

타이타늄 표면에 코팅된 epigallocatechin gallate의 사람치수세포 분화 촉진

김영석, 박희철, 이동희, 양형철*

서울대학교 치의학대학원 치과생체재료과학교실 및 치의학 연구소

〈Abstract〉

Epigallocatechin gallate coated on Ti surface stimulates differentiation of human dental pulp cells

*Young-Seok Kim, Hee-Chul Park, Dong-Hee Lee, Hyeong-Cheol Yang**

Department of Dental Biomaterials Science and Dental Research Institute, School of Dentistry, Seoul National University, 28 Yongon-dong, Chongro-ku, Seoul 110-749, Korea

Epigallocatechin gallate (EGCG), a flavonoid which is found in green tea and red wine, is known to have an osteogenic activity. In this study, the effect of EGCG on the differentiation of human dental pulp cells (HDPCs) was investigated. The growth of HDPCs was suppressed when the cells were exposed to 60 μM EGCG during 5 days. EGCG enhanced ALP activity of HDPCs at concentrations ranging from 10 to 30 μM . Furthermore, the mRNA expression of osteocalcin (OCN) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) in HDPCs was enhanced by exposure to EGCG. Extracellular matrix mineralization was also promoted by EGCG even in the absence of other odontogenic factors such as ascorbic acid and dexamethasone. Therefore, it is certain that EGCG is capable of inducing odontogenicity of dental pulp cells. In the experiment of biomimetic apatite coating of titanium discs, EGCG was successfully incorporated into apatite coats and released from the surfaces into culture media.

Key words : Epigallocatechin gallate, Human dental pulp cell, Differentiation, Dentin, Pulp

I. INTRODUCTION

외부로부터의 충격 및 세균 감염에 의한 충치 발생으로 인해 치수(pulp)와 접촉하는 상아질(dentin) 손상되었을 경우, 3차 상아질 형성(tertiary dentinogenesis)이 발생한다. 형성된 3차 상아질은 치수를 보호하고, 2차적인 감염을 억제함으

로써 결과적으로 치아를 보호하는 역할을 하게 된다. 생활치수치료(vital pulp therapy)에서 calcium hydroxide 혹은 mineral trioxide aggregates(MTA)와 같은 재료로 노출된 치수의 복조(pulp capping)를 시행한 경우, 재료의 하방부에 dentin bridge가 형성되며(Oguntebi 등, 1995; Min 등, 2008), 이는 3차 상아질 형성과 같은 과정으로 볼 수 있다. 치수 복조에서 dentin bridge의 형성은 임상적으로 긍정적인 예후를 예측할 수 있는 지표라 할 수 있으며, 치수 복조를 위한 생체재료의 개발에 있어서 3차 상아질 형성 촉진은 해당재료의 중요한 생물학적 성질로 받아들여진다. 따라서 3차 상아질 형성의 기전에 대한 이해와, 이를 촉진하는 물질 및 재료의 개발은

* Correspondence: 양형철
서울시 종로구 연건동 28 서울대학교 치의학대학원
치과생체재료과학교실
Tel: +82-2-740-8695, Fax: +82-2-740-8694
E-mail: yanghc@snu.ac.kr

Received: Jul 08, 2015; Revised: Sep 02, 2015; Accepted: Sep 02, 2015

*본 연구는 보건복지부의 재원으로 한국보건산업진흥원의 보건 의료기술연구개발사업 지원에 의하여 이루어진 것임(HI12C0735).

치아 보존의 영역에서 매우 큰 비중을 차지한다. 최근에는 고전적인 치료 방법을 넘어서 조직공학을 이용한 상아질 재생에 대한 연구가 빈번히 보고되고 있으며(Albuquerque 등, 2014), 3차 상아질 형성 기전 및 이를 촉진하는 물질은 상아질 조직 재생 연구에 필수적이라 할 수 있다.

3차 상아질 형성은, 상아질 및 치수의 손상 정도에 따라, 일차 상아모세포(primary odontoblast) 혹은 이의 전구세포(progenitor cell)에 의한 것으로 알려져 있다(Haniastuti 등, 2008). 일차 상아모세포는 responsive 상아질 형성에 관여하며, 상아모세포가 손상되었을 경우에는 전구세포의 동원(recruitment), 분화, 상아질 생성 등의 과정을 거쳐 reparative 상아질 형성이 발생한다. 상아질에는 transforming growth factor β (TGF β), bone morphogenic protein(BMP)와 같이 상아모세포의 상아질 분비를 촉진할 수 있는 성장인자가 존재하고 있는 것으로 알려져 있으며, 이들이 특정한 자극에 의해 상아질로부터 분리되어 상아모세포의 3차 상아질 형성을 촉진한다고 보고되었다(Finkelman 등, 1990; Bessho 등, 1991; Bègue-Kirn 등, 1992). 또한 이들 성장인자는 치수세포(dental pulp cell)의 분화를 유도하고 경조직 형성을 촉진할 수 있으므로, reparative 상아질 형성을 유도한다고 할 수 있으며(Li 등, 2011; Qin 등, 2012), 다양한 동물실험에서 외인성 성장인자에 의한 reparative 상아질 형성이 관찰되었다(Nakashima 등, 1994; Hwang 등, 2008; Li 등, 2014). 따라서 상아질 재생을 위한 성장인자의 적용 가능성 및 임상적 유용성은 이미 실험적으로 입증되었다고 할 수 있다. 그러나 이러한 가능성과 다양한 실험적 노력에도 불구하고 아직까지 상아질 재생을 위해 성장인자가 임상에서 적용된 예는 거의 없는 실정이다. 이는 성장인자에 의한 상아질 재생이 치과보존학적 측면에서 매우 큰 의미를 갖는 반면, 기존의 치과치료에 비해 경제적으로 불리하기 때문인 것으로 추측된다. 특히 성장인자는 사용 전까지 생리활성의 유지를 위해 세심한 주의가 필요하며, 생체재료와 같이 사용할 경우 재료의 특성에 따라 실패할 될 가능성도 있다. 따라서 위에서 언급한 성장인자의 생리활성을 대신할 수 있는 저분자 물질이 실용적 대안이 될 수 있을 것으로 생각된다. 저분자 활성물질은 일반적으로 거대분자인 성장인자보다 화학적으로 안정적이며, 경우에 따라 매우 경제적이 될 수 있다. 더욱이 활성이 발견된 물질에 대해서

