

코엔자임 Q10 처리에 따른 TEGDMA에 의해 유발된 치아 세포 사멸 억제 효과

이아름 · 박소영 · 이경희

동서대학교 치위생학과

The protective effect of coenzyme Q10 on cytotoxicity of resin monomer of odontoblast caused by TEGDMA

Ahreum Lee · Soyeong Park · Kyung Hee Lee

Department of Dental Hygiene, Dongseo University

Received : 12 July, 2014
Revised : 1 September, 2014
Accepted : 25 September, 2014

Corresponding Author

Kyung Hee Lee

Department of Dental Hygiene

Division of Health Science

Dongseo University, Busan, Korea.

Tel : 82-51-320-2730

Fax : 82-51-320-2752

E-mail : kyhee@gdsu.dongseo.ac.kr

ABSTRACT

Objectives : The purpose of the study is to investigate the protective effect of coenzyme Q₁₀ on cytotoxicity effect of dental monomers in odontoblast(MDPC-23).**Methods** : MDPC-23 was incubated with the(co)monomers triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA) with and without addition of coenzyme Q₁₀. The cell proliferation and survival was determined using WST-1 assay. The level of reactive oxygen species(ROS) was measured by immunofluorescent staining for DCF-DA.**Results** : TEGDMA treatment decreased the cell proliferation by dose dependently(0.1, 1, 2.5, 5, 10 mM) on the growth of MDPC-23 cells. Coenzyme Q₁₀ showed cell proliferation from 5 to 500 μM by WST-1 assay. Pre-treatment coenzyme Q₁₀ showed the antioxidant effect on proliferation and viability of MDPC-23 after 48h(p<0.05). The positive cells were observed in non-coenzyme Q₁₀ treatment group(group 2) in comparison with coenzyme Q₁₀ pre-treatment group(group 1) by DCF-DA. The fluorescence positive cells showed 14,715(group 1) and 19,788(group 2) using image J system.**Conclusions** : TEGDMA induced cytotoxicity. The MDPC-23 cell death was associated with the increasing ROS. Coenzyme Q₁₀ showed the antioxidant effects by decreasing ROS. This effects may contribute to the treatment of periodontal disease induced by TEGDMA after operation.**Key Words** : antioxidant, cell death, coenzyme Q₁₀, odontoblast, triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA)**색인** : 레진 기질, 세포사멸, 치아세포, 코엔자임 Q₁₀, 항산화제

서론

최근 발전하는 치과 임상기술에 따라 교정 및 임플란트 식립 등과 같은 치료가 증가함으로써 치주조직의 보존과 재생

의 중요성이 증대 되고 있다. 치주조직의 유지와 보존은 치의학 분야 전반에 있어 화두의 대상이며¹⁾, 이는 지금까지 이루어져왔던 치면세마와 같은 예방적인 접근뿐만 아니라, 생물학적 및 면역학적 측면과 연관되는 접근 또한 필요하다²⁾. 그러므로 다양하게 사용되는 치과재료들의 생물학적 측면에

Copyright©2014 by Journal of Korean Society of Dental Hygiene

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in medium, provided the original work is properly cited.JKSDH is available at <http://www.jksdh.or.kr/> pISSN 2287-1705 / eISSN 2288-2294

▶ 본 연구는 2014년도 한국연구재단(NRF-2013R1A1A4A01009332)에 의해서 지원되었음.

서의 치주조직에 미치는 요인을 파악하고 이에 대한 효과적인 보존법을 찾는 것은 매우 중요할 것으로 사료된다.

치과용 복합 레진은 레진 기질(resin matrix), 필러(filler), 결합제, 개시제 등으로 구성 되어 있으며³⁾, 이 중 레진 기질 성분은 치주세포에 독성 반응을 일으킨다는 보고가 있다⁴⁾. 특히 레진 기질의 점도를 줄이기 위해, 대부분의 레진을 기본으로 하는 치과 재료들은 치과 처치 중 재료의 용이성을 위해 상당량의 코모노머(comonomer)를 포함하고 있다⁵⁾. 이 TEGDMA는 쉽게 세포막을 통과할 수 있으며 침투 후 세포내 분자들과 구조에 관여 한다⁶⁾. 또한 매우 독성이 강하며⁷⁾ 낮은 아독성(subtoxic) 농도에 유전독성 잠재력을 지니고 있어 다양한 대사적 작용에 영향을 미친다는 보고들⁸⁻¹⁰⁾을 통해 세포 사멸 유도 물질임을 알 수 있다. 이 triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA)의 세포사멸 기전은 주로 세포 내의 활성산소종(ROS, reactive oxygen species)을 유도함으로써 세포의 성장을 정지시켜 치주세포 사멸을 유도한다¹¹⁾. 활성산소종에는 과산화수소, 차아염소산염과 같은 산화제를 포함하며, 이는 세포의 성장, 분화, 사멸에 연관이 있다¹²⁾. 적은 양의 활성산소종은 병원체를 방어하기 위한 체내 신호 전달에 있어서 필수적인 역할을 하지만, 많은 양의 활성산소종 생성은 미토콘드리아 및 DNA와 같은 세포내 유전물질에 손상을 일으켜 체내 면역반응이 잘 일어나지 못하게 함으로써 질병의 가장 큰 원인이 되기도 한다¹³⁾. 하지만 TEGDMA에 의해 생성되는 활성산소종 형성기전과 치주세포의 사멸, 그리고 그에 대한 사멸 억제 연구는 매우 부족한 상태이다.

