

체외에서 배양된 구강 내 정상세포에 불화나트륨이 미치는 영향

최별보라 · 김다혜 · 김지영¹ · 박상례¹동서대학교 치위생학과 · ¹경남정보대학교 치위생과

The effects of sodium fluoride on oral normal cell cultured *in vitro*

Byul-Bora Choi · Da-Hye Kim · Ji-Young Kim¹ · Sang-Rye Park¹Department of Dental Hygiene, Division of Health Sciences, Dongseo University · ¹Department of Dental Hygiene, Kyungnam College of Information & Technology

*Corresponding Author: Sang-Rye Park, Department of Dental Hygiene, Kyungnam College of Information & Technology, Busan, Rep. Korea, 617-701, Tel: +82-51-320-2927, Fax: +82-51-320-2925, E-mail: sanglye5@naver.com

Received: 25 March 2016; Revised: 22 June 2016; Accepted: 24 June 2016

ABSTRACT

Objectives: Fluoride is widely used in the prevention and control of dental caries. The purpose of this study is to examine the biological effects of Sodium fluoride on the proliferation of oral normal cell *in vitro* (MDPC-23, HaCaT, HGF-1 cells).

Methods: The proliferation of normal cells and the cyto-skeletal change of normal cells were assessed by WST-1 assay and F-actin stain assay. The statistical significances of the resulting data were analyzed using SPSS(Window 12.0).

Results: The sodium fluoride(0-12 mM) treatment decreased the cell viability in a dose and time dependent manner: HaCaT(6 h): 100±0, 98±0.39, 82±2.68, 75±0.83, 69±1, 67±1.42%(p<0.005); HaCaT(24 h): 100±0, 98±1.85, 54±0.64, 43±0.4, 38±0.32, 36±0.13%(p<0.006), MDPC-23(6 h): 100±0, 93±1.48, 85±0.28, 82±1.58, 79±1.48, 76±1.93%(p<0.009); MDPC-23(24 h): 100±0, 91±1.26, 58±0.65, 49±1, 44±0.74, 2±0.05%(p<0.005), HGF-1(6 h): 100±0, 97±2.93, 89±5, 71±5.42, 58±4.82, 43±3.47%(p<0.009); HGF-1(24 h): 100±0, 97±2.05, 73±1.73, 22±1.61, 14±1.73, 7±0.85%(p<0.005). Thus, changes in cell morphology and disruption of filamentous(F)-actin organization were observed in higher concentration.

Conclusions: These results suggest that higher concentrations of fluoride lead to a reduce the number of cells and morphology change of normal cell.

Key Words: human gingival fibroblast, keratinocyte, odontoblast, sodium fluoride

색인: 불화나트륨, 사람잇몸섬유모세포, 상아모세포, 피부각질세포

서론

치아우식증(dental caries)은 구강 내에서 발생하는 질환으로 치주질환과 함께 대표적인 만성 구강병으로 알려져 있다[1]. 치아우식증은 구강 내의 세균이 단당류를 대사하여

산을 생성해 치면세균막 내의 수소이온농도(pH)가 높아짐으로써 치아경조직의 탈회를 유발하는 질환이다[2]. 이때 발생한 초기 치아우식증을 치료하지 않고 방치할 경우 치아우식증이 치수 및 치근단까지 도달하게 되어 치아 주위조직의 파괴 및 치아 상실의 가장 큰 원인이 되기도 한다. 치아우식증을 예방하기 위하여 다양한 제제 및 방법들이 제시되고 있으며, 그 중 가장 대표적인 것이 불소이다[3]. 불소는 할로겐 원소군의 하나로 법랑질이 파괴되는 것을 지연시키고 광물질 재생을 유도하며, 재생된 법랑질은 내산성이 증

