적 손상 정도를 확인하고자 한다. 또한, 항산화제인 NACA의 처치에 따른 세포 손상 억제 정도를 확인함으로써 여러 가지 화합물로 이루어진 치과 재료들로부터 유발되는 치주조직 손상에 대한 치아 주위조직 내 존재하는 줄기세포 보호 작용을 확인하고자 하였다.

## II. 연구방법

### 1. 치주인대 조직의 분리 및 줄기세포 배양

본 연구는 IRB 심의 제13조에 해당하여 동서대학교

생명윤리위원회의 심의면제 (1041493-E-2020-001)를 받았으며, 부산지역 치과의원에 교정치료를 위해 내원한 환자 중 교정의 목적으로 소구치를 발거한 경우에 한하여 본 연구를 이해하고, 조직공여에 동의한 환자를 대상으로부터 제공받은 제1소구치를 사용하여 실험을 시행하였다. 발거한 소구치를 즉시 생리식염수에 담가 멸균 상태에서 실험실로 이동 후 치주인대 조직을 획득하였다. 치주인대 조직은 치관을 멸균된 plier로 잡고 치근 중앙 1/3 부분을 #11 Blade를 사용하여 부드럽게 긁어 분리하였다.

분리된 조직은 Huang 등(2006)의 방법으로 분리 배양하였다. 이를 간략히 요약하면, 조직은 100 units/ml penicillin과 100  $\mu$ g/ml streptomycin (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 3 % FBS (fetal bovine serum) (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)을 함유한  $\alpha$ -MEM (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 배지로 세척한 후 100 mm 플라스틱 dish에 부착시켜 20 % FBS와 1 % p/s가 포함된 배지에서 37  $^{\circ}$ C, 5 % CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 계대 배양 후 세포는 다시 10 % FBS와 1 % p/s가 포함된 배지로 2일에 한 번씩 배지를 교환하여 3차 계대 배양한 세포를 각 실험에 사용하였다.

## 2. 줄기세포 표지인자 확인

일차 배양된 치주인대 세포의 미분화 줄기세포의 특성을 확인하기 위하여 세포표면 표지자(cell surface marker)를 이용하여 치수유래 세포의 Fluorescence-activated cell sorting (FACS) 분석법을 실시하였다. 세포표면 표지자 중 초기 중배엽 줄기세포의 표지인자 표면항원인 CD29 (anti-human CD29 PE, eBioscience, San Diego, CA, USA), CD90 (anti-human CD90 PE, eBioscience), CD44 (anti-human CD44 PE, eBioscience), CD73 (anti-human CD73 PE, eBioscience), CD105 (anti-human CD105 PE, eBioscience)와 내피세포, 조혈세포 표면 항원인 CD31 (anti-human CD31 PE, eBioscience), CD14 (anti-human CD14 PE, eBioscience), CD34 (anti-human CD34 PE, eBioscience), 림프구 줄기세포의 표지자 CD45 (anti-human CD45 PE, eBioscience), 그리고 embryo 줄기세포의 표지인자인 CD STRO-1

(anti-human STRO-1 PE, eBioscience), CD 146 (anti-human CD416 PE, eBioscience) 항체를 사용하였다. 대조군은 1차 항체를 생략하고 염색하여 진행하였으며, 형광염색된 세포는 FACS Calibur Flow Cytometer (Becton-Dickinson, San Joes, CA, USA)로 측정하고 분석하였다.

## 3. 약물독성 확인

치주인대 줄기세포는 96 well plate에 1×10<sup>4</sup>로 분주하여 24시간 동안 37  $^{\circ}$ C, 5 % CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하여 약물독성 실험을 실시하였다. 레진기질(Triethylene glycol dimethacrylate, TEGDMA, sigma, Saint Louis, MO, USA)는 DMSO 용액에 녹인 후 10 % FBS와 1 % P/S를 포함한  $\alpha$ -MEM 배지에 용해시켜 10 mM stock 용액을 만들어 사용하였으며, 0.1, 1, 2.5, 5, 10 mM TEGDMA 농도로 3, 6시간 치주인대 줄기세포에 처리한 후 세포 독성 농도를 확인하였다. N-acetylsysteine amide (NACA, sigma, Saint Louis, MO, USA)는 DMSO 용액에 녹인 후, 10 mM의 stock 용액을 만들어 사용하였으며, 배지를 이용하여 0.1, 1, 2.5, 5, 10 mM NACA를 3, 6시간 처리한 후 시간 및 농도에 따른 세포독성을 관찰하였다. Normal 그룹은 약물을 넣지 않은 세포배양 배지만을 사용한 양성대조군으로 사용하였다.