코엔자임 Q₁₀(Coenzyme Q₁₀)은 다양한 조직과 세포에서 생체 분자의 손상을 막기 위한 유리산소(oxygen radicals) 및 과산화지질(lipoperoxides)에 반응하는 비타민과 같은 항산화제이며, 이러한 코엔자임 Q₁₀은 인체에서 합성되고 뇌 및 다른 조직들에 상당량 존재 한다¹⁴⁾. 특히 코엔자임 Q₁₀은 미토콘드리아 호흡 사슬 복합체의 중요한 구성 요소일 뿐만 아니라 또한 강력한 항산화제이다¹⁵⁾. 코엔자임 Q₁₀은 세포의 미토콘드리아에서 전자전달 연쇄과정을 촉진시켜 세포 내 ATP의 생성과 세포막의 수분을 유지시키고 비타민E와 C를 항산화제로 재활용할 수 있도록 환원시키는 역할을 하며, 지질에 용해되는 강력한 항산화작용으로 세포막의 지질 형성을 억제하여 세포손상을 막아준다¹⁶⁾.

치주질환과 관련된 내인성 항산화제에 관한 연구에서 치주염 환자와 건강한 치주를 가진 사람을 대상으로 국소적, 전신적 총 항산화제의 농도를 측정된 결과 치주염 환자는 유의미하게 내인성 항산화제 농도가 낮았다¹⁷⁾. 또한 치주염과 혈장 내의 비타민 C(ASC, ascorbic acid)의 농도간의 관계에서 치주염환자의 혈장 내 비타민 C의 농도가 낮다고 보고하였다¹⁸⁾.

치주조직에 존재하는 코엔자임 Q₁₀ 결핍 시 치주질환을 유발하여 염증과 세포사멸이 일어나며, 치주염을 가지고 있는 환자로부터 치주조직을 절제하여 관찰한 결과 치주염이 없는 환자에 비해 코엔자임 Q₁₀ 결핍이 관찰되었다¹⁹⁾. 하지만 많은 연구들에서 치주질환 환자를 대상으로 내인성 항산화제들의 변화에 관한 연구들은 있었지만, 항산화제 처리에 따른 치주세포의 사멸억제효과에 관한 연구는 매우 부족한 실정이다.

즉, 여러 가지의 환경적 자극에 따라 자유 라디칼이 증가 또는 감소되거나, 충분한 양의 항산화제가 존재하지 않아 둘 사이의 균형에 장애가 발생하면 치주조직은 산화적 손상이 일어나 치주질환이 발생한다. 따라서 본 연구에서는 TEGDMA에 의한 치주세포의 세포사멸 정도를 확인하고, 항산화제인 코엔자임 Q₁₀ 처리에 따른 세포사멸의 억제효과 정도를 확인하고자 하였다.

연구방법

1. 연구 설계

본 연구는 레진 기질의 기본 구성요소인 TEGDMA에 MDPC-23 세포 노출 시 나타나는 세포 생존율 변화를 확인하고, 항산화제 중 하나로 알려져 있는 코엔자임 Q₁₀의 세포 사멸억제 효과를 관찰하고자 하였다.

2. 연구재료 및 방법

2.1 세포 배양

생쥐로부터 유래된 odontoblast-like cell인 MDPC-23 세포주를 사용하였다. 10%의 fetal bovine serum (FBS, Gibco, Gaithersburg, MD, USA)와 100μg/ml penicillin/streptomycin (P/S, Gibco)이 포함된 DMEM (Gibco, Gaithersburg, MD, USA)으로 세포를 배양하였고, MDPC-23 세포는 96well plate에 1×10⁴ 분주하여 24시간 동안 36℃의 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

2.2. 약물

코엔자임 Q₁₀ (Coenzyme Q₁₀; Sigma, Saint Louis, MO, USA)은 DMSO 용액에 녹인 후, 10 mM의 stock solution을 만들었다. DMEM 배지를 이용하여 5, 10, 50, 100, 500 μm의 코엔자임 Q₁₀을 만들어 3, 6시간 동안 배지에 넣어 배양하고 시간 및 농도별 세포독성을 확인하였다.

Triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA, Sigma)를 FBS와 P/S가 포함된 DMEM 배지에 용해한 후, 10 mM의 stock solution을 만들어 사용하였다. Stock solution은 DMEM 배지

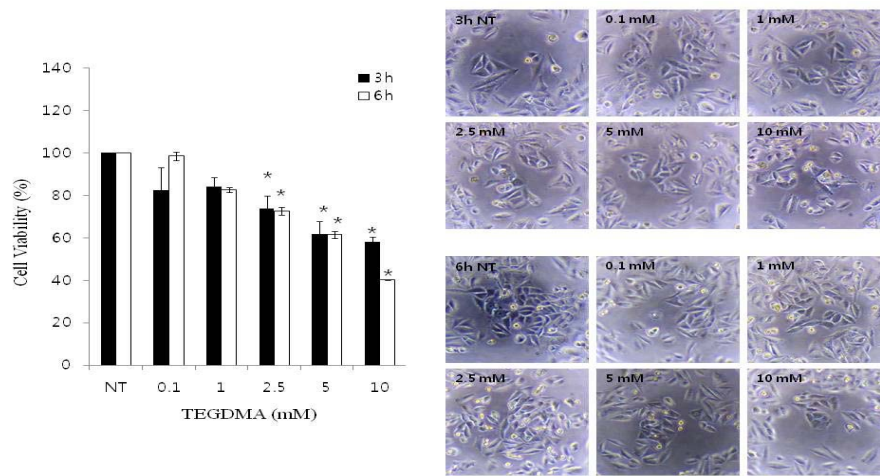


Fig. 1. Effect of triethylene glycol dimethacrylate(TEGDMA) on the growth of MDPC-23 cells. Cells(1×10^4 cells) in 96-well culture dish were exposed to TEGDMA for 3 or 6 h. Cell viability was measured with WST-1 assay. *Denotes marked difference when compared with control($p < 0.05$)

를 이용하여 0.1, 1, 2.5, 5, 10 mM TEGDMA 농도로 만들고 3, 6시간 동안 세포를 배양한 후 세포독성 농도를 관찰하였다.

2.3. TEGDMA와 코엔자임 Q₁₀ 약물처리

실험 1군은 코엔자임 Q₁₀의 약물효과를 확인하기 위해 1시간 전 세포배양액에 약물을 넣어 세포를 배양하고, 그 후 세포 사멸을 유발하는 5mM의 TEGDMA에 1시간 동안 노출시켜 사멸억제 효과를 6, 24, 48시간에 확인하였다. 실험 2군은 TEGDMA 5mM을 1시간 동안 노출시킨 후 세포배양 배지로 교환하고 6, 24, 48시간에 세포 사멸 정도를 확인 하였다. 대조군으로 MDPC-23 세포에 약물을 넣지 않은 세포배양 배지만 적용하였다.

2.4. 세포 생존율 측정

세포의 사멸 정도는 WST-1 (EZ-CYTOX, Dogen Bio, Seoul, Korea)용액을 이용하여 ELISA assay (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 450nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. MDPC-23 세포를 96well plate에 1×10^4 분주하여 24시간 동안 배양한 후 세포의 상층 배지를 제거하고, 코엔자임 Q₁₀(5~500 μ m) 또는 TEGDMA(0.1~10 mM)를 농도별로 3, 6시간 동안 반응시켰다. 그 후 각각의 well에 WST-1 용액을 10 μ l씩 분주하고 1시간동안 배양기에서 반응시켰다. 반응처리 후, 450nm 파장에서 ELISA를 이용하여 생존해 있는 세포 수를 측정하였고 각각의 분석은 세 번 반복 시행한 실험결과를 바탕으로 적정 농도를 정하였다.

2.5. Reactive Oxygen Species (ROS) 염색

24well plate에 5×10^3 MDPC-23 세포를 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 상층액을 제거하고 대조군과 실험군들에 각각의 약물을 넣어 배양하고 활성산소종(ROS)의 발현정도를 확인하는 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma) 형광 염색시약 4 μ M을 배양된 세포에 넣었다. 염색시약에 20분간 배양한 후, 형광현미경 TH4-200(Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 세포의 활성산소종 발현 정도를 확인하였다. 염색된 세포는 Image J를 이용하여 형광을 수치화하였다. 이러한 수치는 DCFH-DA에 의한 형광의 세기를 보여주는 것으로 활성산소종 발현이 높을수록 증가한다.

3. 통계 처리 분석

대조군과 실험군들의 통계 처리 결과는 통계프로그램인 IBM SPSS Statistics 21(SPSS Inc., NY, USA)을 통해 paired T-test statistical method를 이용하였다. $p < 0.05$ 는 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였으며, 독립적인 실험을 3회 이상 시행하여 나온 결과를 통해 평균과 표준편차를 산출하였다.

연구 결과

1. TEGDMA에 의한 MDPC-23 세포 사멸

MDPC-23 치아세포에 복합레진의 성분인 TEGDMA의 농도별(0.1, 1, 2.5, 5, 10 mM) 및 시간별(3과 6시간) 세포 생존율에 미치는 영향을 확인하고자 WST-1 분석을 하였다(Fig. 1).