가하므로 현재 치아우식증 예방 효과가 매우 뛰어난 것으로 알려져 있다[4]. 이러한 효과로 인해 불소는 양치액, 세치제, 음료수, 젤 등의 형태로 공급되어 치아우식증 예방 수단으로 많이 쓰이고 있다. 불소는 주로 양치법이나 도포법으로 적용하며, 간편하고 저농도로 사용하기 때문에 안전하다는 장점이 있다. 불소 중 치아우식증 예방제제로 가장 많이 사용되는 불화나트륨은 다양한 농도로 구강 내 양치액으로 사용되고 있으며, 매일 양치 시에는 0.05%, 이주일마다 한번 양치 시에는 0.2%의 농도로 사용한다. 이렇듯 일반적으로 쓰이는 저농도의 불소는 인체에 무해하고 안전한 것으로 알려져 있으며, 미량의 불소는 신장을 통해 배설된다고 알려져 있다[5]. 그러나 최근 불소의 안전성에 대한 논란이 많이 제기되면서 예방의 목적으로 사용되는 불소에 대한 사람들의 의구심이 점차 커져가는 실정이다. 따라서 수돗물불소화 혹은 치약에 함유되어 있는 불소의 농도와 함유량에 있어 세포에 안전성을 나타내는 명확한 기준이 필요하다 할 수 있다. Bartlett 등[6]은 많은 양의 불소를 지나치게 높은 농도로 사용할 경우 배양된 세포의 성장을 억제하는 성장저해작용이 있으며, 단백질 및 DNA 합성을 억제하는 효과가 있다고 하였다[7-9]. 불소는 구강 내에 직접 접촉하여 치아우식 예방 효과를 나타내므로 구강 조직의 특징에 대한 이해가 필요하다. 구강점막과 치은은 외부 환경으로부터 구강을 보호하며 상피와 결합조직으로 구성되어 있으며, 상피조직은 각질화된 세포로 구성된 각질세포로 이루어져 있다[10]. 이러한 각질세포는 주기적으로 탈락과 생성을 반복하며 끊임없이 재생되고, 상처의 치유에도 관여한다. 또한, 상아모세포 손상을 받을 경우 수복상아질을 형성하여 치아를 보호하는 역할을 하며[11], 치주조직을 구성하는 치은섬유모세포의 경우 조직의 재생에 관여하는 것으로 보고되고 있다[12]. 현재까지 불소의 치아우식증을 예방기전에 대해서는 많은 자료가 보고되고 있으나[13], 정상 세포에 대한 불소의 영향은 아직 명확히 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구는 사람 각질세포 HaCaT, 치은섬유모세포 HGF-1, 상아질모세포 전구세포인 MDPC-23 세포를 체외에서 배양하여 구강과 관련한 정상세포에서 불소가 어떠한 영향을 미치는지 알아보고 농도 및 시간에 따라서 세포 성장 변화가 일어나는지 확

인하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 세포 주 및 세포배양

본 실험에 사용한 세포는 HaCaT, MDPC-23, 그리고 HGF-1이다. 각각의 세포는 구강과 관련된 정상세포로 American Type Culture Collection(Rockville, MD, USA)에서 분양 받아 본 실험에 사용하였다. 세포를 배양하면서 사용한 배지와 조건은 <Table 1>과 같다.

2. 불화나트륨 처리

구강과 관련된 각각의 세포는 96-well 배양용기에 1×10^4 으로 분주한 뒤 24시간 동안 배양하였다. 실험에 사용된 불화나트륨은 DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)에 희석하여 농도를 0 mM에서 12 mM로 정하여 사용하였다. 각각의 세포에 희석된 불화나트륨(0 mM-12 mM)을 처리한 다음 6시간, 24시간 동안 5% CO₂배양기에 배양하였다.

3. 세포 성장률 측정

불화나트륨이 세포 성장률에 미치는 효과를 측정하기 위하여 WST-1 방법을 이용하였다. 96-well plate에서 1×10^4 으로 분주한 뒤 24시간 배양하였다. 24시간 뒤 세포의 상층 배지를 제거한 다음, 불화나트륨(0 mM-12 mM)을 처리하였다. 처리된 세포는 6시간, 24시간을 배양한 다음 각각의 well에 WST-1 용액을 처리하여 2시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 반응시켰다. 이후 ELISA reader(Sunrise Remote Control, Tecan, Austria)로 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 각각의 분석은 독립적으로 세 번씩 시행하였다.

4. 세포의 핵과 Filamentous(F)-actin 염색

불화나트륨이 세포 내의 골격 배열에 미치는 영향을 확인하기 위해 F-actin염색을 하였다. Cover slip에 50 µg/ml 농도

Table 1. The cell culture condition of oral normal cells

Cell name	Organism	Media	Serum	Antibiotics	Cell condition
MDPC-23	Mouse odontoblast like cell	Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)	Fetal Bovine Serum(10%)	100X Penicillin-Streptomycin (1%)	37°C, 5% CO ₂ incubator
HaCaT	Human Keratinocyte	Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)	Fetal Bovine Serum(10%)	100X Penicillin-Streptomycin (1%)	37°C, 5% CO ₂ incubator
HGF-1	Human gingival fibroblast	Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)	Fetal Bovine Serum(10%)	100X Penicillin-Streptomycin (1%)	37°C, 5% CO ₂ incubator