## 4. NACA 약물 처리

항산화 약물인 NACA의 치주인대 줄기세포사멸 억제 효과를 확인하기 위하여 세포사멸을 유발하는 10 mM TEGDMA를 1시간 처리한 후, 세포배양 배지에 NACA의 농도별 처리를 하였다. 24, 48시간에 농도별 세포사멸 정도를 확인하였다. Control 그룹인 음성대조군은 치주인대 줄기세포에 10 mM TEGDMA를 1시간 처리한 후 NACA 약물을 넣지 않은 세포배양 배지만 적용하여 관찰하였다.

## 5. 세포 생존율 측정

치주인대 줄기세포는 96 well plate에 1×10<sup>4</sup>로 분주하여 24시간 배양한 후 세포의 상층 배지는 제거하고 약물

을 농도별 처리 후 3, 6시간에 각각 WST-1 (EZ-CYTOX, Dongen Bio, Seoul, Korea) 10  $\mu$ l씩 분주하고 1시간 동안 배양기에서 반응을 시켰다. 반응 후, 450 nm 파장의 흡광도에서 ELISA assay (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 생존해 있는 세포 수를 측정하였다. 각 분석은 세 번 반복 시행한 실험 결과를 바탕으로 비교·분석하였다.

### 6. 분석방법

각 대조군과 실험군에서 얻은 흡광도(O.D) 수치는 SPSS Windows 20 (IBM Co, Armonk, USA)를 이용하여 비교 분석하였다. 일반선형 모형의 일변량 분산분석을 이용하였으며, 사후검정으로는 Turkey의 방법을 사용하였다. 유의 수준은  $p < .05$ 로 적용하였다.

## III. 결 과

### 1. 치주인대 세포 일차 배양과 유세포분석

발치된 소구치의 표면으로부터 치주인대 조직을 분리하여 일차 배양한 후 관찰을 한 결과 초기 7일 후부터 치주인대 줄기세포가 바닥에 붙어 자라기 시작함을 관찰할 수 있었다. 일차 배양의 시간은 최대 14일부터는

균집형태의 단층 세포가 자라 나왔다. 또한, 치주인대 줄기세포의 증식 속도는 빠른 편이고 방추형의 세포의 형태를 보이며 방향성 있게 자라나가는 양상을 확인할 수 있었다(Fig 1).

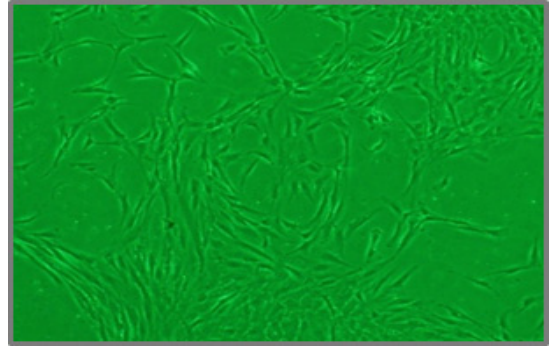


Fig 1. Initial cells growing out from periodontal ligament (PDL) tissues when explants were plated into six-well culture dishes containing  $\alpha$ -minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM) supplemented with 15 % fetal bovine serum

일차 배양한 치주인대 줄기세포의 항체 표면표지자를 사용한 FACS 분석 결과, 본 실험실에서 분리한 치주인대 줄기세포는 림프구 줄기세포 표지자 CD45, endothelial 줄기세포 표지자 CD31, 조혈 줄기세포 표지자 CD14, CD34, embryo 줄기세포 표지자인 CD STRO-1, CD 146에서 모두 음의 발현을 확인하였다. 반면, 중간엽 줄기세포의 표지자인 CD29, CD90, CD44,