는 이의 유도체 검색을 통하여 더욱 활성이 높은 물질의 발굴에 이어지기도 한다. 본 연구에서는 생리활성을 지닌 저분자 물질의 발굴의 일환으로서 사람치수세포의 분화에 대한 epigallocatechin gallate(EGCG)의 영향을 관찰하였다.

식물의 이차 대사산물로서 항산화효과가 높은 플라보노이드는 다양한 만성질환에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. EGCG는 적포도주 및 녹차의 주된 폴리페놀계 플라보노이드로서 다양한 생물학적 시스템에서 강력한 항산화효과가 보고된 바 있다(Li와 Xie, 2000). 한편 EGCG의 항산화 효과 이외에 골형성에 관련된 연구결과도 보고되었다. 우선 EGCG에 의한 파골세포의 세포사 유도와, 파골세포 성장과 분화에 대한 억제 효과가 관찰되었으며(Nakagawa 등, 2002; Morinobu 등, 2008; Oka 등, 2012), 골다공증 백서 모델에서 골 소실의 제어가 보고되었다(Song 등, 2014). 파골세포에 대한 영향과 함께, EGCG는 간엽줄기세포의 alkaline phosphatase(ALP) 활성을 촉진하고, BMP-2, bone sialoprotein(BSP), osteocalcin(OCN), collagen I의 유전자 발현을 높이는 등, osteogenic 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있다(Jin 등, 2014). 또한 사람 osteoblast-like cell인 SaOS-2의 ALP 활성과 mineralized bone nodule의 형성을 in vitro에서 높이는 것으로 보고되었다(Vali 등, 2007). 비록 위에서 언급한 파골세포와 조골세포에 대한 EGCG의 영향에 대한 분자레벨에서의 기전은 아직 밝혀지지 않았으나, 골다공증 및 골형성 부전에 대한 적용 가능성은 충분하고 할 수 있다.

본 연구에서는 치수세포의 분화에 대한 EGCG의 영향을 조사하기 위하여 EGCG로 처리된 사람치수세포의 ALP 활성, OCN과 dentin sialophosphoprotein(DSPP) 유전자의 mRNA 발현, 세포외 기질의 석회화를 관찰하였다. 또한 상아질 재생에 대하여 아파타이트와 EGCG의 적용 가능성을 보기 위하여, titanium(Ti) disc에 EGCG를 아파타이트와 같이 코팅하여 치수세포의 ALP 변화를 관찰하였다. Titanium(Ti) disc 결과를 통하여 치수세포의 재생 뿐 아니라, 임플란트 표면의 뼈형성 촉진의 위한 EGCG의 적용 가능성이 예측될 수 있을 것으로 생각된다.

II. MATERIALS AND METHODS

1. 재 료

세포배양액과 우태혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 배양 관련 시약은 GIBCO-BRL(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다. 특별한 언급이 없으면, 녹차로부터 추출된 EGCG를 포함한 다른 모든 시약은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. EGCG는 10 mM의 농도로 dimethylsulfoxide에 용해하여 -20 °C에 stock solution으로 저장하고, 사용 전에 배양액으로 희석하여 세포를 처리하였다.

2. 세포배양

사람 치수세포(human dental pulp cell, HDPC)는 서울대학교 치과병원의 Institutional Review Board(IRB)의 승인 및 절차에 따라 교정환자에서 발치한 절치로부터 이전과 같은 방법으로 얻었다(Kim 등, 2010). 즉, 발치한 치아를 절개하여 얻은 치수를 잘게 조각낸 후, 20% FBS와 항생제가 포함된(100 U/ml penicillin-G, 100 µg/ml streptomycin) Eagle's alpha minimum essential medium(α -MEM)에서 37 °C 및 humidified atmosphere(5% CO₂/95% air)의 조건으로 배양하였다. 조각난 치수조직이 culture well의 바닥에 부착이 용이하도록, 조직이 배양액에 약간 잠기는 정도를 유지하면서, 2일마다 배지를 교환하였다. 4주 후, 치수조직으로부터 나온 세포를 trypsin-EDTA로 분리하여 α -MEM으로 4세대까지 계대 배양하였다. 본 연구에서는 5세대 HDPC를 이용하였다.

