

## 녹차추출물 (-)-Epigallocatechin-3-gallate가 사람치주인대섬유모세포 활성 유지에 미치는 영향

### The Effect of (-)-Epigallocatechin-3-gallate on The Stability of Human Periodontal Ligament Fibroblast viability

정임희<sup>1</sup> · 윤정호<sup>1</sup> · 정의원<sup>1</sup> · 김창성<sup>1</sup> · 김남희<sup>2</sup> · 정원균<sup>2</sup> · 최성호<sup>1\*</sup>  
**Im-Hee Jung<sup>1</sup>, Jeong-Ho Yun<sup>1</sup>, Ui-Won Jung<sup>1</sup>, Chang-Sung Kim<sup>1</sup>, Nam-Hee Kim<sup>2</sup>,  
 Won-Gyun Chung<sup>2</sup>, and Seong-Ho Choi<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>연세대학교 치과대학 치주과학고실, 치주조직재생연구소

<sup>2</sup>연세대학교 원주의과대학 치위생학과

<sup>1</sup>Department of Periodontology, Research Institute for Periodontal Regeneration, College of Dentistry, Yonsei University, Shinchon-dong, Seoul 120-752, Korea

<sup>2</sup>Department of Dental Hygiene, Won-ju College of Medicine, Yonsei University, Ilsan-dong, Wonju 220-701, Korea  
 (Received April 02, 2010/Accepted May 10, 2010)

The purpose of this study was to evaluate the effect of (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on the viability of human periodontal ligament fibroblast (hPDLF). Firstly, various concentration of EGCG were applied to hPDLF for 8 days, and then 10 μM EGCG was put for the first 6 days to the experimental group and was stopped for the next 8 days. For the positive control group, the 10 μM EGCG was supplied during the whole period, while any EGCG was not supplied for the negative control. Cell viability was analyzed with MTT assay. In the first experiment, the group which treated 10 μM EGCG for 6 days showed highest cell viability. In the second treatment, the negative control showed continuous growing up in cell proliferation until 12th day and then a little decreased. After stopping EGCG supply, the experimental group's proliferation was slightly cut down and then showed big increases. Lastly, the positive control's increase was lasted during the whole period, but there was no a large variance and it showed lowest cell viability on 14th day. From these results, we concluded that EGCG do not affect such a lot on the increase of hPDLF proliferation, but it is possible for EGCG to make hPDLF hibernate with proper concentration of EGCG.

**Key words:** EGCG, human PDL fibroblast, viability, preservation, MTT

## 서 론

**치**과 분야에서 치조골의 상실은 많은 경우에서 골 이식재와 같은 재생 술식으로 치료되고 치아의 상실은 치과 임플란트로 대체되고 있다. 그러나 임플란트는 치아의 감각기능이나 충격 완화 기능을 대신할 수 없고, 합성골 이식은 파괴된 골조직의 수복량에 한계가 있다. 반면, 치아이식 및 조직공학을 이용한 재생 술식은 기존의 자연치아 및 치주 구조와 가장 유사한 환경을 제공해줄 수 있고, 적용대상이 적합하고 술자의 테크닉 및 기술이 뒷받침된다면 치료비용과 시간을 줄일 수 있다. 따라서 치아나 조직의 이식 및 세포치료의 적용은 환자에 따라 충분히 고려될 필요가 있으며, 이를 위해 다양한 종류의 세포<sup>1-3)</sup>와 적용 가능한 성장인자 등이 연구되고 있다.

주변 골조직의 재생과 치주인대, 백악질 재생에 중요한 역할을 담당하고 있는 치주인대에는 치주인대 세포뿐 아니라, 미분

화 치주인대 줄기세포 및 전구세포들이 포함되어 있다.<sup>1,3-4)</sup> 따라서 치아이식 및 치주조직 재생의 성공은 건전한 치주인대세포에 달려있으며,<sup>5-6)</sup> 치주인대세포의 활성을 유지하고자 다양한 보관액 및 보관온도, 성장인자를 이용한 시도들이 있었다.<sup>7-9)</sup> 한편, Lekic 등<sup>4)</sup>에 의하면 치주인대 섬유모세포는 치주인대 및 결합조직을 구성하는 주된 구성세포로서 치아와 주변 조직의 발달, 기능, 회복, 재생에 매우 중요한 역할을 한다. 이들은 콜라겐이나 탄성섬유와 같은 세포 외 기질을 합성하고, 식작용(phagocytose)을 일으킨다. 세포 및 조직 손상에 반응하여 이동, 분화해 골 흡수 및 조직 파괴를 중재하는 사이토카인들을 생산한다. 이러한 기능들은 치주인대를 다른 조직들과 구분하는 결정적인 특징들이며, 따라서 섬유모세포가 치주인대의 핵심역할을 하는 구성세포라고 하였다. 그러므로 재생 술식에서, 혹은 치아이식에서 치주인대 섬유모세포의 유지 및 활성은 매우 중요하다.

녹차 폴리페놀은 몇몇 질환에 대한 방어인자로 그 효능이 알려져 있다. 그 작용기전에 대해서는 명확히 밝혀진 바가 없지

\*책임연락처: shchoi726@yuhs.ac

만, 많은 *in vivo* 및 임상연구들과 그에 대한 여러 논문들이 보고되었다.<sup>10-12)</sup> Crespy와 Williamson<sup>11)</sup>에 따르면, 녹차 폴리페놀은 암이나 항암치료 등으로 아기된 면역부전에 있어 중앙형성억제 물질로 작용하여 면역반응을 조절하며, 다양한 암에 대해 초기 화학적 항암 치료제로 작용할 수 있다. 또한, 녹차 폴리페놀의 섭취는 체내의 세포 산화를 줄이고, 저밀도 콜레스테롤 수치를 높임으로서 당뇨 (type2) 및 관상동맥 관련 질환의 위험을 낮출 수 있다. 더불어 항산화효소 (SOD)의 활성화에 영향을 주는 트롬빈 형성 억제 물질로 역할하여 신장의 산화 스트레스를 줄이고 기능을 향상시킨다고 보고하였다. 박 등<sup>13)</sup>은 EGCG의 칸디다증에 대한 항균작용을 보고하였다. 이러한 효능을 바탕으로 EGCG를 이용하여, 혈관, 각막, 신경, 체장 랑게르한스섬 세포, 인공연골, 심근과 같은 다양한 조직들에 대한 저장연구들이 있었으며,<sup>14-17)</sup> 녹차 폴리페놀을 이용한 보관실험에서 이들 조직들의 세포 활성도 및 기능이 잘 유지될 수 있었고, 장기 보관도 가능하다고 보고하였다.