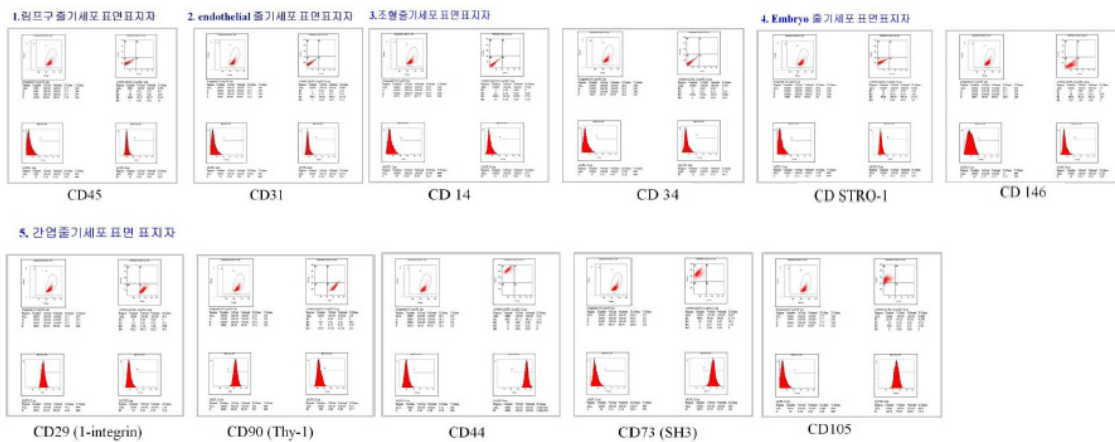


Fig 2. Cytometric flow analysis indicated that PDLSCs derived from adult human showed the negative for CD45, CD31, CD14, and CD34 but positive in mesenchymal stem cell marker such as CD29, CD90, CD44, CD73 and CD105

CD73, CD105에서 양의 발현이 관찰되었다. 이는 본 실험에서 일차분리 배양된 치주인대 줄기세포는 중간엽 줄기세포의 특성을 가짐을 확인하였다(Fig 2).

## 2. 레진 기질과 NACA 처리에 따른 세포독성

치주인대 줄기세포에 대한 복합레진 성분 중 하나인 TEGDMA의 독성 정도를 확인하고자 농도 및 시간에 따른 처리 후 세포 생존율을 WST-1 분석법을 통해 확인하였다. TEGDMA의 농도별(0.1, 1, 2.5, 5, 10mM) 및 시간별(3, 6시간) 세포 독성을 관찰한 결과, 농도가 증가할수록 치주인대 줄기세포의 사멸이 유의미하게 증가하는 양상을 보였다. 특히, 고농도인 5, 10mM TEGDMA에서

는 3, 6시간에서 모두 유의미하게 세포사멸이 활발하게 일어나는 현상을 관찰하였으며 세포의 형태적 변화도 관찰되었다(Fig 3A)( $p < .05$ ).

항산화제인 NACA는 수용성 용액으로 배지를 이용하여 0.1, 1, 2.5, 5, 10mM 농도로 희석하였으며, 치주인대 줄기세포에 대한 독성을 확인하고자 시간과 농도별 세포사멸 정도를 분석하였다. 그 결과 저농도에서는 치주인대 줄기세포의 생존에 영향을 미치지 않았으며 현미경적 형태적 변화도 확인되지 않았다. 하지만, 10mM 이상의 고농도에서는 일부 치주인대 줄기세포의 섬유가 짧아지는 등의 미미한 형태적 변화를 보이며 세포사멸 양상이 관찰되었으나 WST-1 분석 결과 유의미한 차이를 보이지 않았다(Fig 3B).