의 콜라겐을 사용하여 코팅시킨 후 DPBS로 세척하였다. 그런 다음 Cover slip에 각각의 세포를 3×10^4 으로 분주한 뒤 24시간 동안 배양하였다. 24시간 뒤 불소를 처리하기 위해 세포의 상층 배지를 제거한 다음, 불화나트륨(0 mM-12 mM)을 처리하였다. 처리된 세포는 다시 24시간을 배양한 후 DPBS로 세척하였다. 그 후 4% Paraformaldehyde 용액으로 고정을 하고 다시 0.1% Triton X-100을 이용하여 10분간 세포막을 투과시킨 뒤 3% bovine serum albumin(Bio-Rad, Hercules, CA)용액을 1시간 동안 처리하였다. Rhodamine phalloidin을 1% BSA에 희석한 다음 30분간 빛을 차단한 37°C에 반응시켰다. 마지막으로 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)가 포함된 용액(Molecular Probes, CA, USA)으로 봉입한 다음 공초점 레이저 현미경 LSM 700(Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

5. 통계 분석

불화나트륨이 처리되지 않은 대조군과 처리된 실험군의 결과는 통계 프로그램인 SPSS(Window 12.0)에 의해 비모

수 검정 방법인 Kruskal-Wallis test를 적용하여 분석하였다. 나타난 결과는 평균과 표준 오차로 표시하였다.

연구성적

1. 불화나트륨이 구강 내 정상세포에 미치는 영향

불화나트륨이 구강 내 정상세포의 증식 능력에 미치는 영향을 WST-1 분석을 통해 확인하였다. 불화나트륨(0-12 mM)을 처리한 후 6시간이 지난 MDPC-23 세포에서는 100 ± 0 , 93 ± 1.48 , 85 ± 0.28 , 82 ± 1.58 , 79 ± 1.48 , $76 \pm 1.93\%$ ($p < 0.009$)의 감소율을 보였으며 24시간이 지난 후에는 100 ± 0 , 91 ± 1.26 , 58 ± 0.65 , 49 ± 1 , 44 ± 0.74 , $2 \pm 0.05\%$ ($p < 0.005$)의 감소율을 보였다(Fig. 1(B)). 불화나트륨(0-12 mM)을 6시간 동안 처리 후 사람각질세포인 HaCaT 세포에서는 100 ± 0 , 98 ± 0.39 , 82 ± 2.68 , 75 ± 0.83 , 69 ± 1 , $67 \pm 1.42\%$ ($p < 0.005$)의 감소율을 보였으며 24시간이 지난 후에는 100 ± 0 , 98 ± 1.85 , 54 ± 0.64 , 43 ± 0.4 , 38 ± 0.32 , $36 \pm 0.13\%$ ($p < 0.006$)의 감소율을 보였다