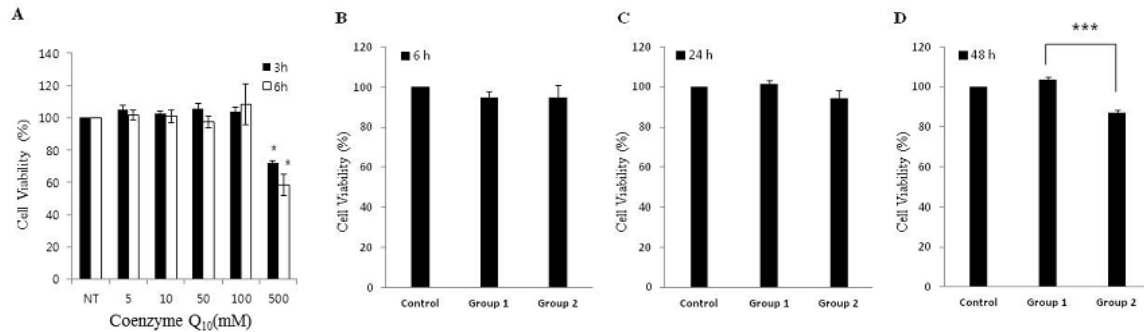


Fig. 2. Coenzyme Q10 showed cell proliferation in most concentrations(5-500 μ M) by WST-1 assay on MDPC-23(A). 6 h(B), 24 h(C), and 48 h(D) after pre-treatment coenzyme Q10 showed the antioxidant effect on proliferation/ viability of MDPC-23. *Denotes marked difference when compared with group 1 ($p < 0.05$)

MDPC-23 치아세포에 TEGDMA의 농도별 처리 3시간 후, 농도 증가에 따른 세포섬유(cell fiber)가 위축되어지고 형태학적 변형이 일어남을 확인하였다. 또한 각각의 농도 처리 군에서 82, 83, 73, 61, 57%로 세포생존율이 감소함을 확인하였다. TEGDMA의 농도별 처리 6시간 후에는 세포의 형태학적 변화 뿐만 아니라, 세포 수 감소도 관찰되었다. WST-1 검사에서 98, 82, 72, 61, 40% 농도 의존적인 세포생존율 감소를 확인함으로써, TEGDMA가 치아세포 사멸을 유발하는 것을 확인하였다.

2. 코엔자임 Q₁₀의 세포 사멸억제 효과

코엔자임 Q₁₀의 세포생존에 영향을 주지 않는 적정 농도를 확인하기 위하여 농도별(5~500 μ M)처리를 하고 3과 6시간에 WST-1 분석을 하였다(Fig. 2A). 농도별 코엔자임 Q₁₀ 3시간 처리 시, 105, 102, 105, 103, 71%를 나타냈으며, 6시간 적용 시, 101, 101, 97, 108, 58%로 확인하였다. 따라서 고농도의 코엔자임 Q₁₀ 500 μ M을 제외하고는 세포생존에 영향을 주지 않음을 확인하였으며, 안정적인 효과를 보이는 코엔자임 Q₁₀ 50 μ M을 약물효과 실험에 사용하였다.

코엔자임 Q₁₀의 세포사멸 억제 효과를 확인하기 위해 코엔자임 Q₁₀ 50 μ M을 1시간 전 처리한 후, 세포 사멸을 유도하는 TEGDMA 5 mM을 처리하여 코엔자임 Q₁₀의 세포사멸 억제효과를 확인하였다. 대조군과 실험군들 간의 시간에 따른 약물 효과를 확인한 결과 약물 처리 6시간 후에는 100, 94, 90%로 유사하게 나타났으며(Fig. 2B), 24시간에서는 100, 101, 87%로 코엔자임 Q₁₀을 전 처리한 후 TEGDMA를 처리한 실험 1군의 경우 24시간이 지나도 대조군과 유사하게 세포 생존율이 유지됨을 보였다(Fig. 2C). 약물 처리 48시간 이후에는 세포생존율이 100, 104, 77%로 나타나 코엔자임 Q₁₀을 전 처리 한 실험 1군에서 TEGDMA 약물만을 처리한 실험 2군에 비해 유의미하게 MDPC-23 치주세포 사멸을 억제함을 확인하였다(Fig. 2D).

3. 세포사멸에 관여하는 활성산소종(ROS) 발현

코엔자임 Q₁₀의 약물에 의한 활성산소(ROS) 발현 억제 정도를 확인하기 위하여 각각의 약물을 처리한 실험군들의 MDPC-23 치아세포에 DCFH-DA 형광염색을 한 후 형광현미경으로 확인 하였을 때, 형태학적으로 세포질 내에 많은 양의 활성산소종이 발현되는 것이 관찰되었다(Fig. 3A). 또한 발현되는 활성산소종양을 Image J를 이용하여 형광 수치화한 결과 실험 1군은 14.715임에 비해 실험 2군에서는 19.788로 나타나 코엔자임 Q₁₀에 의해 TEGDMA로 유발되는 세포사멸에 관여하는 활성산소종 형성이 억제되는 것을 확인 하였다(Fig. 3B).