이러한 효과에는 녹차 내 폴리페놀 성분이 기여하며, 폴리페놀은 4가지의 주요한 형태(epicatechin, epigallocatechin, epicatechin-3-gallate, (-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG))를 갖는다.

그 중에서 가장 풍부한 폴리페놀은 EGCG로,<sup>18)</sup> EGCG는 사람 치은 섬유모세포와 골모세포에서 유래되는 염증유도 관여세포를 제어하고 염증 사이토카인의 생산을 감소시키며,<sup>19-21)</sup> 파골세포의 발현을 억제하거나 세포자멸을 유도한다.<sup>22-23)</sup> 뿐만 아니라, 섬유모세포에 작용하는 콜라겐 분해효소의 활동을 억제하고,<sup>24)</sup> 사람 골모세포 및 골 생성 중간엽 줄기 세포, 골수 줄기세포의 증식 및 분화에 관여하여 광화물질의 축적을 촉진시킨다는 보고들이 있다.<sup>25-27)</sup> 더불어, Nakamura 등<sup>28)</sup>은 Lipopolysaccharide (LPS)를 이용해 유발시킨 쥐의 치주염에서, 골 파괴 전구세포의 세포막에서 발견되는 Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL)와 염증 전구 사이토카인인 Interleukin (IL)-1 $\beta$ 의 발현이 현저히 감소했다고 보고하였다. 이 등<sup>40)</sup>에 따르면, 자라나는 뼈에서 고농도로 분비되는 효소인 alkaline phosphatase (ALP) 활성과 광화된 골 조직의 양이 10  $\mu$ M 이하의 EGCG를 처리한 사람 치수세포에서 증가하였고, EGCG가 치아 모세포 유래 단백질인 Dentin sialophosphoprotein (DSPP)와 골모세포 유래 단백질인 Osteocalcin (OCN)의 mRNA의 발현이 증가시킨다고 하였다. DSPP는 상아질의 광화조절에 중요한 역할을 하는 단백질이며, OCN은 광화작용과 칼슘이온 항상성을 조절하는 것으로 알려져 있으므로, 이를 통해 EGCG가 골 광화와 치아 분화를 유도하고, 이러한 능력이 치수 조직을 이용한 조직공학에 있어 유용하게 쓰일 수 있을 것이라고 하였다.

사람 치주인대 섬유모세포는 치아이식에 있어서나 치주조직 재생에 있어서 중요한 역할을 맡고 있으므로 이런 다양한 효능을 지닌 EGCG가 사람 치주인대 섬유모세포의 활성 유지 및 증가에도 영향을 끼친다면 치아 장기 보관이나 세포치료를 이용한 치주조직재생 등에 유용될 수 있을 것이다. Zou 등<sup>29)</sup> 이 2009년에 제시한 가설에 의하면 tooth bank와 dental tissue engineering technique 이 결합하면 제3대구치의 tooth germ

을 저장해두었다가 후에 상실된 치아를 대체할 수 있다고 하였고, 현재 치수 및 치아주변조직의 줄기세포들을 이용하여 치주조직 및 치아조직의 재생연구가 진행 중이다. 이들 연구에 EGCG를 적용한다면 더 유용한 임상치료방법들이 개발될 수 있을 것이다. 그러나, 치주인대 세포를 이용한 EGCG의 효과에 대한 연구는 현재 거의 없는 실정이며,<sup>30)</sup> 사람 치주인대세포에 대한 EGCG 관련 논문은 거의 보고되지 않았다.

따라서, 본 실험은 다양한 농도의 EGCG를 적용하여 사람 치주인대 섬유모세포의 성장 및 활성화에 미치는 영향을 분석 평가하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

배양액으로는 10% fetal bovine serum (GIBCO; Invitrogen Corp, Gran Island, NY, USA), 100 u/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin (GIBCO; Invitrogen Corp, Gran Island, NY, USA), 1% L-glutamine (GIBCO; Invitrogen Corp, Gran Island, NY, USA), 1% L-ascorbic acid 2-phosphate trisodium salt (Sigma Life science, Japan), 82%  $\alpha$ -minimum essential medium (GIBCO; Invitrogen Corp, Gran Island, NY, USA)을 혼합하였다. 분말형태의 EGCG (Calbiochem Inc., USA)를  $\alpha$ -minimum essential medium에 녹여서 적용하였으며, MTT solution (5 mg/ml, Amresco Inc. Solon, Ohio, USA)과 DMSO (Dimethyl sulfoxide, Amresco Inc. Solon, Ohio, USA)를 이용하여 세포 활성도를 측정하였다.

### 세포분리 및 배양

세 명의 교정환자에서 교정치료를 목적으로 발거한 건강한 소구치에서 치주인대 섬유모세포를 채취하여 배양하였다. 발거된 치아의 치근 중앙 1/3 부위에서 치주인대 조직을 긁어낸 다음 플라스크 바닥에 부착시켜 배양시켰으며, 0.25% Trypsin-EDTA solution (GIBCO; Invitrogen Corp, Gran Island, NY, USA)을 이용하여 sub-confluence 80~90%에서 탈착시켜 계대 배양시켰고, passage 3의 세포를 실험에 이용하였다.

### 농도 별 EGCG 적용

예비실험을 시행하였고, EGCG를 초기 배양 시 사용된 배양액에 용해시켜 0  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 50  $\mu$ M 농도로 3일간 적용하였다. 그 결과, EGCG 10  $\mu$ M 농도 이하에서 더 많은 세포 증식이 관찰되어 이를 본 실험에 적용하였다.