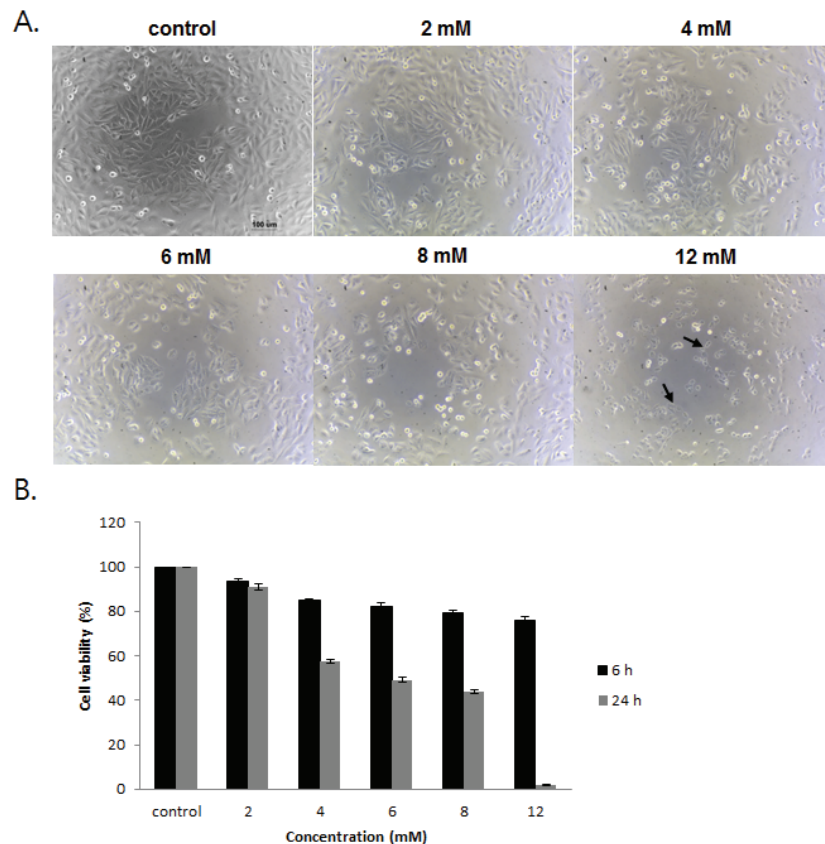


Fig. 1. Effects of NaF in MDPC-23 cells. (A) Cell morphological change was observed by microscope. (B) Cell viability was measured by WST-1 assay(6 h: $p < 0.009$, 24 h: $p < 0.005$).

<Fig. 2(B)>. 불화나트륨(0-12 mM)을 처리하고 6시간이 지난 HGF-1 세포에서는 100 ± 0 , 97 ± 2.93 , 89 ± 5 , 71 ± 5.42 , 58 ± 4.82 , $43 \pm 3.47\%$ ($p < 0.009$)의 감소율을 보였으며 24시간이 지난 후에는 1100 ± 0 , 97 ± 2.05 , 73 ± 1.73 , 22 ± 1.61 , 14 ± 1.73 , $7 \pm 0.85\%$ ($p < 0.005$)의 감소율을 보였다<Fig. 3(B)>. 구강과 관련된 세포에서 불화나트륨의 농도가 증가하고 시간이 지날수록 세포의 생존률이 감소하는 것을 확인하였다.

2. 불화나트륨이 구강 내 정상세포에 미치는 형태학적 변화

상아질모세포 전구세포인 MDPC-23 세포, 사람각질형성 세포인 HaCaT 세포 및 치은섬유모세포인 HGF-1 세포에 불화나트륨을 각각 0, 2, 4, 6, 8, 12 mM의 농도로 처리한 결과, 농도가 높아짐에 따라 형태학적 변화가 나타나는 것을 확인하였다. 다각형의 형태를 나타내는 MDPC-23 세포와 HaCaT 세포는 대조군과 비교 시 세포의 형태가 불규칙하고 위축되는 형태를 나타냈다<Fig. 1(A), Fig. 2(A)>. HGF-1 세포는 대조

군에서 전형적인 방추형의 치은섬유모세포의 형태를 보이고 있으나, 실험군에서는 세포의 형태가 위축되어 둥근 형태를 나타내고 있음을 확인하였다<Fig. 3(A)>.

3. 불화나트륨이 세포 내의 핵과 골격 배열에 미치는 영향

불화나트륨을 처리한 정상 세포 내의 핵과 Filamentous actin(F-actin)에 어떠한 변화가 일어나는지 확인하기 위하여 공초점 레이저 현미경을 이용하였다. 처리된 불화나트륨의 농도는 IC 50에 가까운 두 개의 농도를 정하여 확인하였다. MDPC-23 세포, HaCaT 세포 및 HGF-1 세포 모두에서 불화나트륨을 처리하지 않은 군에서는 정상적인 핵의 모양인 둥근 모양을 확인하였으나, 불화나트륨이 처리된 군에서는 핵의 수 감소 및 응축 현상이 확인되었다. 이는 불화나트륨의 농도가 높아질수록 핵의 수 감소와 응축 현상이 더욱 심해지는 것을 의미한다. MDPC-23 세포, HaCaT 세포 및 HGF-1 세포 모두에서 불화나트륨을 처리하지 않은 군에서는 세포 골격인 F-actin들이 바르게 배열되어 있는 것을 확인할 수 있는 반면,