총괄 및 고안

본 연구에서는 레진 기질의 기본 구성요소인 TEGDMA에 MDPC-23 세포 노출 시 나타나는 세포 사멸정도를 확인하고, TEGDMA에 의해 유도된 세포 사멸에 대하여 강력한 항산화제 중 하나로 알려져 있는 코엔자임 Q₁₀의 세포 사멸억제 효과 여부에 관하여 확인하고자 하였다.

TEGDMA는 구강 내 사용되는 레진 합성물의 중합체로서 구강 환경에서 쉽게 체내로 분리 배출되며, 세포질 및 지질 막과 같은 다양한 세포 구성요소에 침투되고 분산 진다^{6,9}. 이에 레진 사용으로 인한 TEGDMA의 치주세포 노출 가능성이 높고, 세포 내 미토콘드리아 기능 이상을 야기하고 세포 주기에도 관여하며 세포의 성장을 억제 및 사멸을 유발한다^{4,10}. 최근 연구에서 TEGDMA가 농도 의존적으로 치주세포(dental pulp cell)의 성장을 억제하고 그 억제 기전은 세포 주기와 관련됨을 관찰한 보고가 있다²⁰. 이는 본 연구에서 배양된 MDPC-23 세포에 TEGDMA의 농도별(0.1, 1, 2.5, 5, 10 mM)처

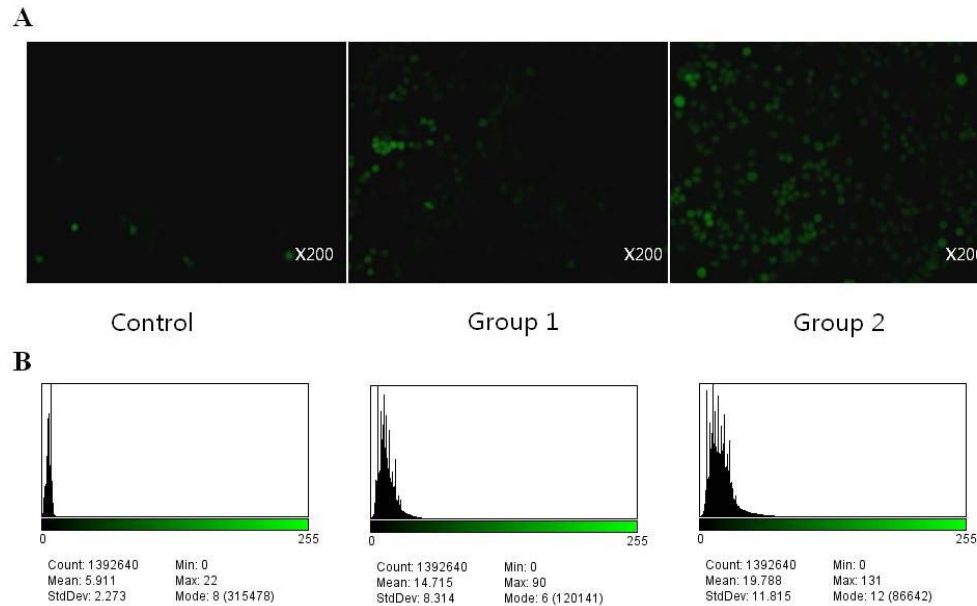


Fig. 3. Representative images of immunofluorescent staining for DCF-DA(green), an ROS indicator, in MDPC-23(A). The statistic number of fluorescence positive cells using image J(B)

리 시 농도 의존적으로 세포생존율이 감소하며 형태학적 변화를 보이는 결과와 일치한다. 레진 복합체 처리 24시간 후부터 약 0.9~3mM 정도의 TEGDMA가 분비되고 이러한 농도는 유의미하게 세포의 생존율을 떨어뜨리며, 세포내의 활성산소종(ROS) 과다분비에 의한 세포독성 작용으로부터 세포를 보호하는 역할을 하는 glutathione(GSH)의 양을 줄인다는 보고가 있다²¹⁾. 이는 본 연구에서 사용된 5mM 농도보다 낮지만, 치수세포(pulp cell)에서 TEGDMA와 H₂O₂의 작용에 관한 연구에서 확인된 1~5mM의 세포독성 실험²⁰⁾과는 일치함을 보였다. 이에 본 연구에서 항산화제 약물 효과를 확인하기 위해 세포손상 유발에 사용된 TEGDMA 5mM 농도는 적절하다고 사료된다. Janke 등²²⁾은 TEGDMA가 사람의 치주세포(HGF, human gingival fibroblast)에 농도와 시간에 따른 세포 사멸사(apoptosis)를 유발한다고 보고하였고, 이는 TEGDMA 처리 시간이 길어질수록 그리고 농도가 높을수록 더 많은 세포의 생존율이 낮아지는 본 연구 결과와 유사하다.