Passage 3의 치주인대 섬유모세포를 세포 간 접촉이 증식에 미치는 영향을 고려하여 2일 배양군에는 5  $\times$  10<sup>3</sup>, 4일 배양군에는 2  $\times$  10<sup>3</sup>, 6일 배양군에는 1  $\times$  10<sup>3</sup>, 8일 배양군에는 5  $\times$  10<sup>2</sup>만큼 96 well plate에 접종하였다. 세포 부착이 확인된 후 0.001  $\mu$ M, 0.01  $\mu$ M, 0.1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M 농도의 EGCG가 포함된 배양액으로 교환해주었고, 각 농도 별로 2일, 4일, 6일, 8일의 세포 활성도를 평가하였다. 배양액은 2-3일 간격으로 교환해 주었다

**Table 1.** Application of culture medium containing EGCG according to each group

	0day ~ 6day	6day ~ 7day	8day ~ 10day	10day ~ 12day	12day ~ 14day
Negative control	-	-	-	-	-
Positive control	+	+	+	+	+
Experimental group	+	+	+	-	-

(- : EGCG-free culture medium, + : culture medium containing 10 μM EGCG)

**기간 별 EGCG 적용**

세포의 장기보관에 미치는 EGCG의 효과를 실험하였다. 이전 실험의 결과에 따라 가장 적절한 EGCG 처치기간과 농도를 결정하였다. 실험기간 동안 EGCG가 전혀 함유되지 않은 배양액에서 자란 군은 음성대조군, 실험 전일간 10 μM의 EGCG가 함유된 배양액에서 자란 군을 양성 대조군으로 정하였으며, 실험군은 처음 6일간만 10 μM EGCG 배양액을 적용시키고 이후에는 EGCG가 함유되지 않은 배양액으로 적용시킨 군으로 정하였다. Passage 3의 치주인대 섬유모세포를 4 × 10<sup>3</sup> 만큼씩 12 well plate에 부착시키고, 세포부착이 확인된 후, 군별로 일반 배양액 혹은 EGCG 함유 배양액으로 교환해주었다. 처치기간은 EGCG를 6일간 처치하고, 6일을 기준으로 이 후 8일간 더 배양시켜 초기배양일로부터 6일, 8일, 10일, 12일, 14일째에 각 군의 세포 활성도를 측정하였다. 배양액은 2-3일 간격으로 각 군에 따라 교환해 주었다(Table 1).

**MTT assay**

세포 내 미토콘드리아의 활성도를 평가하는 MTT assay를 이용, 치주인대 섬유모세포의 세포 활성도를 평가하였다.<sup>43)</sup> 각 군의 EGCG 적용이 끝난 후, 각 군의 배양액을 100 μl (96 well plate) 혹은 1000 μl (12 well plate)씩 넣고 MTT solution을 최종 희석비율이 배양액 대비 1:10이 되도록 첨가하였다. 이후, 알루미늄 호일로 빛을 차단하여 4시간 동안 37°C incubator에서 배양하였다. 4시간 후, well 내부 상층액을 조심스럽게 제거하고 DMSO를 96 well plate에는 100 μl, 12 well plate에는 1000 μl를 첨가하였다. 이 때, 각 well에 첨가된 DMSO의 양은 절대적으로 동량이 되도록 하였다. 이후, 다시 37°C incubator에서 overnight시켰으며, microplate reader (Bio-rad Laboratories Inc. USA)를 이용하여 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다 (reference 파장은 665 nm).

**통계처리**

각 대조군과 실험군에서 얻은 흡광도(O.D) 수치를 SPSS 12.0 (SPSS, Chicago, Illinois, USA)을 이용해 분석하였다. 일반 선형 모형(일반량 분산분석)을 이용하였으며, 사후 검정으로는 Turkey의 방법을 이용하였다. 유의값은 P value < 0.05로 적용하였다.

**결 과**

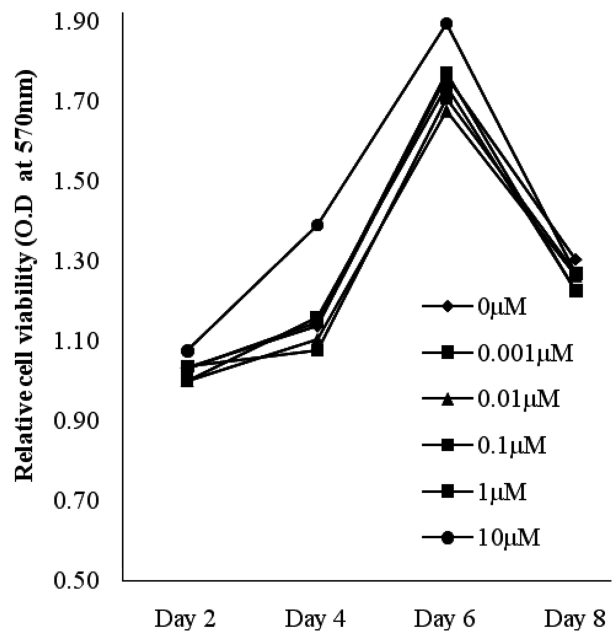
**EGCG 농도에 따른 세포활성도 비교**

EGCG를 각 농도별(0.001 μM, 0.01 μM, 0.1 μM, 1 μM, 10 μM)로 처치하여 관찰한 결과, 10 μM 농도 군의 세포 활성

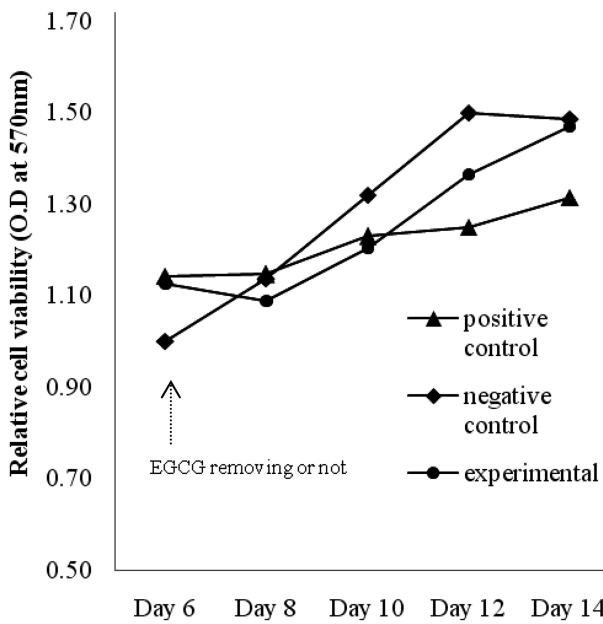
도가 2일, 4일, 6일에서 가장 높았고 (p = 0.063), 8일에서는 다른 농도 군의 활성도와 비슷하였으며, 10 μM을 제외한 다른 농도 군은 2일, 4일, 6일, 8일 모두 비슷한 수치의 세포활성도를 보였다. 또한, 모든 농도군에서 6일간 처치한 군이 다른 군에 비해 유의한 차이를 보이면서 세포 활성도가 제일 높았고 (p < 0.05), 8일군에서는 모든 농도에서 세포 활성도가 감소했다(Figure 1).