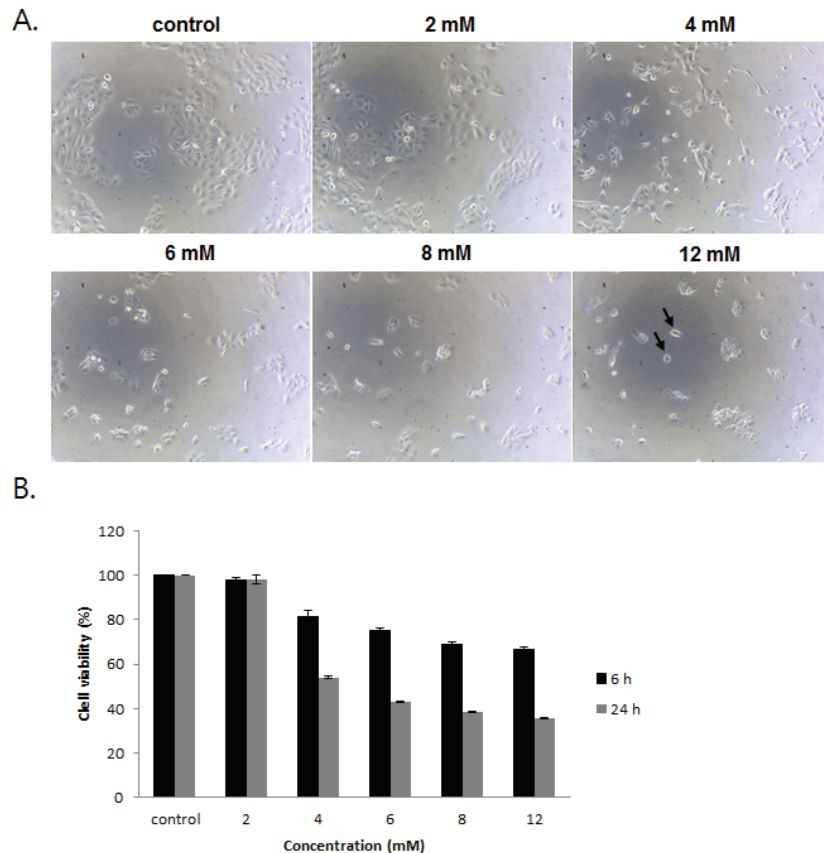


Fig. 2. Effects of NaF in HaCaT cells.(A) Cell morphological change was observed by microscope.(B) Cell viability was measured by WST-1 assay(6 h: $p < 0.005$, 24 h: $p < 0.006$).

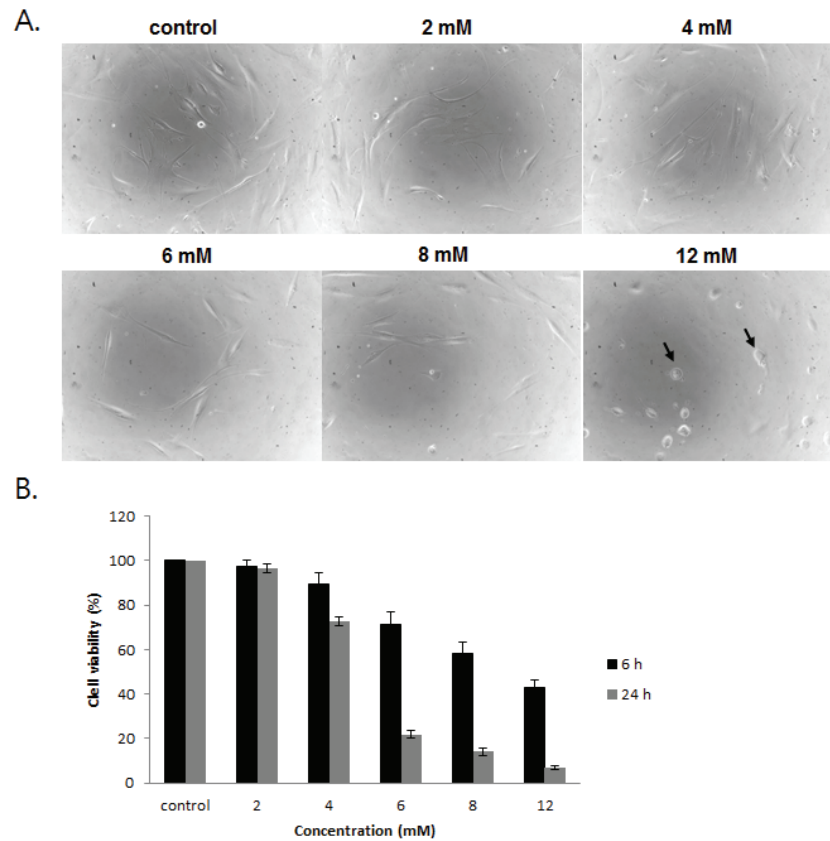


Fig. 3. Effects of NaF in HGF-1 cells.(A) Cell morphological change was observed by microscope.(B) Cell viability was measured by WST-1 assay(6 h: $p < 0.009$, 24 h: $p < 0.005$).