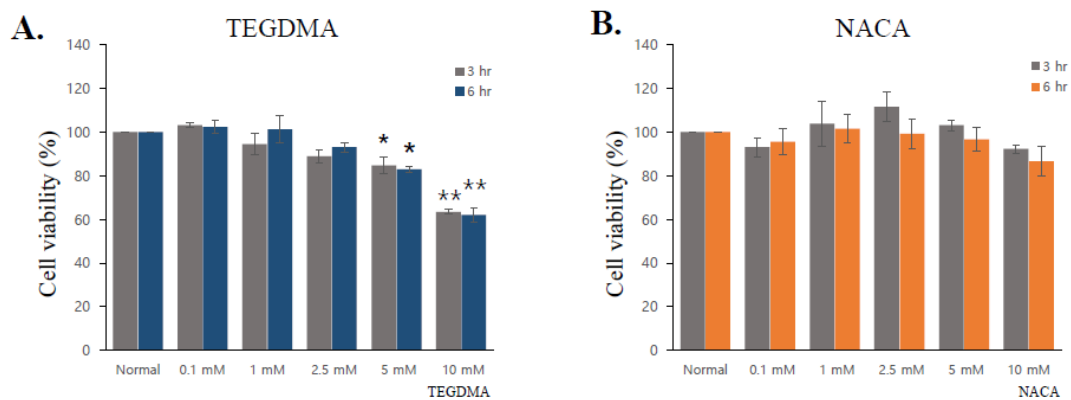


Fig 3. The cell viability of triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA) or N-acetylsysteine amide (NACA) on the growth of PDLSCs. Cells were exposed to TEGDMA or NACA for 3 and 6 hours. The dose-dependant of drug effect was measured with WST-1 assay. \* $p < .05$ , \*\* $p < .01$  compared with Normal group: one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc comparison

## 3. NACA 항산화제 처리에 따른 치주인대 줄기세포 사멸 억제

TEGDMA로 유발된 세포 독성에 대한 항산화제인 NACA 처리에 따른 치주인대 줄기세포 생존율을 확인하고자, 치주인대 줄기세포에 10mM TEGDMA를 1시간 처리하여 세포사멸을 유도한 후, 농도별 약물효과를 확인하기 위해 저농도(0.1, 1, 2.5mM)의 NACA를 치주인대

줄기세포에 각각 처리하였다. NACA 농도 및 시간에 따른 세포사멸 억제 정도를 확인한 결과, 24시간에서는 1mM에서 대조군에 비해 유의미하게 세포 생존율이 증가함을 확인하였다(Fig 4A). 또한, 약물 처리 48시간 이후에는 세포 생존율이 0.1mM에서도 유의미하게 높아지는 양상을 보였으며 1mM 농도에서는 레진기질 성분인 TEGDMA만 처리한 대조군에 비해 2배 이상의 치주인대 줄기세포사멸이 억제됨을 확인하였다(Fig 4B).

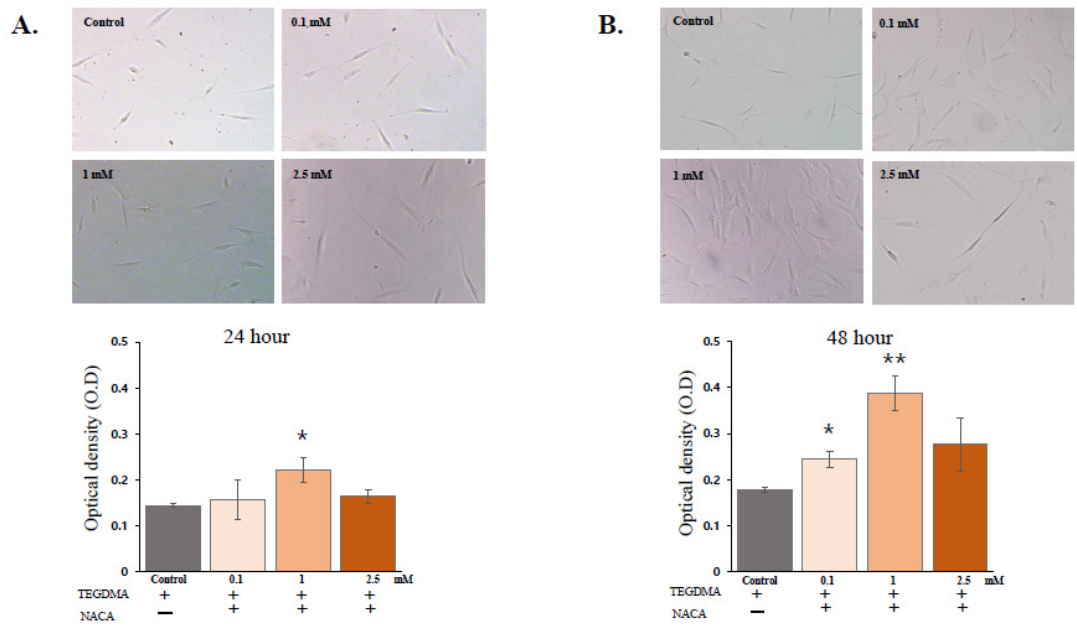


Fig 4. The effect of N-acetylsysteine amide (NACA) on PDLs cells viability. 24 (A) and 48 (B) hours after NACA treatment showed cell protective effect on proliferation and viability of PDLs. \* $p < .05$ , \*\* $p < .01$  compared with control group: one-way ANOVA followed by Tukey' s post-hoc comparison.