**6일 간의 EGCG 처치 후, 14일 까지의 세포활성도 비교**

EGCG 처치 6일 이후, 14일까지의 EGCG 유무에 따른 세포활성도의 분산분석 결과, 양성대조군, 실험군, 음성대조군 모두 6일보다 14일에서 세포활성도가 유의하게 증가하였고 (p < 0.05), EGCG를 처치하지 않은 음성 대조군의 세포활성도 평균치가 0.933으로 가장 높은 수치를 보였으며, 실험군 0.896, 양성 대조군 0.872보다 유의하게 높았다 (p < 0.05). 각 군의 세포 활성도 변화 양상은, EGCG 중단 즉시인 6일에서 실험군과 양성 대조군의 활성도가 0.807, 0.818로, 음성 대조군의 활성도 0.716보다 높았고, 이 후 음성 대조군이 8일, 10일, 12일에서 0.945, 1.074, 1.064로 가장 높은 세포활성도를 보였다. 실험군은 8일에서 활성도 수치가 감소하였다가 10일 이후 증가폭이



**Figure 1.** Cell viabilities changed according to the EGCG dosage. Generally the cell viabilities increased until day 6 and decreased at day 8. Among various concentrations of EGCG, 10 μM EGCG showed the highest increasing in cell viability.



**Figure 2.** Cell viabilities changed after EGCG was removed or not according to each group. EGCG-free negative control group showed the highest cell viability and 10  $\mu$ M EGCG applied positive control group showed the lowest cell growth, while the experimental group's cell viability increased after EGCG removing.

늘어나, 14일에서 1.053으로 음성 대조군의 1.064보다 약간 낮은 활성도를 보였다. 양성대조군은 6일 이후 활성도 증가폭에 큰 변화가 없어 12일, 14일에서 0.895, 0.942로 가장 낮은 세포 활성도를 보였다(Figure 2, Table 2).

## 고 찰

치주질환에 이환된 환자에게 있어 가장 이상적인 치료는 건강한 치주조직의 회복이다. 그러나 기존의 치료개념은 진행성 파괴의 억제 및 파괴된 조직의 수복 유지로 건강한 조직의 회복에는 한계가 있다. 따라서, 파괴된 치주조직의 회복 및 재생을 목표로, 치과 조직공학 분야에서 치주조직의 이식 및 세포 치료가 연구되고 있으며, 많은 가능성을 보여준다.

서 등<sup>1)</sup>은 치주인대는 백악질과 치주인대유사조직을 생성하는 줄기세포를 함유하고 있으며, 이들은 치주질환으로 인해 파괴된 조직의 재생 치료에 유용할 것이라고 하였으며, Dogan 등<sup>2)</sup>은 재생된 치주인대에서 유래한 섬유모세포 유사세포를 결손된 치

근이개부에 적용하여 대조군보다 많이 재생된 백악질과 골조직을 관찰하였고 이를 통해 세포주입을 통한 재생치료가 유용함을 보고하였다. 또한, Akizuki 등<sup>3)</sup>에 따르면, 치주인대세포는 치주조직 재생에 있어 필수요소이며, 치주인대세포를 이용한 cell sheet를 치주결손부위에 이식했을 때, 대조군보다 유의하게 많은 백악질이 생성되었고, 골 재생량도 대조군 보다 많아 치주인대세포 cell sheet이 획기적인 재생 치료방법이 될 수 있다고 하였다. 따라서, 치주인대조직 및 세포를 이용한 치료방법들이 개발되어야 하며 이에 관한 더 많은 연구가 필요하다.

이러한 치주인대세포의 활성을 유지하고자 많은 시도가 있었다. 보관용액에 관한 여러 연구들은 항생제와 FCS를 함유한  $\alpha$ -MEM이나 HBSS에서 높은 세포활성도, 유사분열능 및 군집능을 보였으므로, 이들을 치주인대세포 보관액으로 제시하였다.<sup>7,31)</sup> 보관방법에 관한 연구로는 Kawasaki 등<sup>9)</sup>이 이식된 토끼 구치의 주변 치주조직 재생에 대한 동결보관의 영향을 조사하였는데, 1일 동안 동결 보관된 치아를 이식한 결과, 진행속도가 느리긴 하나 주변에 재생된 치주조직이 즉시 이식과 유의하게 유사하였음을 관찰하였고, Temmerman 등<sup>8)</sup>은 동결 보관된 사람 치주인대세포 평가에서 세포 활성도나 증식능에는 대조군과 차이가 없었으며, 동결 보관하지 않은 세포가 좀 더 높은 ALP 활성도를 보였으나 유의한 차이는 없어 동결보관이 사람 치주인대세포에 영향을 미치지 않는다고 하였다. 한편, Ashkenazi 등<sup>31)</sup>은, 사람 치주인대세포의 보관에 있어 인슐린성장인자(IGF-1)와 혈소판유래성장인자(PDGF)의 영향을 알아보았는데, 성장인자를 24시간 이하로 적용한 모든 군에서 세포 활성도가 3% 가량 감소하였고, 유사분열 및 군집형성에 있어서는 상온 적용 후 24시간 이상에서만 영향을 끼치며 24시간 미만의 단기 적용에는 성장인자가 포함되지 않은 배양액이 더 좋은 결과를 보였다고 하였다.