항산화제의 기능은 주로 자유라디칼의 형성을 억제하거나, 연쇄적 개시를 막기 위해 자유라디칼을 없애는 역할을 하여 연쇄적 전파를 중단시키며, 손상을 치유하고 막 구조를 재구성하는 역할을 한다. 활성산소종(ROS)이 증가하면 치주조직에 산화적 손상(oxidative damage)이 일어나고 이러한 활성산소종을 막을 수 있는 물질로서 항산화제는 모든 체액 및 조직 내에 존재하며, 이들에 의해 내인성 자유 라디칼에 대한 보호 작용이 나타난다¹⁰⁾. 다양한 내인성 항산화제 중 코엔자임 Q₁₀

은 항산화작용과 더불어 미토콘드리아의 활성화와 면역에도 기여를 하며²³⁾, 이러한 항산화제로 잘 알려져 있는 코엔자임 Q₁₀은 치과 임상 연구에서 만성치주염 환자의 염증성 반응을 개선한다는 보고가 있다²⁴⁾. 본 연구에서는 세포에 손상을 일으키지 않는 적정 농도를 확인하기 위해 다양한 농도(5~500 μM)의 코엔자임 Q₁₀ 처리 시 고농도를 제외하고는 세포 생존율에 영향을 미치지 않음을 확인하였다. 본 연구에서는 세포에 영향을 미치지 않는 농도인 50μM을 사용하였으며, 이는 세포실험에 사용되는 일반적인 코엔자임 Q₁₀ 농도에서 렌즈 표피세포의 산화적 손상에 대한 코엔자임 Q₁₀의 보호효과를 관찰한 연구에서 사용되어진 36 또는 76μM 농도처리와 유사하고²⁵⁾, 신경세포에 대한 항산화제로 사용된 코엔자임 Q₁₀ 농도인 50μM과는 일치하므로 본 실험에 사용된 코엔자임 Q₁₀ 농도는 적절하였다고 사료된다.

임상연구에서 치주질환을 가진 환자에게 코엔자임 Q₁₀을 처방하면 손상된 치주조직내의 코엔자임 Q₁₀ 양을 증가시키고 치주염이 심하게 진행되는 것을 억제하는데 매우 효과적이라는 결과²⁷⁾는 본 연구의 TEGDMA에 의해 유발되는 산화적 손상에 따른 세포 사멸 기전을 코엔자임 Q₁₀이 항산화제로 작용하여 세포보호 효과를 나타내는 본 연구 결과를 지지한다. 또한 산화적 세포손상을 유발한 후 배양된 사람의 치주세포에 비타민 C 또는 N-acetylcysteine (ACC)와 같은 항산화제를 첨가하였을 때 DNA손상이 감소되어 세포사멸이 억제된다는 연구결과²⁸⁾와 일치함을 보였다.

활성산소종이 활성화된 수준은 지질과 아미노산뿐만 아니라 탄수화물 및 DNA의 손상을 유발하는 등 생물학적 변화를 일으키는 중요한 분자요인으로 작용한다. 이러한 세포의 반응들은 결국 세포의 사멸 또는 돌연변이에 이르게 하여 세포의 기능에 심각한 변화가 발생된다¹⁶⁾. 이전 연구 결과에서 섬유아세포에 치과재료에 의해서 유발된 화학 침출물들이 세포사멸, 세포괴사 또는 사멸과 괴사 모두를 일으킨다고 보고되었다²²⁾. 본 연구에서는 TEGDMA가 유발하는 세포내의 활성산소종 수준을 확인한 결과 활성산소종이 증가하였으며, 코엔자임 Q₁₀을 처리한 경우 활성산소종 수준이 TEGDMA에 의해 유발된 활성산소종 수준보다 감소하였다. 이는 TEGDMA가 활성산소종 수준을 증가시키고, 이와 관련되어진 GSH 수준을 감소시키며, 이러한 활성산소 생성은 레진 단량체 노출 후 반응하는 면역세포의 반응에 중요한 요소로 세포의 사멸사와 분화저해를 유도한다는 연구 결과²¹⁾와 일치한다. 자유 라디칼 및 활성산소종과 항산화작용 사이의 균형은 건강한 치주조직을 유지하는데 있어 분명한 우선조건임은 명백하다. 결과적으로 코엔자임 Q₁₀의 처리는 TEGDMA에 의한 치주의 산화적 손상을 감소시켜 치아세포를 보호하므로, 코엔자임 Q₁₀의 처리는 여러 가지 치과재료들로부터 유발되는 치주조직 손상을 억제할 뿐만 아니라 치주염을 개선하는데 관여할 것이라 사료된다.