#### IV. 고찰

구강질환 중에서 치주질환은 전 세계적으로 유병률이 높은 만성질환이며, 이는 치주조직의 염증반응으로 치주낭 형성 및 치은퇴축으로 이어져 결국은 치아 상실에 이르게 되므로 치주조직 재생과 치면세균막 관리를 통한 치료에 관점이 맞춰져 왔다(Nunn, 2003). 하지만, 최근 치주인대 유래 줄기세포가 치주조직의 재생에 있어 중요한 역할을 할 수 있으며 골세포, 지방세포뿐만 아니라 백악질 및 치주인대로 재생 가능성이 확인됨으로써 (Merkel 등, 2019), 자가이식 및 조직공학적 재생치료의 활용이 이루어질 수 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서 일차 배양한 성체 치주인대 줄기세포는 바닥에 붙어 자랐으며 높은 증식률과 함께 다양한 미분화 중간엽줄기세포의 특성이 FACS 분석법을 통해 높게 발현됨을 관찰하였다. 이는 Pittenger 등(1999)의 연구에서 중간엽줄기세포는 일반적인 배양조건에서 바닥에 붙어서 자라는 양상을 보이며, 최소 CD105, CD74, CD90 표지인자를 발

현하여야 한다고 보고한 연구 결과와 일치함을 보였다 (Fong 등, 2011). 또한, 본 연구의 일차배양 시 나타난 치주인대 줄기세포의 빠른 세포증식과 생존율은 개체 나이 또는 치아에서 획득할 수 있는 조직의 양과 발치한 후 시간에 따른 차이를 보일 것으로 생각된다. 관찰된 치주인대 줄기세포는 집락을 형성하며 배양 접시에 부착되어 섬유아세포의 형태를 보였으며, 이러한 형태는 Seo 등(2004)의 연구와 유사하다. 하지만 성견으로부터 분리한 치주인대 줄기세포의 특징 중 하나인 초기 증배엽 줄기세포의 표지인자로 추정되는 STRO-1, CD146은 음의 반응을 보여 골세포, 지방세포, 연골세포 등으로 분화할 수 있는 다분화성의 능력은 부족한 양상이 있어 다소 차이를 보였다(Kim 등, 2007). 배양한 치주인대 줄기세포는 장기간 냉동 보관이 가능하며 오랜 기간 보관 후에도 그 특성이 유지되어(Papaccio 등, 2006), 이종 이식에서도 거부반응이 보이지 않았다고 보고되고 있다 (Kerkis 등, 2008). 이에 인간수명의 연장을 통해 늘어나는 구강 건강에 대한 중요성이 높아짐에 따라 교정치료

및 제3 대구치 발치 등 다양한 치과 임상 진료 시 폐기되는 자원으로부터 유용한 임상 치료 자원으로 활용 가능할 것으로 예상하며 이에 따른 치주인대 줄기세포의 개발과 연구도 활발히 이루어져야 할 것으로 생각된다.

복합레진 성분 중 하나인 TEGDMA는 구강 내 환경에서 불완전 중합체 및 생분해로 방출되어 다양한 세포 기능을 손상하며 산화적 스트레스를 유발한다(Mikulás 등, 2018). 이러한 산화적 스트레스는 자유라디칼의 생성과 세포 내 항산화 반응의 불균형을 유발하여 세포 내 활성산소를 증가시켜 단백질, 지질, RNA 및 DNA를 포함한 생물학적 성분에 대한 높은 반응성을 통해 세포자멸사 및 괴사를 발생시킨다(Sies 등, 2017). 본 연구에서는 치주인대 줄기세포에 농도별 TEGDMA의 세포 독성 시험을 통해 10mM 고농도에서 약물을 처리하지 않은 대조군에 비해 약 40 % 이상의 세포사멸이 일어남을 관찰하였으며, 이는 이전 본 연구팀의 MDOC-23 세포주를 이용한 실험에서 확인된 5mM 보다 높은 차이를 보였다(Lee 등, 2014). 이는 분열과 증식이 활발한 줄기세포의 특성에 따른 TEGDMA 농도와 시간에 반응하는 줄기세포의 생존율 차이로 생각된다. 또한, TEGDMA에 의한 세포의 낮은 생존율은 선택적 레진 단량체가 세포 내 항산화제인 글루타치온(GSH)을 고갈시켜 활성산소종(ROS)을 과다 유발함으로써 세포증식의 억제, 세포자멸사 활성화 및 불완전 골세포 분화에 관여한다는 연구 결과와 유사하다(Inamitsu 등, 2017). 이에 항산화제 약물들은 세포사멸을 억제하는 효과를 보일 것으로 예상되며, 그 중에서도 항산화제로 잘 알려진 비타민 C, 비타민 E, 또는 N-아세틸 시스테인(NAC) 등은 ROS 생성을 억제하여 세포 독성을 감소할 것으로 생각된다(Spagnuolo 등, 2013).