그러나, 현<sup>15)</sup>에 의하면, 세포 보관은 일반적으로 동결 상태로 이루어지나, 동결 후의 생존도가 종류에 따라 20-40% 정도로 낮을 수 있기 때문에 동결 과정 없이 장기간 보관될 수 있다면 조직 및 세포이식 치료에 매우 효과적일 것이며, 상온 보관은 동결 시 나타나는 작은 혈관들의 내피 손상이나, 각막과 같은 동결 상태에서는 잘 생존할 수 없는 연약한 조직의 손상을 방지해 준다고 하면서 녹차 폴리페놀을 이용한 여러 상온보관 연구들을 제시하였다. 그에 따르면, 폴리페놀이 혈관, 각막, 신경, 체장 랑게르한스섬 세포, 인공연골, 심근과 같은 세포 및 조직의 상온에서의 보관을 향상시켜줄 수 있다고 하며 보관 첨가물

**Table 2.** Cell viability changes after EGCG was removed or not according to each group

	Negative control group	Experimental group	Positive control group	p-value
Day 6	0.716 (0.064)	0.807 (0.059)	0.818 (0.049)	
Day 8	0.815 (0.041)	0.780 (0.051)	0.822 (0.058)	
Day 10	0.945 (0.113)	0.863 (0.127)	0.881 (0.130)	
Day 12	1.074 (0.057)	0.977 (0.091)	0.895 (0.108)	
Day 14	1.064 (0.138)	1.053 (0.016)	0.942 (0.098)	
Mean(SD)	0.933 (0.140)	0.896 (0.104)	0.872 (0.047)	< 0.001**

(SD : standard deviation, \*\* : p-value < 0.001)

로서의 가능성을 제시하였다. 그 밖에도 다양한 세포나 조직에 대해 EGCG를 이용한 저장연구들이 있었으며,<sup>14-17,28,32-33)</sup> EGCG를 통해 세포 활성도가 유지될 수 있고, 장기 보관이 가능하다고 보고하였다.

한 등<sup>17)</sup>은 이러한 EGCG의 효과를 세포 동면으로 설명했다. 그에 따르면, 폴리페놀은 항산화물질의 일종이며, 양친매성 특성을 가지므로 물과 기름에 모두 용해되고, 단백질 친화력을 갖고 있어 쉽게 흡착되고 천천히 분리되는 가역적인 흡착 특성이 있다. 따라서 이러한 성질 덕분에 세포분열에 중요한 세포막 표면의 수용기나 콜라겐 섬유와 결합하고, 이 결합은 세포간의 정보교환을 방해하여, 세포 주기 중 DNA가 복제되는 S기를 억제하고 동면상태로 만들어 증식을 중단하며, 세포의 형태학적 파괴를 감소시키고 더불어 산화로 인한 손상에서 세포를 보호하는 기능을 한다고 하였다. 조직의 즉각적인 이식이 불가능한 상황에서 성공적인 결과를 얻기 위해서는 보관방법이 매우 중요한데, 이러한 특성을 바탕으로 녹차 폴리페놀 성분이 유용하고 간편하며 경제적인 장기 보관방법으로 사용될 수 있음을 시사하였다.

본 실험에서는 사람 치주인대 섬유모세포의 세포 활성도를 평가하고자 MTT assay를 이용하였다. 김 등<sup>34)</sup>에 따르면, 치주인대세포의 활성도를 평가하는데 주로 사용되는 실험방법으로는 방사성DNA 전구체를 이용한 유사분열 관찰,<sup>35)</sup> 단일세포의 군집형성 평가,<sup>36)</sup> neutral red와 trypan blue 염색,<sup>37)</sup> 혹은 형광 diacetate 염색<sup>38)</sup> 후, 직접 세포 수를 집계하는 방법이 시행된다고 하였다. 그러나, 이 방법들은 세포 배양과정에서 실제 상태를 반영하지 않을 수 있으며, MTT assay결과가 조직학적 관찰결과와 동일하고, 적은 시간으로도 측정이 가능하며, 실험상의 조직 손상이나 세포 손실이 배제되므로 더 유의한 결과를 제시한다고 하였다. 따라서, 본 연구에서도 MTT assay를 이용하여 사람 치주인대 섬유모세포의 활성도를 평가하였다.

여러 세포 활성도 평가 실험에 이용된 폴리페놀 및 EGCG 농도는 10 µg/ml에서 218 M까지 다양하였다(Table 3). 그러나 본 연구에서 0 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 50 µM 농도의 EGCG를 3일간 적용한 예비실험 결과, 전 농도에서 세포독성을

나타내지 않았으며, 10 µM 이하의 농도에서 좀 더 높은 세포 활성을 보였다. 사용된 EGCG의 분자량은 458.4로, 본 실험에서는 10 µM, 4.58 µg/ml의 EGCG가 적용되었다.

실험 1의 결과는 농도 별로 2일, 4일, 6일, 8일에서 평가되었다. Figure 1에서 6일 동안 처치한 군들의 세포활성도가 전 농도군에서 다른 측정일보다 높다. 이는 세포증식이 6일째에 모든 군에서 활발하게 일어난다고 해석될 수도 있으나, 세포밀집 정도를 고려하고자 부착시킨 세포의 양이 부적절하여 나타난 결과로 볼 수도 있다. 따라서 본 연구의 실험 1에 관한 고찰에서는 EGCG 농도와 관련한 결과만을 논의하고자 하며, 10 µM 이하의 농도 별 세포 활성도의 영향을 평가하고자 한다. 0.001 µM, 0.01 µM, 0.1 µM, 1 µM, 10 µM의 EGCG를 8일간 적용한 결과, 0.001, 0.01, 0.1, 1 µM군은 대조군(0 µM)과 비슷한 세포 활성도를 보였으나, 10 µM EGCG 처치군은 2일, 4일, 6일에서 다른 군보다 높은 활성 수치를 보여, 10 µM의 EGCG 처치가 세포활성도 증가에 영향을 끼침을 관찰할 수 있었다. 8일째에는 EGCG를 처치한 모든 군이 대조군보다 조금 낮은 세포 활성도를 보였는데, Matsumura 등<sup>39)</sup>에 따르면, 64.9 µg/ml의 EGCG를 적용했을 시, 200 µM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 유리되었고 이는 포름알데히드나 글루타알데히드와 같은 정도의 세포독성이라고 하였다, 또한, 이러한 EGCG의 세포 독성은 유리되는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 것이라고 하였다. 그러나, 본 실험에 적용된 EGCG의 농도는 10 µM미만이며, 10 µM군은 8일을 제외한 전 실험기간에서 대조군(0 µM)보다 높은 세포활성도를 보였으므로, 8일의 수치가 EGCG에 의한 세포독성이라고 볼 수는 없을 것이다.