따라서 이후 구강 내 다양한 세포들의 산화적 손상에 따른 내인성 항산화제가 아닌 항산화제의 처리에 따른 세포사멸 억제에 관한 연구와 사멸억제와 관련된 세포내 기전에 관한 추후 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

결론

다양한 치과재료의 발달로 치료의 편리성과 용이함이 발달되어 지고 있지만, 사용되는 치과재료의 유해성 정도와 구강 내 발생할 수 있는 기전에 관한 연구는 많이 부족하다.

본 연구에서는 대부분의 레진에 사용되는 기질의 성분인 TEGDMA가 치주세포의 일종인 MDPC-23 세포 처리하였을 경우 나타나는 세포 생존율 변화를 확인하고, TEGDMA에 의해 유도된 세포 사멸에 대하여 항산화제로 알려져 있는 코엔자임 Q₁₀의 세포 사멸억제 효과 여부에 관하여 확인하고자 하였으며, 이에 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. MDPC-23 치주세포에 복합레진의 성분인 TEGDMA의 농도별(0, 1, 2.5, 5, 10 mM) 및 시간별(3과 6시간) 세포 생존율을 확인한 결과, 농도별 처리 3시간 후, 농도 증가에 따른 세포섬유(cell fiber)가 위축되고 형태학적 변형이

일어나고, 82, 83, 73, 61, 57%로 세포생존율이 감소함을 확인하였다. 또한 농도별 처리 6시간 후에는 세포의 형태학적 변화뿐 만 아니라, 세포 수 감소와 함께 98, 82, 72, 61, 40% 농도 의존적인 세포생존율 감소를 보였다.

2. 코엔자임 Q₁₀의 세포에 영향을 주지 않는 적정 농도를 확인하기 위하여 농도별(5~500μM)처리를 하고 3과 6시간에 세포생존율을 확인한 결과, 고농도의 코엔자임 Q₁₀ 500μM을 제외하고는 세포생존에 영향을 주지 않았다. 코엔자임 Q₁₀의 세포사멸 억제 효과를 확인한 결과 코엔자임 Q₁₀을 전 처리한 실험 1군에서 TEGDMA 약물만을 처리한 실험 2군에 비해 유의미하게 MDPC-23 치주세포 사멸을 억제함을 확인하였다
3. 코엔자임 Q₁₀의 약물에 의한 활성산소(ROS) 발현 억제 정도를 확인한 결과 형광현미경 관찰에서 형태학적으로 세포질 내에 많은 양의 ROS가 발현되는 것이 관찰되었다. Image J를 이용하여 형광을 수치화한 결과 실험 1군의 14.715에 비해 실험 2군에서는 19.788로 나타나 코엔자임 Q₁₀에 의해 TEGDMA로 유발되는 세포사멸에 관여하는 활성산소종 형성을 억제함을 관찰하였다.

따라서 본 연구를 바탕으로 치주질환 예방과 만성적 치주염 치료에 있어 적절한 항산화제 치료요법(antioxidant therapy)과 다양한 구강세포 종류에 대한 항산화적 운반 시스템을 연구하는 것이 필요할 것으로 사료된다.

References

1. Lee YK, Park JR. The relationship of obesity and periodontal disease by age. J Korean Soc Dent Hyg 2013; 13(6): 1015-21. <http://dx.doi.org/10.13065/jksdh.2013.13.06.1015>.
2. Choi BBR. Effect of autophagy in human tongue squamous cell carcinoma SCC 25 cells from Scutellariae Radix by ethanol extract. J Korean Soc Dent Hyg 2014; 14(2): 287-92. <http://dx.doi.org/10.13065/jksdh.2014.14.02.287>.
3. Ferracane JL. Current trends in dental composites. Crit Rev Oral Biol Med 1995; 6(4): 302-18. <http://dx.doi.org/10.1177/10454411950060040301>.
4. Issa Y, Watts DC, Brunton PA, Waters CM, Duxbury AJ. Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro. Dent Mater 2004; 20(1): 12-20. [http://dx.doi.org/10.1016/S0109-5641\(03\)00053-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0109-5641(03)00053-8).
5. Bakopoulou A, Papadopoulou T, Garefis P. Molecular toxicology of substances released from resin-based dental restorative materials. Int J Mol Sci 2009; 10(9): 3961-99. <http://>