NACA는 세포 내 GSH 양을 증가시키는 GSH 합성의 전구체이며, 직접 활성산소를 제거하는 항산화제로 작용할 수 있다(Kularatne 등, 2020). 특히, Coenzyme Q와 같은 항산화제는 치과 임상 연구에서 만성 치주염 환자의 염증성 반응을 개선한다고 보고되었으며(Hans 등, 2012), 본 연구에서는 세포 손상을 일으키지 않는 다양한 농도(0.1~10mM)의 NACA 처리 시 고농도의 일부를 제외하고 세포 생존 및 형태적 변화에 영향을 미치지 않음을 확인하였다. 레진 기질에 의한 산화적 손상 유도 후

1mM의 NACA를 처리한 결과 유의미한 세포사멸 억제 효과를 보였으며, 이는 Embryonic kidney cell (EFN-R) 세포주에서 산화적 손상 후 세포사멸 억제 효과를 보인 750 $\mu$ M 농도와 유사하다(Benterud 등, 2017). 쥐의 3T3 섬유(fibroblast) 세포주를 이용한 실험에서 0.1-2mM TEGDMA가 농도 및 시간 의존적으로 세포 생존율이 감소하는 반면, 10mM NAC의 전처리 및 후처리 실험에서 직접적으로 세포 독성 및 TEGDMA 단량체의 세포외 농도를 감소시킨다고 보고되어 본 연구에서 세포사멸 억제 효과를 보인 저농도의 NACA와는 차이를 보였다(Spagnuolo 등, 2013). 레진 기질로 유도된 산화 스트레스는 NAC처리에 의해 골모세포 생존력 및 기능을 유지하기 위해 세포 독성을 상당히 감소시키고(Galler 등, 2011), 특히 TEGDMA에 의해 유발되는 부작용에 대하여 항산화 활성화, NF $\kappa$ B의 활성화, 세포 분화를 포함하는 다양한 메커니즘을 통해 세포보호 기능을 나타내는 것으로 보인다(Kularatne 등, 2020). 결과적으로 치주인대 줄기세포에 NACA 항산화제 처리는 TEGDMA에 의해 유발되는 치주조직의 산화적 손상을 감소시켜 치주인대 줄기세포보호 및 분화에 관여할 것으로 생각되며, 이는 나아가 치주염 개선에 관여할 것으로 사료된다. 추후 연구에서는 NACA의 활성산소종과 항산화작용 사이의 균형 확인을 위한 세포사멸 기전에 관한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 나아가 발치 후 폐기되는 성인의 치아로부터 추출한 치주인대 줄기세포를 활용한 다양한 임상치료를 위한 재생공학적 재료로서의 시도가 필요할 것으로 생각된다. 이와 더불어 치과임상에 사용되는 여러 가지 화학적 성분들을 포함한 치과 재료들로부터 방출되는 단량체들의 세포 독성 정도 및 그에 관련된 메커니즘을 밝히고, 이러한 단점을 감소시키기 위한 효과적인 전략을 찾기 위한 항산화제를 이용한 줄기세포 이식에 관한 추후 연구가 필요하다고 생각된다.