실험 1을 바탕으로, 실험 2에서는 EGCG를 적용하였다가 제거한 이후의 세포활성 변화를 관찰하고자 하였다. 세포증식을 유도한 10 µM 농도의 EGCG를 세포증식이 일어난 최대기간인 6일 동안 처치하고, 6일 이후는 EGCG를 처치하지 않고 8일간 더 배양시켰다(실험군). 모든 군의 세포 부착량을 동일하게 하였고, EGCG 적용 유무 별, 적용날짜 별로 세포활성도를 평가하였다. 실험 2의 6일 수치들은 실험 1의 결과와 마찬가지로, EGCG를 6일간 처치한 실험군과 양성대조군이 전혀 처치하지

**Table 3.** Comparing among experiments for cell or tissue survivability with EGCG

References	Species	Application Object	Application Types of EGCG	Concentrates of EGCG	Application periods
Hosokawa etc. <sup>25-26)</sup>	human	Gingival fibroblasts	EGCG, cell treatment	50 µg/ml	24hrs
Hyon etc. <sup>48)</sup>	human	Dermal Fibroblasts	Polyphenol, cell treatment	200 µg/ml	1hr
Hyon and Kim <sup>49)</sup>	rat	Fibroblasts (L-929)	Phenolic compounds (EGCG, 28%)	250 µg/ml	15days
Park etc. <sup>40)</sup>	rat	Calvarial osteoblasts	Phenolic compounds (EGCG, 28%)	200 µg/ml	1hr
Rah etc. <sup>39)</sup>	human	Microvascular endothelial cells	Phenolic compounds (EGCG, 28%)	10 µg/ml	1hr
C. Chen etc. <sup>34)</sup>	human	Bone marrow stromal cells	EGCG, cell treatment	10 µM/L	24hrs
Kashiwa etc. <sup>33)</sup>	human	Bone marrow stromal cells	EGCG, cell treatment	100 ppm (218 M)	24hrs / 4days
Nakamura etc. <sup>35)</sup>	mouse	Periodontium (in vivo)	Sunphenon BG (EGCG: 45.9%) : Injection+drinking	1%	40-50day (scarified after 10 <sup>th</sup> injection)

않은 음성 대조군보다 높은 세포 활성을 보였다. 음성대조군은 6일부터 12일까지 가장 큰 증가폭을 보이다가 14일째 감소하였고, 양성대조군은 6일부터 14일까지 꾸준히 증가되긴 하나 큰 증가폭이 없어 14일째에는 가장 낮은 세포활성을 보였다. 실험군은 EGCG 중단 2일째인 8일째 감소하였다가 8일 이후 음성 대조군과 비슷한 기울기의 증가량을 보였고 14일째에는 음성대조군보다 약간 적은 세포 활성을 나타내었다. Matsumura 등<sup>39)</sup>에 따르면 MTT로 세포 활성도나 세포증식억제 정도를 평가하는 방법은 저장(preservation)이나 동면(hibernation)과 같은 가역성 증식억제의 관점은 포함할 수 없다고 하였으며, 그 과정에서 세포는 증식하지 않으나 저장이나 동면이 해제되고 나면 즉시 증식을 재개한다고 하였다. 비록, 본 실험에서 EGCG를 처치하지 않은 음성대조군의 세포활성도 평균치가 EGCG를 처치했던 다른 두 군에 비해 높아 EGCG가 전체적인 세포활성도 증가에는 영향을 미치지 않는다는 결론을 얻었지만, EGCG 여부에 따라 세포 증식이 감소되었다가 재개됨을 관찰할 수 있었다. 이는 앞서서 현 과 김<sup>42)</sup>의 논문이나 Matsumura 등<sup>39)</sup>의 실험에서 L-929 섬유모세포와 porcine hepatocyte가 EGCG에 의해 세포증식이 중단되었다가 EGCG 공급 중단 후 빨리 재개된 양상과 일치하였다. 이는 한 등<sup>17)</sup>이 주장한 EGCG의 세포 동면 효과를 고려하면, EGCG 분자가 세포 수용기와 결합함으로써 증식신호의 전달을 막아 세포의 분열 및 증식을 억제시켰고, EGCG를 제거한 이후 세포활동이 재개된 결과라고 가정할 수 있다. 따라서 본 실험에서는 시행하지 않았지만, 14일 이후 EGCG처리를 중단한다면 양성 대조군에서도 세포 증식량이 다시 늘어날 수 있음을 추측할 수 있다.

위와 같은 결과는 EGCG의 함유여부에 따라 세포의 분열과 증식이 조절될 수 있음을 보여주며, EGCG를 치주인대섬유모세포의 보관첨가물로서 고려해볼 필요가 있음을 시사한다. 또한, Matsumura 등<sup>39)</sup>이 EGCG에 의한 세포 독성이 과산화수소와 같은 활성산소들이 catalase에 의해 제거된다면 현저히 낮아질 수 있다고 하여, EGCG의 가능성은 더욱 높아졌다.

본 실험 결과, EGCG가 사람 치주인대 섬유모세포의 활성도 증가에는 영향을 미치지 않으나, 세포 활성도 유지에는 효과가 있음을 관찰하였고, 이들 세포는 치아이식에 있어서나 치주조직 재생에 있어서 중요한 역할을 맡고 있으므로, EGCG가 치아 이식 전 장기 보관에 사용되거나 세포치료를 이용한 치주조직 재생에 이용될 수 있을 것으로 생각된다. 하지만, 임상에 적용시키기까지 추가 in vitro 실험 및 더 많은 연구가 필요할 것이다.

## 결 론

본 연구는 항산화 및 항균작용, 면역반응 조절 등의 다양한 효과를 지니는 녹차 (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)가 치주조직 재생에 핵심적인 사람 치주인대 섬유모세포의 세포 활성도에 미치는 영향을 평가하고자 실행되었다.

건강한 사람 치주인대 섬유모세포에 농도 별, 기간 별로 EGCG를 처치하였고, MTT를 이용해 세포 활성도를 평가한 결

과는 다음과 같다.