3. EGCG 세포독성시험

계대 배양한 HDPC를 6-well culture plate에 5000 cells/well의 농도로 넣은 후, 다양한 농도의 EGCG(0, 10, 30, 60 µM)와 함께 배양하고, 9일까지의 세포성장을 측정하였다. 배지는 2일마다 교환하였다. 측정을 위해 trypsin-EDTA로 분리한 세포를 배양액으로 세척하고 0.4% trypsin blue 용액으로 염색하여 hemocytometer로 세포를 계수하였다.

4. ALP 활성 측정

ALP 활성은 이전의 방법을 사용하였으며(Lee 등, 2006), 간단히 서술하면 다음과 같다. 10⁴개의 HDPC를 96-well culture plate에 넣고, 100 µl 배양액으로 배양한다. 배양액은 성장배지(basal medium, BM)와 분화배지(differentiation medium, DM)을 사용하였으며, BM은 α -MEM을, DM은 25 µg/ml L-ascorbic acid, 10 mM β -glycerol phosphate (β -GP), 10 nM dexamethasone이 포함된 α -MEM을 나타낸다. 배양 시 다양한 농도의 EGCG가 첨가된 배양액을 2일마다 교환하였으며, ALP 활성 측정은 3일 간격으로 13일까지 수행하였다. ALP 활성 측정을 위해 culture plate에서 분리한 세포를 0.05% Triton X-100이 포함된 phosphate-buffered saline(PBS)에 현탁하여, 상온에서 60초 동안 초음파 처리로 세포막을 파괴하고 cell lysate를 획득하였다. Cell lysate의 total ALP를 2-amino-2-methyl-1-propanol buffer(pH 10.3)에서 p-nitrophenyl phosphate와 상온반응 시켰다. 반응을 0.5 N NaOH로 종료시킨 후, 405 nm에서 microplate reader (Model 550, Bio-Rad, CA, USA)로 흡광도를 측정하였다. 단백질 함량 측정은 bovine serum albumin을 표준시약으로 하여 Bradford법으로 수행하였다(Bradford, 1976).

5. OCN과 DSPP 유전자의 mRNA 발현 측정

OCN과 DSPP 유전자의 mRNA 발현을 조사하기 위해 이전의 연구와 같이 역전사중합효소연쇄반응(reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR))을 이용하였다(Kim 등, 2013). 우선 24-well culture plate의 각 well에 5×10⁴의 세포를 37 °C 및 humidified atmosphere(5% CO₂/95% air)의 조건하에서 24시간 동안 전배양 한 후, 10 µM EGCG가 포함된 신선 배지로 교환하여 세포처리를 시작하였다. EGCG 처리 기간은 3, 5, 10, 15, 20, 25일로 하였으며, 2일마다 배지를 교환하였다. Total RNA를 TRIzol reagent(Invitrogen, Waltham, MA, USA)로 분리하고, SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq(Invitrogen)을 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. 사람 DSPP primer (forward 5'-CCTCGTCTTCATCCTCATCTG-3', reverse 5'-GGTGTCTGGTGCATGAAGGT-3')와 OCN primer (forward 5'-CCTCAGTCCCCAGCCAGATCC-3', reverse

5'-CAGGGCAGAGAGAG AGGAG-3')는 (주)Bioneer (Deajeon, Korea)로부터 구입하였다. cDNA 합성은 50 °C에서 30분간 하였으며, denaturation은 94 °C에서 2분 수행하였다. PCR은 94 °C에서 30초(dissociation), 56 °C에서 30초(primer anealing), 72 °C에서 1분(extension)의 cycle로 35회 하였으며, primer extension을 위해 마지막으로 72 °C에서 10분간 처리하였다. PCR 생성물은 1.2% agarose gel에서 전기영동하여 분리하고, ethidium bromide로 염색하였다. GAPDH mRNA의 PCR 생성물은 전기영동의 standard로 사용하였다.

6. Alizarin red S 염색

HDPC 세포의 기질의 mineralization에 대한 EGCG의 영향을 조사하기 위하여, 10^5 개의 세포를 12-well culture plate의 각 well에 넣고, 25일간 배양하였다. 모든 배지는 10 mM β -GP를 포함하도록 하였고, EGCG는 10 μ M을 첨가하였다. 양성대조군은 10 nM dexamethasone이 첨가된 배지를 사용하였다. Alizarin red S 염색을 위해, 우선 세포를 PBS로 2번 세척하고, 50% ethanol로 10분 고정 후, 증류수로 5분간 수화하였다. 염색은 1% alizarin red S로 실온에서 3분간 수행하고, 염색 후 증류수와 70% ethanol로 세척하고 풍건하였다.

7. 생체모방형 아파타이트 코팅을 이용한 EGCG 고정 및 HDPC의 ALP활성 측정

Ti disc(두께 2 mm, 직경 10 mm)의 생체모방형 아파타이트 코팅을 위하여 electron beam evaporation 법으로 calcium phosphate가 미리 코팅된 Ti disc를 연세대학교의 이인섭 박사로부터 제공받아 사용하였다(Li 등, 2008). 생체모방형 아파타이트 코팅을 위해 제공받은 Ti disc를 calcium chloride(100 mg/ml)가 포함된 PBS에 72시간동안 상온 침지하여 아파타이트가 생성되도록 하였다. 표면의 아파타이트 생성은 주사형 전자현미경(S-4700, Hitach, Japan)으로 관찰하였다. EGCG 고정을 위하여 PBS 침지 시, EGCG를 침지액에 포함시켰다. 대조군 제작을 위해서는 EGCG가 포함되어 있지 않은 PBS에 Ti disc를 침지하였다. 아파타이트 생성 후, 표면에 세포배양을 위해 disc를 멸균 증류수로 3번 세척하고, 자연 건조시켜 사용하였다. Ti disc에 고정된 EGCG의

odontogenic 효과를 조사하기 위하여, HDPC를 Ti disc 위에서 7일간 배양한 후, Ti disc 표면에 부착한 세포의 ALP 활성을 측정하였다.