## V. 결론

본 연구는 발치된 치아로부터 분리한 치주인대 줄기세포의 특성을 확인하고, 치과 임상 재료로 사용되는 레

진 기질 성분인 TEGDMA의 처리에 따른 치주인대 줄기 세포의 세포 사멸정도를 확인하고자 하였다. 또한, 효소적 항산화제로 알려진 NACA 약물을 처리함으로써 TEGDMA 처리로 유발된 산화적 손상으로부터 치주인대 줄기세포 사멸억제 효과 여부를 관찰하고자 하였으며, 다음과 같은 결과를 확인하였다.

1. 일차 배양된 치주인대 줄기세포는 배양 14일부터는 군집형태로 증식 속도가 빨라지며 방추형의 세포의 형태로 방향성이 관찰되었다. 또한, FACS 분석 결과 분리배양된 치주인대 줄기세포는 중간엽 줄기세포의 표지자에서 양의 발현이 관찰되었고, 림프구 줄기세포 표지자, endothelial 줄기세포 표지자, 조혈 줄기세포 표지자, embryo 줄기세포 표지인자의 경우 음의 발현을 확인하였다.
2. 치주인대 줄기세포에 레진기질 성분 중 하나인 TEGDMA의 농도 및 시간에 따른 WST-1 분석 결과, 각각의 3, 6시간에서 농도가 증가함에 따라 치주인대 줄기세포의 섬유성 형태가 위축되는 형태학적 변형이 관찰되었으며 세포 수도 감소되었다. 특히, 고농도(5, 10mM) 약물 처리 군에서는 유의미하게 세포 생존율이 감소하였다.
3. 반면, 항산화제인 NACA의 치주인대 줄기세포에 대한 독성을 확인하기 위하여 농도별(0.1~10 mM) 처리 후 시간별 세포 생존율을 확인한 결과, 낮은 농도에서는 치주인대 줄기세포의 형태적 및 생존에 영향을 미치지 않았지만, 10 mM 고농도 NACA 처리에서는 현미경 하에서 미미한 세포의 형태학적 변형 및 증식이 감소하는 양상을 보였으나 통계학적으로 유의미하지 않았다.
4. 항산화제인 NACA의 세포사멸 억제 효과를 확인한 결과 NACA 처리 후 24, 48시간에서 TEGDMA 약물만을 처리한 음성대조군에 비해 1 mM NACA 처리군에서 유의미하게 치주인대 줄기세포 사멸을 억제함을 관찰하였다.

따라서 본 연구의 결과를 바탕으로 치주인대 줄기세포를 활용한 재생공학적 치료기법과 더불어 다양한 항산화제를 이용한 임상 치료법 개발을 위한 추후 연구가 활발하게 이루어져야 할 것으로 생각된다.

### 참고문헌

Benterud T, Manueldas S, Norgren S, et al(2017). N-Acetylcysteine amide (NACA) reduces cell death after oxidative stress in a porcine embryonic kidney cell line. *J Biomed Sci Eng*, 10(2), 31-36. <https://doi.org/10.4236/jbise.2017.102004>.

Choe Y, Yu JY, Son YO, et al(2012). Continuously generated H2O2 stimulates the proliferation and osteoblastic differentiation of human periodontal ligament fibroblasts. *J Cell Biochem*, 113(4), 1426-1436. <https://doi.org/10.1002/jcb.24017>.

Durner J, Dębiak M, Bürkle A, et al(2011). Induction of DNA strand breaks by dental composite components compared to X-ray exposure in human gingival fibroblasts. *Arch Toxicol*, 85(2), 143-148. <https://doi.org/10.1007/s00204-010-0558-0>.

Fong EL, Chan CK, Goodman SB(2011). Stem cell homing in musculoskeletal injury. *Biomaterials*, 32(2), 395-409. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.101>.

Galler KM, Schweikl H, Hiller KA, et al(2011). TEGDMA reduces mineralization in dental pulp cells. *J Dent Res*, 90(2), 257-262. <https://doi.org/10.1177/0022034510384618>.

Hall ED, Wang JA, Miller DM, et al(2019). Newer pharmacological approaches for antioxidant neuroprotection in traumatic brain injury. *Neuropharm*, 145(Pt B), 247-258. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.08.005>.