1. 예비실험 결과, 세포독성은 관찰되지 않았고, 10  $\mu$ M이하 군에서 더 많은 세포증식을 관찰하였다.
2. 농도에 따른 세포활성 평가 결과, 0.001  $\mu$ M, 0.01  $\mu$ M, 0.1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M 처치군 중에서 10  $\mu$ M의 EGCG를 8일간 적용한 군의 세포 활성도가 가장 높았다.
3. 10  $\mu$ M EGCG 적용 이후의 세포활성 변화에 대한 관찰 결과, 0일 적용군 (음성대조군)은 세포 증식량이 12일까지 꾸준히 증가하다가 12일 이후 소량 감소하였고, 6일 적용군 (실험군)은 감소하였다가 EGCG 중단 2일 이후부터 증식 폭이 증가하였으며 14일에는 음성대조군과 비슷한 수치를 보였다. 한편, 14일 적용군 (양성대조군)은 활성도가 전체적으로 계속 증가하나 폭이 작았으며, 14일에는 가장 낮은 세포 활성을 보였다. 증가된 세포활성도는 음성대조군 > 실험군 > 양성대조군 순이었다.

본 연구를 통해, EGCG의 적용이 사람 치주인대 섬유모세포의 증식에 크게 관여하지는 않으나, 적절한 농도의 EGCG 함유 여부에 따라 세포활성이 유지, 조절될 수 있음을 관찰하였으며, 사람 치주인대 섬유모세포 보관에 있어 EGCG의 세포동면 효과의 가능성을 보였다. 따라서, EGCG가 의과분야 뿐 아니라, 앞으로의 치아 중·장기 보관이나 세포를 이용한 치주조직 재생치료 및 연구에도 도움이 될 것이라 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 연세대학교 치과대학 2008년도 교수연구비에 의하여 이루어졌음. (This study was supported by a faculty research grant of Yonsei University College of Dentistry for 2008).

## 참고문헌

1. B. M. Seo, M. Miura, S. Gronthos, P. M. Bartold, S. Batouli, J. Brahim, M. Young, P. G. Robey, C. Y. Wang and S. Shi, "Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament," *Lancet*. **364**, 149-155 (2004).
2. A. Dogan, A. Ozdemir, A. Kubar and T. Oygur, "Assessment of periodontal healing by seeding of fibroblast-like cells derived from regenerated periodontal ligament in artificial furcation defects in a dog: a pilot study," *Tissue Eng.* **8**, 273-282 (2002).
3. T. Akizuki, S. Oda, M. Komaki, H. Tsuchioka, N. Kawakatsu, A. Kikuchi, M. Yamato, T. Okano and I. Ishikawa, "Application of periodontal ligament cell sheet for periodontal regeneration: a pilot study in beagle dogs," *J Periodontol Res.* **40**, 245-251 (2005).
4. P. Lekic and C. A. McCulloch, "Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue," *Anat Rec.* **245**, 327-341 (1996).
5. J. Isaka, A. Ohazama, M. Kobayashi, C. Nagashima, T. Takiguchi, H. Kawasaki, T. Tachikawa and K. Hasegawa, "Participation of periodontal ligament cells with regeneration of alveolar bone," *J Periodontol.* **72**, 314-323 (2001).
6. A. Saito, E. Saito, M. Kawanami and A. Shimada, "Healing in