8. 통계 분석

통계분석을 위하여 음성대조군과 시험군의 시험결과를 unpaired Student's *t*-test로 처리하여 분석하였다($p < 0.05$).

III. RESULTS

1. HDPC의 세포성장 및 ALP 활성에 대한 EGCG의 영향

HDPC의 세포 성장에 대한 EGCG의 영향을 관찰하기 위하여 10-60 μ M EGCG로 9일 동안 처리한 세포를 2일마다 계수하였다. Figure 1에 나타난 바와 같이, EGCG는 농도 의존적으로 세포 성장을 억제하였다. 최고농도인 60 μ M에서는, 음성대조군과 비교하여 5일째에 약 35% 정도의 세포 수 감소가 있었으며, 30 μ M에서는 9일째에 음성대조군과 유의한 차이를 보였다. 10 μ M EGCG에서만 9일 동안 세포 성장을 저해하지 않았다.

ALP 활성에 대한 EGCG의 영향을 관찰하기 위하여, HDPC를 13일 동안 5-30 μ M EGCG로 처리하였으며 3일마다 ALP 활성을 측정하였다. 배양시간이 경과함에 따라 성장배지인 BM과 분화배지 DM 모두에서 음성대조군의 ALP 활성이 증가하였다(Figure 2). BM의 경우 7일까지는 ALP 활성의 증가가 미미하였으나, 그 이후에 큰 폭의 증가가 나타났으며, 13일에는 약 160 units/mg protein 정도의 활성을 보였다. DM의 음성대조군에서는 BM보다 빠른 ALP 활성의 증가가 나타났으며, 7일과 13일에 각각 75 및 약 240 units/mg protein의 ALP 활성을 보였다. EGCG 처리에 의해서 HDPC는 일정구간의 농도범위 안에서 EGCG 농도 의존적으로 ALP 활성의 증가를 보였다. BM에서는 배양 7일까지는 뚜렷한 EGCG의 효과가 보이지 않았으나, 10일째에 10과 15 μ M EGCG에 의해 농도 의존적 ALP 활성의 증가가 나타났다. 그러나 30 μ M에서 더 이상의 증가가 보이지 않았다. DM에서는 7일부터 EGCG(10, 15 μ M)에 의해 농도 의존적 ALP 활성의 증가가

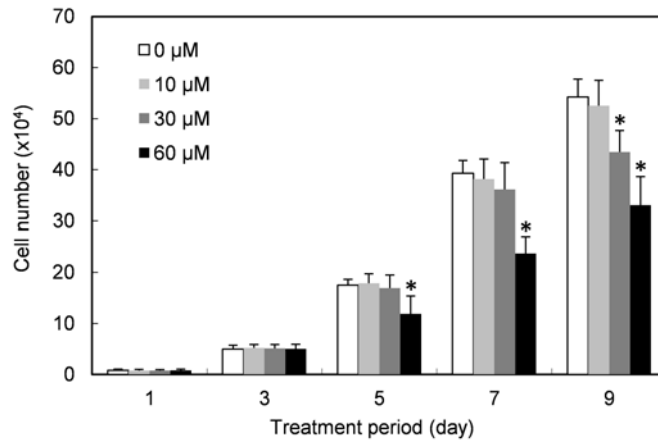


Figure 1. Cell growth of HDPCs in the presence of EGCG. HDPCs were treated with EGCG at various concentrations, and cell numbers were measured at intervals. Each data point represents the mean (\pm standard deviation) of triplicate experiments per condition.