- dx.doi.org/10.3390/ijms10093861.
6. Engelmann J, Leyhausen G, Leibfritz D, Geurtsen W. Metabolic effects of dental resin components in vitro detected by NMR spectroscopy. *J Dent Res* 2001; 80(3): 869–75. <http://dx.doi.org/10.1177/00220345010800030501>.
7. Stanislawski L, Lefeuvre M, Bourd K, Soheili-Majd E, Goldberg M, Périain A. TEGDMA-induced toxicity in human fibroblasts is associated with early and drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species. *J Biomed Mater Res A* 2003; 66(3): 476–82. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.10600>.
8. Jang JH, Kim YI, Lee H. Antimicrobial activity of Prunus mume extract to oral microbes. *J Korean Soc Dent Hyg* 2014; 14(1): 109–15. <http://dx.doi.org/10.13065/jksdh.2014.14.01.109>.
9. Schweikl H, Schmalz G, Rackebbrandt K. The mutagenic activity of unpolymerized resin monomers in Salmonella typhimurium and V79 cells. *Mutat Res* 1998; 415(1–2): 119–30. [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718\(98\)00067-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718(98)00067-9).
10. Kleinsasser NH, Wallner BC, Harréus UA, Kleinjung T, Folwaczny M, Hickel R, et al. Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. *J Dent* 2004; 32(3): 229–34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2003.11.002>.
11. Lefeuvre M, Amjaad W, Goldberg M, Stanislawski L. TEGDMA induces mitochondrial damage and oxidative stress in human gingival fibroblasts. *Biomaterials* 2005; 26: 5130–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.01.014>.
12. Rajendran P, Nandakumar N, Rengarajan T, Palaniswami R, Gnanadhas EN, Lakshminarasiah U, et al. Antioxidants and human diseases. *Clin Chim Acta* 2014; 436(25): 332–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2014.06.004>.
13. Chen SJ, Allam JP, Duan YG, Haidl G. Influence of reactive oxygen species on human sperm functions and fertilizing capacity including therapeutical approaches. *Arch Gynecol Obstet* 2013; 288(1): 191–9. <http://dx.doi.org/10.1007/s00404-013-2801-4>.
14. Wajda R, Zirkel J, Schaffer T. Increase of bioavailability of coenzyme Q(10) and vitamin E. *J Med Food* 2007; 10: 731–4. <http://dx.doi.org/10.1089/jmf.2006.254>.
15. Young AJ, Johnson S, Steffens DC, Doraiswamy PM. Coenzyme Q10: a review of its promise as a neuroprotectant. *CNS Spectr* 2007; 12(1): 62–8.
16. Engel RHI, Evens AM. Oxidative stress and apoptosis: a new treatment paradigm in cancer. *Front Biosci* 2006; 11: 300–12.
17. Brock GR, Butterworth CJ, Matthews JB, Chapple IL. Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health. *J Clin Periodontol* 2004; 31(7): 515–21. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-051X.2004.00509>.
18. Kuzmanova D, Jansen ID, Schoenmaker T, Nazmi K, Teeuw WJ, Bizzarro S, et al. Vitamin C in plasma and leucocytes in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol* 2012; 39(10): 905–12. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-051X.2012.01927>.
19. Wilkinson EG, Arnold RM, Folkers K. Bioenergetics in clinical medicine. VI. adjunctive treatment of periodontal disease with coenzyme Q10. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1976; 14(4): 715–9.
20. Chang HH, Chang MC, Huang GF, Wang YL, Chan CP, Wang TM, et al. Effect of triethylene glycol dimethacrylate on the cytotoxicity, cyclooxygenase-2 expression and prostanoids production in human dental pulp cells. *Int Endod J* 2012; 45(9): 848–58. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2591.2012.02042>.
21. Schweikl H, Altmannberger I, Hanser N, Hiller KA, Bolay C, Brockhoff G, et al. The effect of triethylene glycol dimethacrylate on the cell cycle of mammalian cells. *Biomaterials* 2005; 26(19): 4111–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.026>.
22. Janke V, von Neuhoff N, Schlegelberger B, Leyhausen G, Geurtsen W. TEGDMA causes apoptosis in primary human gingival fibroblasts. *J Dent Res* 2003; 82(10): 814–8. <http://dx.doi.org/10.1177/154405910308201010>.
23. Turunen M, Olsson J, Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1660(1–2): 171–99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmem.2003.11.012>.
24. Hanioka T, Tanaka M, Ojima M, Shizukuishi S, Folkers K. Effect of topical application of coenzyme Q10 on adult periodontitis. *Mol Aspects Med* 1994; 15: s241–8.
25. Wang S, Zhang J, Jiang T, Zheng L, Wang Z, Zhang J, et al. Protective effect of Coenzyme Q(10) against oxidative damage in human lens epithelial cells by novel ocular drug carriers. *Int J Pharm* 2011; 403(1–2): 219–29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.10.020>.
26. Noh YH, Kim KY, Shim MS, Choi SH, Choi S, Ellisman MH, et al. Inhibition of oxidative stress by coenzyme Q10 increases mitochondrial mass and improves bioenergetic function in optic nerve head astrocytes. *Cell Death Dis* 2013; 4: e820. <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2013.341>.
27. Hans M, Prakash S, Gupta S. Clinical evaluation of topical application of perio-Q gel (Coenzyme Q(10)) in chronic periodontitis patients. *J Indian Soc Periodontol* 2012; 16(2): 193–9. <http://dx.doi.org/10.4103/0972-124X.99261>.
28. Lottner S, Shehata M, Hickel R, Reichl FX, Durner J. Effects of antioxidants on DNA-double strand breaks in human gingival fibroblasts exposed to methacrylate based monomers. *Dent Mater* 2013; 29(9): 991–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2013.07.005>.