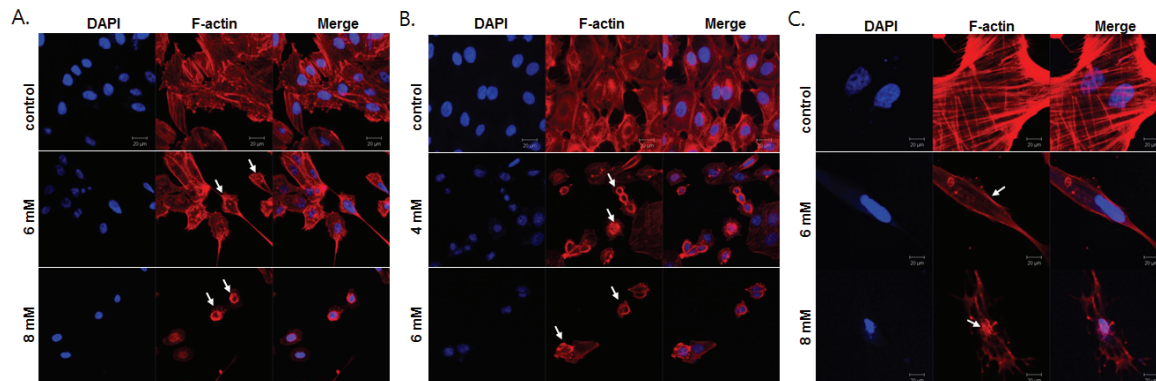


Fig. 4. Effects of NaF in oral normal cells.(A) F-actin change was observed by confocal in MDPC-23 cells(control, 6, 8 mM).(B) F-actin change was observed by confocal in HaCaT cells(control, 4, 6 mM).(C) F-actin change was observed by confocal in HGF-1 cells(control, 6, 8 mM).

불화나트륨을 처리한 군에서는 F-actin들이 붕괴되어 세포가 수축되고 파괴된 것을 확인할 수 있었다. 특히 불화나트륨의 농도가 높을수록 세포의 F-actin 수축과 파괴현상이 나타나는 것을 확인하였다<Fig. 4(A)(B)(C)>.

총괄 및 고안

최근 경제의 성장과 의학의 발달로 인해 예방의학의 발전이 크게 두드러지고 있다. 치의학 분야의 경우 예방치학

이 크게 주목 받고 있으며, 불소는 그 중에서도 가장 경제적이고 광범위한 예방제제로 사용되어 왔다[14]. 불소는 자연계에 풍부하게 존재하여 무색, 무취, 무미의 특성을 가지며, 특히 많은 국가에서 실시 중인 수돗물 불소농도조정사업은 평균 0.8-1.0 ppm의 적정 농도로 주입하여 음용할 경우 치아우식증이 효과적으로 예방된다고 널리 알려져 있다[15-19]. 불소의 또 다른 효과로는 치아와 골격 성장에 필수적인 미량원소로서 골 성장을 유도하고 골세포를 증식시키는 것이다[14]. 또한 Satoh 등[20]의 연구에 따르면 불소의 구강암세포에 대한 세포 사멸 효과가 매우 큰 것으로 알려져 있다. 그러나 최근 불소의 안전성에 대한 의문이 지속적으로 제기되면서 불소가 세포에 미치는 영향에 대한 관심이 증폭되고 있는 실정이다. 이에 본 연구자는 상아질모세포 전구세포인 MDPC-23 세포, 사람각질형성세포인 HaCaT 세포와 치은섬유모세포인 HGF-1 세포를 이용하여 불소의 농도와 처리 시간에 따라 정상세포에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 불화나트륨을 농도별로 0, 2, 4, 6, 8, 12 mM 농도로 6시간, 24시간 처리 후 MDPC-23, HaCaT, HGF-1 세포의 생존율을 분석한 결과 각각 세포마다 차이는 있었으나 농도가 높아질수록 세포의 생존율이 감소하는 것을 확인하였으며, MDPC-23 세포와 HaCaT 세포에서는 4 mM, HGF-1 세포에서는 6 mM 농도에서 불화나트륨을 24시간 처리 시 세포의 생존율이 급격히 감소하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 이 등[7]의 연구에서 불화나트륨이 HGF 세포에 처리시 시간과 농도 의존적으로 생존율이 저하된다고 보고하였으며, Karube 등[21]은 MDPC-23 세포에 5 mM의 불화나트륨 처리 시 DNA 조각남등의 apoptotic body를 형성하여 세포의 증식과 이주에 영향을 미치는 것으로 보고하였다. 이는 본 연구에서 나타난 MDPC-23, HaCaT, HGF-1 세포 모두 부착력이 감소하여 세포의 형태를 유지하지 못하고 불규칙한 형태를 나타내는 결과와 일치하였다. 본 연구에서 불화나트륨을 처리한 후 공초점 레이저 현미경으로 세포의 형태학적 변화가 나타났으며, 이는 처리되는 불화나트륨의 농도가 높아질수록 세포의 성장률이 감소되면서 세포 생존율을 억제하는 경향을 나타내었다. 즉, 불화나트륨은 처리농도가 높아짐에 따라 세포의 형태변화와 생존율의 변화에 영향을 미치며, 세포 골격은 세포의 형태 유지 뿐만 아니라, 운동과 이동에도 관여하는 F-actin의 파괴를 일으키는 것을 확인하였다. F-actin이 세포의 구조적 뼈대로 작용하여 세포 물질의 원활한 운동을 가능하게 하므로 세포성장에 있어 매우 중요하다고 볼 수 있다[22,23]. 그러므로 구강내에 불화나트륨 처리시 치은세포와 상피세포를 손상시키지 않기 위해서는 적정 농도로 처리하는 것이 매우 중요하다고 사료된다. 본 연구결과를 바탕으로 생각해 볼 때 6 mM 이상의 불화나트륨을 세포에 적용 시 세포의 종류와 불화나트륨의 농도에 따라 세포 골격인 F-actin이 붕괴되어 세포가 본래의 형태를 유지할 수 없는 것으로 판단