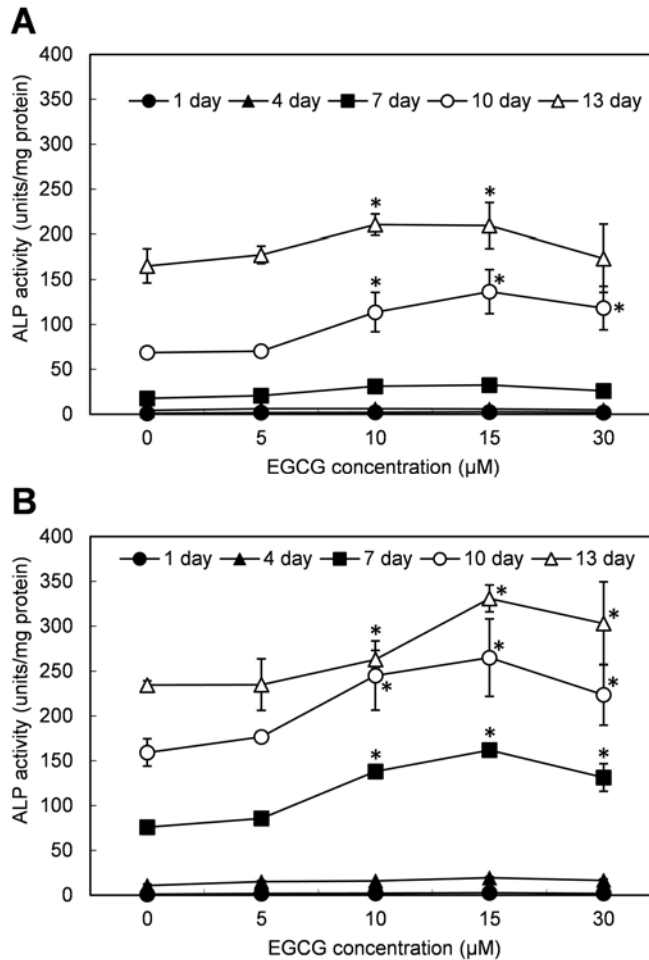


Figure 2. Alkaline phosphatase activity of HDPCs in the presence of EGCG. HDPCs were grown in basal media (BM) (A) and differentiation media (DM) (B) with EGCG. Alkaline phosphatase activity was measured at intervals. Each data point represents the mean (\pm standard deviation) of triplicate experiments per condition.

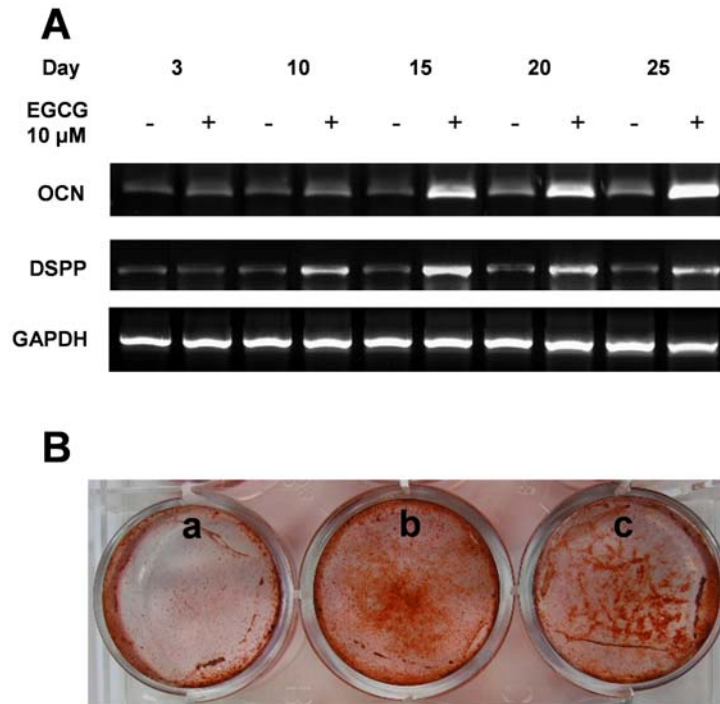


Figure 3. (A) mRNA expression of OCN and DSPP in EGCG-treated HDPCs. After culturing HDPCs with or without 10 μM EGCG, mRNA expression of OCN and DSPP in HDPCs was analyzed with RT-PCR. GAPDH was used as a PCR and loading control. (B) Effect of EGCG on mineralization of HDPCs, HDPCs were grown in culture media containing β -GB only (a), β -GB + 10 μM EGCG (b), and β -GB + 10 nM dexamethasone (c). Following a 25-day culture, the cultures were stained with alizarin red S.

나타났으며, 13일째에서도 ALP활성이 증가하였다. 단, 30 μM 에서는 ALP 활성은 15 μM EGCG 처리군보다 감소하는 경향을 보였다.

2. HDPC의 DSPP/OCN 유전자 발현 및 mineralization에 대한 EGCG의 영향

HDPC의 DSPP와 OCN 유전자 발현에 대한 EGCG의 영향을 조사하기 위하여, 10 μM EGCG로 HDPC를 처리하면서 유전자 발현의 변화를 시간별로 관찰하였다. OCN는 EGCG 처리 15일부터 mRNA 발현이 증가하였으며, 25일까지 증가된 발현이 유지되었다(Figure 3A). DSPP의 경우 10일부터 mRNA 발현이 증가하였으며, 25일까지 발현의 증가가 지속되었다. 반면, EGCG로 처리하지 않은 대조군에서는 OCN와 DSPP의 유전자 발현이 증가하지 않았다.

HDPC는 일반적으로 DM에서 mineralization이 잘 일어나는 것으로 알려져 있으므로, 본 연구에서는 음성대조군을 위

한 배지에 DM의 분화유도 성분 중 β -GP만을 첨가하여, mineralization이 일어날 수 있는 최소한의 환경이 되도록 하였다. β -GP만을 첨가한 배지에서 자란 세포에서는 매우 약한 정도의 mineralization을 관찰할 수 있었다(Figure 3B). 반면, 시험군(β -GP + 10 nM EGCG)과 양성대조군(β -GP + 10 nM dexamethasone)에서는 뚜렷하게 많은 수의 mineralized nodule이 발생하였다.