- transplanted teeth with periodontal ligament cultured in vitro," *Cell Transplant.* **12**, 519-525 (2003).
7. M. Ashkenazi, M. Marouni and H. Sarnat, "In vitro viability, mitogenicity and clonogenic capacities of periodontal ligament fibroblasts after storage in four media supplemented with growth factors," *Dent Traumatol.* **17**, 27-35 (2001).
  8. L. Temmerman, L. R. Dermaut, M. De Mil, G. Van Maele, H. Beele and G. A. De Pauw, "Influence of cryopreservation on human periodontal ligament cells in vitro," *Cell Tissue Bank.* **9**, 11-18 (2008).
  9. N. Kawasaki, Y. Hamamoto, T. Nakajima, K. Irie and H. Ozawa, "Periodontal regeneration of transplanted rat molars after cryopreservation," *Arch Oral Biol.* **49**, 59-69 (2004).
  10. C. Cabrera, R. Artacho and R. Gimenez, "Beneficial effects of green tea--a review," *J Am Coll Nutr.* **25**, 79-99 (2006).
  11. V. Crespy and G. Williamson, "A review of the health effects of green tea catechins in in vivo animal models," *J Nutr.* **134**, 3431S-3440S (2004).
  12. J. V. Higdon and B. Frei, "Tea catechins and polyphenols: Health effects, metabolism, and antioxidant functions," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* **43**, 89-143 (2003).
  13. B. J. Park, J. C. Park, H. Taguchi, K. Fukushima, S. H. Hyon and K. Takatori, "Antifungal susceptibility of epigallocatechin 3-O-gallate (EGCG) on clinical isolates of pathogenic yeasts," *Biochem Biophys Res Commun.* **347**, 401-405 (2006).
  14. D. W. Han, Y. H. Park, J. K. Kim, T. G. Jung, K. Y. Lee, S. H. Hyon and J. C. Park, "Long-term preservation of human saphenous vein by green tea polyphenol under physiological conditions," *Tissue Eng.* **11**, 1054-1064 (2005).
  15. S. H. Hyon, "A non-frozen living tissue bank for allotransplantation using green tea polyphenols," *Yonsei Med J.* **45**, 1025-1034 (2004).
  16. S. H. Hyon and D. H. Kim, "Long-term preservation of rat pancreatic islets under physiological conditions," *J Biotechnol.* **85**, 241-246 (2001).
  17. D. W. Han, S. H. Hyon, J. C. Park, K. D. Park, Y. H. Park and H. K. Park, "Non-frozen preservation of mammalian tissue using green tea polyphenolic compounds," *Biomed Mater.* **1**, R18-29 (2006).
  18. C. A. Rice-Evans, N. J. Miller and G. Paganga, "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids," *Free Radic Biol Med.* **20**, 933-956 (1996).
  19. Y. Hosokawa, I. Hosokawa, K. Ozaki, T. Nakanishi, H. Nakae and T. Matsuo, "Catechins inhibit CCL20 production in IL-17A-stimulated human gingival fibroblasts," *Cell Physiol Biochem.* **24**, 391-396 (2009).
  20. Y. Hosokawa, I. Hosokawa, K. Ozaki, T. Nakanishi, H. Nakae and T. Matsuo, "Catechins inhibit CXCL10 production from oncostatin M-stimulated human gingival fibroblasts," *J Nutr Biochem.* Epub **Jul 17** (2009).
  21. S. Takai, R. Matsushima-Nishiwaki, S. Adachi, H. Natsume, C. Minamitani, J. Mizutani, T. Otsuka, H. Tokuda and O. Kozawa, "(-)-Epigallocatechin gallate reduces platelet-derived growth factor-BB-stimulated interleukin-6 synthesis in osteoblasts: suppression of SAPK/JNK," *Mediators Inflamm.* Epub **Jan 12** (2008).
  22. J. H. Yun, C. S. Kim, K. S. Cho, J. K. Chai, C. K. Kim and S. H. Choi, "(-)-Epigallocatechin gallate induces apoptosis, via caspase activation, in osteoclasts differentiated from RAW 264.7 cells," *J Periodontal Res.* **42**, 212-218 (2007).
  23. J. H. Yun, E. K. Pang, C. S. Kim, Y. J. Yoo, K. S. Cho, J. K. Chai, C. K. Kim and S. H. Choi, "Inhibitory effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate on the expression of matrix metalloproteinase-9 and on the formation of osteoclasts," *J Periodontal Res.* **39**, 300-307 (2004).
  24. A. N. Corps, V. A. Curry, D. J. Buttle, B. L. Hazleman and G. P. Riley, "Inhibition of interleukin-1beta-stimulated collagenase and stromelysin expression in human tendon fibroblasts by epigallocatechin gallate ester," *Matrix Biol.* **23**, 163-169 (2004).
  25. B. Vali, L. G. Rao and A. El-Sohemy, "Epigallocatechin-3-gallate increases the formation of mineralized bone nodules by human osteoblast-like cells," *Journal of Nutritional Biochemistry.* **18**, 341-347 (2007).
  26. K. Kashiwa, N. Kotobuki, M. Tadokoro, K. Matsumura, S. H. Hyon, S. Yoshiya and H. Ohgushi, "Effects of epigallocatechin-gallate (EGCG) on osteogenic capability of human mesenchymal stem cells (MSCs) after suspension in phosphate buffered saline," *Tissue Eng Part A.* **16**, 91-100 (2009).
  27. C. Chen, L. Kang, S. Chen, S. Hung, Y. Fu and H. Huang, "(-)-Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) increases osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells," *Bone.* **44**, S296-S297 (2009).
  28. H. Nakamura, T. Ukai, A. Yoshimura, Y. Kozuka, H. Yoshioka, Y. Yoshinaga, Y. Abe and Y. Hara, "Green tea catechin inhibits lipopolysaccharide-induced bone resorption in vivo," *J Periodontal Res. Epub* **Jul 8** (2009).
  29. D. Zou, J. Zhao, W. Ding, L. Xia, X. Jang and Y. Huang, "Wisdom teeth: Mankind's future `third vice-teeth?," *Med Hypotheses.* **74**, 52-55 (2009).
  30. K. MATSUMURA, S. TSUTSUMI and S.-H. HYON, "Epigallocatechin-3-O-gallate As a Novel Preservation Additive for Tooth Transplantation," *Journal of oral tissue engineering.* **3**, 125-130 (2006).
  31. M. Ashkenazi, M. Marouni and H. Sarnat, "In vitro viability, mitogenicity and clonogenic capacity of periodontal ligament cells after storage in four media at room temperature," *Endod Dent Traumatol.* **16**, 63-70 (2000).
  32. D. K. Rah, D. W. Han, H. S. Baek, S. H. Hyon and J. C. Park, "Prevention of reactive oxygen species-induced oxidative stress in human microvascular endothelial cells by green tea polyphenol," *Toxicol Lett.* **155**, 269-275 (2005).
  33. Y. H. Park, D. W. Han, H. Suh, G. H. Ryu, S. H. Hyon, B. K. Cho and J. C. Park, "Protective effects of green tea polyphenol against reactive oxygen species-induced oxidative stress in cultured rat calvarial osteoblast," *Cell Biol Toxicol.* **19**, 325-337 (2003).
  34. E. Kim, I. S. Jeon, J. W. Kim, J. Kim, H. S. Jung and S. J. Lee, "An MTT-based method for quantification of periodontal ligament cell viability," *Oral Dis.* **13**, 495-499 (2007).
  35. J. G. Hupp, M. Trope, S. V. Mesaros and I. Aukhil, "Tritiated thymidine uptake in periodontal ligament cells of dogs' teeth stored in various media for extended time periods," *Endod Dent Traumatol.* **13**, 223-227 (1997).
  36. P. C. Lekic, D. J. Kenny and E. J. Barrett, "The influence of storage conditions on the clonogenic capacity of periodontal ligament cells: implications for tooth replantation," *Int Endod J.* **31**, 137-140 (1998).
  37. M. Ashkenazi, H. Sarnat and S. Keila, "In vitro viability, mitogenicity and clonogenic capacity of periodontal ligament cells after storage in six different media," *Endod Dent Traumatol.* **15**, 149-156 (1999).
  38. S. Patel, T. C. Dumsha and R. J. Sydiskis, "Determining periodontal ligament (PDL) cell vitality from exarticulated teeth stored in saline or milk using fluorescein diacetate," *Int Endod J.* **27**, 1-5 (1994).
  39. K. Matsumura, J. Y. Kim, S. Tsutsumi and S. H. Hyon, "Hibernation, reversible cell growth inhibition by epigallocatechin-3-O-gallate," *J Biotechnol.* **127**, 758-764 (2007).
  40. D. H. Lee and J. W. Park, "Effects of EGCG on the differentiation

- ability of Human dental pulp cells in vitro," *European Cells and Materials*. **14**, 74 (2007).
41. D. W. Han, H. H. Kim, H. J. Son, H. S. Baek, K. Y. Lee, S. H. Hyon and J. C. Park, "Protection of Human Fibroblasts from Reactive Oxygen Species by Green Tea Polyphenolic Compounds," *Key Engineering Materials*. **288-289**, 665-668 (2005).
  42. S. H. Hyon and D. H. Kim, "Hibernation of mammalian cells at living body temperature," *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. **6**, 289-292 (2001).
  43. Y. E. Lee, E. S. Kim, J. kim, S. H. Han and S. J. Lee, "The efficacy of programmed cryo-preservation under pressure in rat periodontal ligament cells," *J. KACD*. **34**, 216-223 (2009).