된다. 하지만 현재 불소의 식음용으로 사용되는 농도는 ppm(mg/L) 단위로 매우 작은 단위인 반면, 실험에 사용된 불소의 단위는 mM(mol/L)로 약 300배 이상의 농도차가 나는 것으로 미루어 볼 때, 불소의 식음수 적정 농도인 0.8-1.0 ppm 사용 시 세포 손상에는 영향을 미치지 않을 것이라 예측할 수 있다. 본 연구는 불화나트륨이 사람각질형성세포, 치은섬유모세포, 상아질모세포 전구세포에서 세포의 증식과 부착에 영향을 미치는 것을 확인함으로써 불화나트륨 사용 시 세포에 대한 안전성과 손상을 일으키지 않는 적정농도를 확인하는 기초자료로 활용할 수 있을 것으로 기대한다. 그러나 본 연구결과는 인체의 최소단위인 세포만을 이용하였으므로 세포 및 다양한 분자세포생물학적 작용과 분석법에 대한 연구는 앞으로 지속적으로 수행되어야 할 것이다.

결론

본 연구는 치아우식증을 예방하는 대표적인 물질인 불화나트륨을 이용하여 사람각질형성세포인 HaCaT 세포, 치은섬유모세포인 HGF-1 세포와 상아질모세포 전구세포인 MDPC-23 세포에 미치는 영향을 확인하고자 하였으며, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 불화나트륨 4 mM 농도로 24 시간 처리 시 HaCaT, MDPC-23 세포에서 생존율이 감소하였으며, HGF-1 세포에서는 6 mM 처리 시 생존율이 급격히 감소하는 것을 확인하였다.
2. 세포의 형태는 불화나트륨을 4 mM 농도로 24시간 처리 시 HaCaT, MDPC-23 세포와 6 mM의 불화나트륨을 HGF-1 세포에 처리 시 세포의 부착력의 감소와 세포의 형태학적 변화가 나타남을 확인하였다.
3. 불화나트륨을 4 mM 농도로 24시간 처리 시 HaCaT, MDPC-23 세포와 6 mM의 불화나트륨을 HGF-1 세포에 처리 시 F-actin의 파괴가 나타남을 확인하였다.

본 연구는 불화나트륨의 농도 의존적으로 MDPC-23, HaCaT, HGF-1 세포의 생존율을 억제시키고, F-actin의 붕괴와 세포의 형태 변화에 영향을 미치는 것을 확인함으로써 고농도의 불화나트륨이 치은세포에 도포되지 않도록 주의가 필요하며, 불화나트륨 세포적용시 손상을 일으키지 않는 기초 자료로서 제시하고자 한다.