3. Ti disc 표면에 고정된 EGCG의 영향

Ti disc 표면에 EGCG를 고정하기 위하여 biomimetic apatite 코팅을 적용하였다. EGCG가 없는 환경에서 apatite 코팅된 Ti disc의 표면은 Figure 4A의 a, b에서와 같이 얇은 조각이 붙어 있는 형상으로 전형적인 아파타이트 표면의 양상을 나타낸다. Biomimetic coating 시에 용액에 10 μM EGCG를 포함시킨 경우에도 Figure 4A(b, c)에서 보이는 바와 같이, 아파타이트 결정이 Ti disc 위에 나타난다. 그러나 전형적인

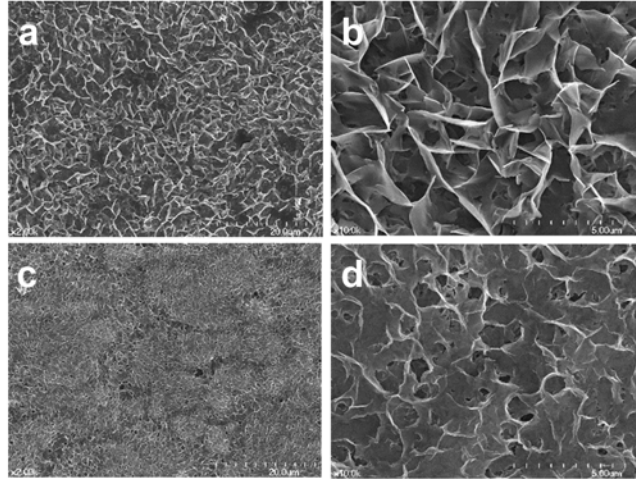
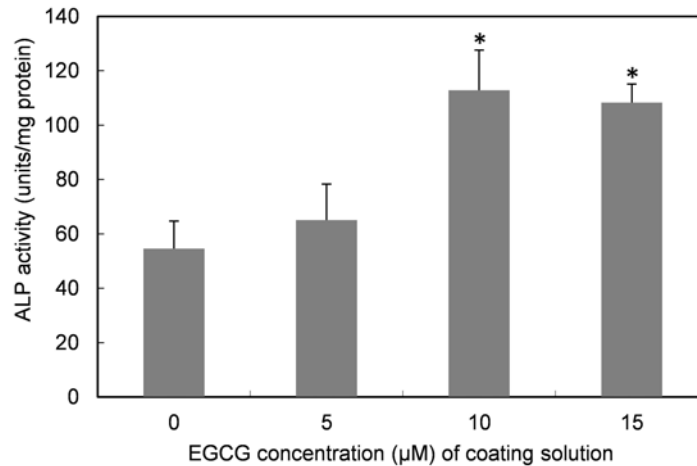
A**B**

Figure 4. (A) Scanning electron microscopy morphology of titanium surface biomimetically coated with calcium phosphate. The surface was coated with (c, d) or without (a, b) 10 μM EGCG. (B) Alkaline phosphatase activity of HDPCs grown on titanium surfaces biomimetically coated with calcium phosphate and EGCG. Alkaline phosphatase activity was measured following a seven day culture on the modified surface of the titanium.

아파타이트의 형태와 달리 표면의 조각들의 크기가 작으며, 서로 붙어 있는 형태를 띠고 있다. 따라서 EGCG는 apatite 형성에 영향을 미치는 것으로 보인다.

Figure 4A에서와 같이 준비한 Ti disc 위에 HDPC를 배양하여, ALP 활성을 측정하였다. 활성측정은 Ti disc 위에서 7일간 배양한 세포를 이용하였다. ALP 활성은 EGCG를 포함하지 않은 시료에 비해 10, 15 μM EGCG에서 유의하게 높게 나타났다.

IV. DISCUSSION

EGCG는 식물성 플라보노이드로서 항균성, 항진균성, 항산화능, 항염증 작용 등이 있는 것으로 알려져 있으며(Caturla 등, 2003; Park 등, 2006; Liu 등, 2014), 최근에는 항암성이 보고되기도 하였다(Zhao 등, 2015). EGCG는 고농도에서 세포의 apoptosis를 유발하여 항암성을 보이는 것으로 알려져 있으므로(Shen 등, 2014), 농도의 차이는 있을 수 있으나, 정

상세포에서도 세포독성이 나타날 수 있다. 본 연구에서의 세포독성시험은 일반적으로 사용되는 배양시간보다 길게 하여 수행하였다. Figure 1에서 나타난 바와 같이, 3일까지는 60 μM 에서 HDPC의 세포 성장에 EGCG가 영향을 주지 않았으나, 5일째부터 높은 농도에서 영향을 미치지 시작하여, 9일째에는 30 μM 에서도 EGCG의 영향이 나타났다. 본 연구에서는 세포에 대한 영향이 apoptosis에 기인하는 것인지, necrosis와 관련된 것인지 조사하지 않았으나, 앞선 연구의 결과들로 미루어 보아, HDPC의 세포 성장에 대한 EGCG의 저해는 apoptosis에 의한 것으로 짐작된다. ALP 활성 측정의 경우에서도 EGCG의 세포독성이 고농도에서 영향을 주었을 것으로 판단된다. Figure 2에서 보이는 바와 같이 ALP 활성이 EGCG 30 μM 에서는 더 이상의 증가를 보이지 않았으며, 이는 아마도 세포독성과 관련이 있을 것으로 판단된다. 세포독성이 나타나지 않는 농도에서는 HDPC의 분화를 EGCG가 유도하며, 이는 ALP 활성, 분화 유전자 발현, mineralization의 증가로 확인되었다. OCN은 조골세포의 분화에서도 발현이 강하게 나타나지만, DSPP는 조상아세포에서 비교적 특이적으로 발현하는 유전자이므로, 이의 발현은 EGCG가 치수세포의 odontoblastic 분화를 유도하는 증거라 할 수 있다. EGCG 처리에 의한 mineralized nodule의 생성은 10 nM dexamethasone과 유사한 정도의 결과를 보였으므로, EGCG의 분화 촉진 효과는 매우 확실하다 할 수 있다. 이러한 EGCG의 분화 촉진 효과에 관련된 세포 신호 전달 시스템은 아직 밝혀져 있지 않다. 단, 이전의 연구에서 EGCG와 같은 플라보노이드계의 quercetin이 extracellular signal-regulated kinases(ERK) pathway를 통해서 HDPC의 분화를 촉진하는 것으로 밝혀진 바(Kim 등, 2013), EGCG 또한 같은 신호 전달 체계로 분화를 촉진할 가능성이 크다.