Hans M, Prakash S, Gupta S(2012). Clinical evaluation of topical application of perio-Q gel (Coenzyme Q10) in chronic periodontitis patients. *J Indian Soc Periodontol*,



- 16(2), 193-199. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.99261>.
- Huang GTJ, Sonoyama W, Chen J, et al(2006). In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res*, 324(2), 225-236. <https://doi.org/10.1007/s00441-005-0117-9>.
- Inamitsu H, Okamoto K, Sakai E, et al(2017). The dental resin monomers HEMA and TEGDMA have inhibitory effects on osteoclast differentiation with low cytotoxicity. *J Appl Toxicol*, 37(7), 817-824. <https://doi.org/10.1002/jat.3429>.
- Kerkis I, Ambrosio CE, Kerkis A, et al(2008). Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: local or systemic?. *J Transl Med*, 6, Printed Online. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-6-35>.
- Kim KH, Kim SH, Seol YJ, et al(2007). Stem cell properties of cells derived from canine periodontal ligament. *J Korean Acad Periodontol*, 37(3), 479-488. <https://doi.org/10.5051/jkape.2007.37.3.479>.
- Kularatne RN, Bulumulla C, Catchpole T, et al(2020). Protection of human retinal pigment epithelial cells from oxidative damage using cysteine prodrugs. *Free Radical Biol Med*, 152, 386-394. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.03.024>.
- Lee AR, Park SY, Lee KH(2014). The protective effect of coenzyme Q10 on cytotoxicity of resin monomer of odontoblast caused by TEGDMA. *J Korean Soc Dent Hyg*, 14(5), 775-781. <https://doi.org/10.13065/jksdh.2014.14.05.775>.
- Merkel A, Chen Y, George A(2019). Endocytic trafficking of DMP1 and GRP78 complex facilitates osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Front Physiol*, 10, Printed Online. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01175>.
- Mikulás K, Hermann P, Gera I, et al(2018). Triethylene glycol dimethacrylate impairs bioenergetic functions and induces oxidative stress in mitochondria via inhibiting respiratory complex I. *Dent Mater*, 34(7), e166-e181. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.03.012>.
- Mortazavi H, Baharvand M(2016). Review of common conditions associated with periodontal ligament widening. *Imaging Sci Dent*, 46(4), 229-237. <https://doi.org/10.5624/isd.2016.46.4.229>.
- Nakashima M, Iohara K, Murakami M, et al(2017). Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis: a pilot clinical study. *Stem Cell Res Ther*, 8, Printed Online. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0506-5>.
- Nunn ME(2003). Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. *Periodontol* 2000, 32(1), 11-23. <https://doi.org/10.1046/j.0906-6713.2002.03202.x>.
- Papaccio G, Graziano A, d'Aquino R, et al(2006). Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. *J Cell Physiol*, 208(2), 319-325. <https://doi.org/10.1002/jcp.20667>.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al(1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), 143-147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>.
- Reichl FX, Löhle J, Seiss M, et al(2012). Elution of TEGDMA and HEMA from polymerized resin-based bonding systems. *Dent Mater*, 28(11), 1120-1125. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2012.06.010>.
- Schertl P, Volk J, Perduns R, et al(2019). Impaired angiogenic differentiation of dental pulp stem cells during exposure to the resinous monomer triethylene glycol dimethacrylate. *Dent Mater*, 35(1), 144-155. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.11.006>.
- Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al(2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364(9429), 149-155. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16627-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16627-0).
- Sies H, Berndt C, Jones DP(2017). Oxidative stress. *Annu*

- Rev Biochem, 86, 715-748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>.
- Spagnuolo G, Desiderio C, Rivieccio V, et al(2013). In vitro cellular detoxification of triethylene glycol dimethacrylate by adduct formation with N-acetylcysteine. Dent Mater, 29(8), e153-e160. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.04.023>.
- Volk J, Leyhausen G, Geurtsen W(2012). Glutathione level and genotoxicity in human oral keratinocytes exposed to TEGDMA. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 100(2), 391-399. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31960>.
- Wang HJ, Huang YW, Tobwala S, et al(2017). The role of N-acetylcysteine amide in defending primary human retinal pigment epithelial cells against tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress. Free Radicals and Antioxidants, 7, 172-177. <https://doi.org/10.5530/fra.2017.2.26>.
- Zhu J, Xiao Y, Li Z, et al(2015). Efficacy of surgery combined with autologous bone marrow stromal cell transplantation for treatment of intracerebral hemorrhage. Stem Cells Int, 2015, Printed Online. <https://doi.org/10.1155/2015/318269>.