References

1. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet* 2005; 366: 1809-20.
2. Lee SH, Kim JM, Kim S, Jeong TS. Anticariogenic effect of fluoride varnishes. *J Korean Acad Pediatr Dent* 2008; 35(1): 83-91.
3. Chesters R K, Huntington E, Burchell C K, Stephen K W. Effect of oral care habits on caries in adoles\cents. *Caries Res* 1992; 26: 299-304.
4. Song JH, Kim YJ, Kim JW, Jang KT, Kim CC, Hahn SH, Lee SH. Remineralization effect of commercially available anticariogenic. *J Korean Acad Pediatr Dent* 2008; 35(2): 287-96.
5. Whitford, G.M. The physiological and toxicological characteristics of fluoride. *J Dent Res* 1990; 69: 539-49.
6. Bartlett JD, Dwyer SE, Beniash E, Skobe Z, Payne-Ferreira TL. Fluorosis: a new model and new insights. *J Dent Res* 2005; 84(9): 832-6.
7. Lee JH, Jung JY, Jeong YJ, Park JH, Yang KH, Nam KC et al. Involvement of both mitochondrial- and death receptor-dependent apoptotic pathways regulated by Bcl-2 family in sodium fluoride-induced apoptosis of the human gingival fibroblasts. *Toxicology* 2008; 243(3): 340-7.
8. Li 1, Xue Y, Zhang W, Teng F, Sun Y, Qu T, Chen X, Cheng X, Song B, Luo W, Yu Q. Sodium fluoride induces apoptosis in odontoblasts via a JNK-dependent mechanism. *Toxicology* 2013; 308: 138-45. doi: 10.1016/j.tox.2013.03.016.
9. Yang T, Zhang Y, Li Y, Hao Y, Zhou M, Dong N, Duan X. High amounts of fluoride induce apoptosis/cell death in matured ameloblast-like LS8 cells by downregulating Bcl-2. *Arch Oral Biol* 2013; 58(9): 1165-73. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.03.016.
10. Eckert RL. Structure, function, and differentiation of the keratinocyte. *Physiol Rev* 1989; 69(4): 1316-46.
11. Kim DH, Kim HJ, Jeong MJ, Son HH, Park JC. Expression and functional characterization of odontoblast-derived gene: OD314. *J Korean Acad Conserv Dent* 2004; 29(4): 399-408.
12. Bowers GM, Schallhorn RG, Mellonig JT. Histologic evaluation of new attachment in human intrabony defect. A literature review. *J Periodontol* 1982; 53: 509-514.
13. Kanduti D, Sterbenk P, Artnik B. Fluoride: A Review of use and effects on health. *Mater Sociomed* 2016; 28(2): 133-7. [http://dx.doi: 10.5455/msm.2016.28.133-137](http://dx.doi.org/10.5455/msm.2016.28.133-137).
14. Huo L1, Liu K, Pei J, Yang Y, Ye Y, Liu Y, Sun J, Han H, Xu W, Gao Y. Fluoride promotes viability and differentiation of osteoblast-like Saos-2 cells via BMP/Smads signaling pathway. *Biol Trace Elem Res* 2013; 155(1): 142-9. doi: 10.1007/s12011-013-9770-0.
15. Oh NR, Park EJ, Yoon SU. Fluoride concentration in the finger nails of dental hygiene and nonhealth-relate some female students. *J Korean Soc Dent Hyg* 2016; 16(1): 147-53. <http://dx.doi.org/10.13065/jksdh.2016.16.01.147>
16. Kim KH, Ha MO, Hong NH, Cho MJ. Effect of fluoride application after dental prophylaxis by the type of dental floss. *J Korean Soc Dent Hyg* 2016; 16(1): 77-83. <http://dx.doi.org/10.13065/jksdh.2016.16.01.77>
17. Kim JW, Lee JA, Lee KY. Enamel strengthening effect of the dental fluoride compound. *J Korean Soc Dent Hyg* 2010; 10(4): 757-64.
18. World Health Organization. Prevention methods and programmes for oral diseases: report of a WHO expert comittee. Geneva: World Health Organization 1984; 6: 12-20.
19. Song YH, Moon HS, Paik DI, Kim JB. A prospective study on the effect of water fluoridation in the Republic of Korea. *J Korean Acad Dent Health* 1992; 16: 452-74.
20. Satoh T, Takayama F, Hashimoto K. Induction of apoptosis of human oral tumor cell lines by sodium fluoride(in Japanese). *Meikai Univ Dent J* 2003; 32: 97-108.
21. Karube H, Nishitai G, Inageda K, Kurosu H, Matsuoka M. NaF activates MAPKs and induces apoptosis in odontoblast-like cells. *Dent Res* 2009; 88(5): 461-5. [http://dx.doi: 10.1177/0022034509334771](http://dx.doi.org/10.1177/0022034509334771).
22. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998; 279(5350): 509-14.
23. Stricker J, Falzone T, Gardel ML. Mechanics of the F-actin cytoskeleton. *J Biomech* 2010; 43(1): 9-14.