임상에서 감염되지 않은 치수가 노출될 경우 상아질을 재생하는 것은 치아의 수명 연장에 중요한 수단이 될 수 있다. 따라서 이를 위한 생물학적 자극이 필요하며, 분화 촉진 물질은 하나의 대안으로 고려될 수 있다. 물론 EGCG의 분화 촉진 활성이 치수세포를 자극하여 노출된 치수를 보호하기에 충분한 것인가에 대해서는 더 많은 연구를 통해 조사할 필요가 있다. 또한 다른 생리활성물질과의 상승효과 등도 EGCG의 유용성을 높일 수 있으므로, 이에 대한 향후 연구가 필요하다

할 수 있다. 조직공학을 이용한 상아질 재생의 경우, 활성물질의 일환으로 EGCG와 같은 플라보노이드 물질의 적용도 가능성이 높을 것으로 기대된다.

본 연구에서는 HDPC의 분화에 대한 EGCG의 영향과 함께, Ti disc 표면에 고정된 EGCG의 영향을 관찰하였다. 서론에서 언급한 바와 같이, HDPC가 Ti implant와 직접 접촉할 수 있는 임상적 환경은 없다고 할 수 있으나, HDPC와 조골세포의 유사성을 고려하면, 치과용 임플란트의 osseointegration 향상을 위한 EGCG의 적용을 기대할 수 있다. 즉, EGCG가 포함된 아파타이트가 골형성을 촉진할 가능성을 보여주었으며, 골이식재 등에도 이의 적용이 가능할 것으로 보인다.

V. CONCLUSIONS

EGCG의 사람치수세포 성장 및 분화에 대한 영향은 다음과 같다.

- 1) 10 μM EGCG는 HDPC의 성장에 영향을 주지 않으나, 60 μM 에서는 배양 5일부터 세포 성장을 억제하였다.
- 2) HDPC의 ALP 활성은 일정구간 농도(5-15 μM)의 EGCG에 의해 증가하였다($p < 0.05$). 30 μM EGCG는 더 이상의 ALP 활성의 증가가 나타나지 않았으며, 이는 세포독성에 기인하는 것으로 판단된다.
- 3) EGCG는 HDPC의 OCN, DSPP mRNA의 발현과 세포의 기질의 mineralization을 촉진하였다.
- 4) Ti disc 표면에 biomimetic 아파타이트 코팅할 경우, EGCG는 형성된 아파타이트의 성장에 영향을 주었다. 아파타이트와 같이 로딩된 EGCG는 HDPC세포의 분화를 촉진하였다.

이상의 결과로 EGCG의 사람치수세포 분화 촉진효과를 확인할 수 있었으며, 임상적 효용성을 검증하기 위해서는 향후 동물실험을 통한 상아질 형성 촉진 효과에 대한 시험 등을 수행하여야 할 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Albuquerque MTP, Valera MC, Nakashima M, Nör JE, Bottino MC (2014). Tissue-engineering-based strategies for regenerative endodontics. *J Dent Res* 93:1222-1231.
- Bègue-Kim C, Smith AJ, Ruch JV, Wozney JM, Purchio A, Hartmann D, Lesot H (1992). Effects of dentin proteins, transforming growth factor β 1 (TGF β 1) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on the differentiation of odontoblast in vitro. *Int J Dev Biol* 36:491-503.
- Bessho K, Tanaka N, Matsumoto J, Tagawa T, Murata M (1991). Human dentin-matrix-derived bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 70:171-175.
- Bradford M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Carturla N, Vera-Samper E, Villalaín J, Mateo R, Micol V (2003). The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipid model membranes. *Free Rad Biol Med* 34:648-662.
- Finkelman RD, Mohan S, Jennings JC, Taylor AK, Jepsen S, Baylink DJ (1990) Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II, and TGF- β in human dentin. *J Bone Mine Res* 5:717-723.
- Haniastuti T, Nunez P, Djais AA (2008). The role of transforming growth factor beta in tertiary dentinogenesis. *Dent J (Maj Ked Gigi)* 41:15-20.
- Hwang Y-C, Hwang I-N, Oh W-M, Park J-C, Lee D-S, Son H-H (2008). Influence of TGF- β 1 on the expression of BSP, DSP, TGF- β 1 receptor I and Smad proteins during reparative dentinogenesis. *J Mol Hist* 39: 153-160.
- Jin P, Wu H, Xu G, Zheng L, Zhao J (2014). Epigallocatechin-3-gallate as a pro-osteogenic agent to enhance differentiation of mesenchymal stem cells from human bone marrow: and in vitro study. *Cell Tissue Res* 356:381-390.
- Kim JG, Son KM, Park HC, Zhu T, Kwon JG, Yang HC (2013). Stimulating effects of quercetin and phenamil on differentiation of human dental pulp cells. *Eur J Oral Sci* 121:559-565.
- Kim NR, Park HC, Kim I, Lim B-S, Yang H-C (2010). In vitro cytocompatibility of N-acetylcysteine-supplemented dentin bonding agents. *J Endod* 36:1844-1850.
- Lee DH, Lim B-S, Lee Y-K, Yang H-C (2006). Effects of hydrogen peroxide (H₂O₂) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralization of odontoblast and osteoblast cell lines. *Cell Biol Toxicol* 22:39-46.
- Li C, Xie B (2000) Evaluation of the antioxidant and pro-oxidant effects of tea catechin oxypolymers. *J Agric Food Chem* 48:6362-6366.
- Li F, Liu X, Zhao S, Wu H, Xu HHK (2014). Porous chitosan bilayer membrane containing TGF- β 1 loaded microspheres for pulp capping and reparative dentin formation in a dog model. *Dent Mat* 30:172-181.
- Li Y, Lee I-S, Cui F-Z, Choi S-H (2008). The biocompatibility of nanostructured calcium phosphate coated on micro-arc oxidized titanium. *Biomaterials* 29:2025-2032.
- Li Y, Lü X, Sun X, Bai S, Li S, Shi J (2011). Odontoblast-like cell differentiation and dentin formation induced with TGF- β 1. *Arch Oral Biol* 56:1221-1229.
- Liu D, Zhang X, Jiang L, Guo Y, Zheng C (2014). Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) attenuates concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *Acta Histochem* 116:654-662.
- Min K-S, Park H-J, Lee S-K, Park S-H, Hong C-U, Kim H-W, Lee H-H, Kim E-C (2008). Effect of mineral trioxide aggregate on dentin bridge formation and expression of dentin sialoprotein and heme oxygenase-1 in human dental pulp. *J Endod* 34:666-670.
- Morinobu A, Biao W, Tanaka S, Horiuchi M, Jun L, Tsuji G, Sakai Y, Kurosaka M, Kumagai S (2008).

- (-)-Epigallocatechin-3-gallate suppresses osteoclast differentiation and ameliorates experimental arthritis in mice. *Arthritis Rheum* 58:2012-2018.
- Nakagawa H, Wachi M, Woo J-T, Kato M, Kasai S, Takahashi F, Lee I-S, Nagai K (2002). Fenton reaction is primarily involved in a mechanism of (-)-epigallocatechin-3-gallate to induce osteoclastic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 292:94-101.
- Nakashima M (1994). Induction of dentine in amputated pulp of dogs by recombinant human bone morphogenetic proteins-2 and -4 with collagen matrix. *Arch Oral Biol* 39:1085-1089.
- Oguntebi BR, Heaven T, Clark AE, Pink FE (1995). Quantitative assessment of dentin bridge formation following pulp-capping in miniature swine. *J Endod* 21:79-82.
- Oka Y, Iwai S, Amano H, Irie Y, Yatomi K, Ryu K, Yamada S, Inagaki K, Oguchi K (2012). Tea polyphenols inhibit rat osteoclast formation and differentiation. *J Pharmacol Sci* 118:55-64.
- Park BJ, Park J-C, Taguchi H, Fukushima K, Hyon S-H, Takatori K (2006). Antifungal susceptibility of epigallocatechin 3-O-gallate (EGCG) on clinical isolates of pathogenic yeasts. *Biochem Biophys Res Commun* 347:401-405.
- Qin W, Lin ZM, Deng R, Li DD, Song Z, Tian YG, Wang RF, Ling JQ, Zhu XF (2012). p38a MAPK is involved in BMP-2-induced odontoblastic differentiation of human dental pulp cells. *Int Endod J* 45:224-233.
- Shen X, Zhang Y, Feng Y, Zhang L, Li J, Xie Y-A, Luo X (2014). Epigallocatechin-3-gallate inhibits cell growth, induces apoptosis and causes S phase arrest in hepatocellular carcinoma by suppressing the AKT pathway. *Int J Oncol* 44:791-796.
- Song D, Gan M, Zou J, Zhu X, Shi Q, Zhao H, Luo Z, Zhang W, Li S, Nui J, Xhu H, Chen H, Liu X, Yang H (2014). Effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate in preventing bone loss in ovariectomized rats and possible mechanisms. *Int J Clin Exp Med* 7:4183-4190.
- Vali B, Rao LG, El-Soheby A (2007). Epigallocatechin-3-gallate increases the formation of mineralized bone nodules by human osteoblast-like cells. *J Nutr Biochem* 18:341-347.
- Zhao H, Xie P, Li X, Zhu W, Sun X, Sun X, Chen X, Xing L, Yu J (2015). A prospective phase II trial of EGCG in treatment of acute radiation-induced esophagitis for stage III lung cancer. *Radiother Oncol* 114:351-356.