

Epigallocatechin-3-gallate 농도가 치주인대 세포의 생활력에 미치는 효과

유은규¹, 남옥형¹, 김미선², 이효설¹, 김광철², 최성철¹

¹경희대학교 치의학전문대학원 소아치과학교실 ²강동경희대학교병원 치과병원 소아치과

PDL cell viability according to concentrations of epigallocatechin-3-gallate

Eun Kyu Yoo, Ok Hyung Nam, Mi Sun Kim, Hyo-Seol Lee, Kwang Chul Kim, Sung Chul Choi

¹Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Kyung Hee University

²Department of Pediatric Dentistry, Kyung Hee University Dental Hospital at Gangdong

Purpose: The aim of this study was to evaluate the effect of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) as a storage media on the viability of human periodontal ligament (PDL) cell.

Materials and Methods: Human PDL cells were collected and incubated from the healthy premolars that were extracted for orthodontic treatment. The cultures were exposed at tap water, HBSS, and EGCG (1, 5, 10, 20, 50, and 100 μ M) for 24 hrs. The viability of PDL cells was determined using MTS assay and the survival rate was counted by Nucleocounter system.

Results: PDL cells in less than 5 μ M EGCG showed a similar rate of cell viability compared to HBSS ($p > 0.05$). However, PDL cells in 10, 20, and 50 μ M EGCG showed lower rates compared to the HBSS. PDL cells in 100 μ M EGCG and tap water demonstrated remarkably decreased rate of viability ($p < 0.05$). Survival rates of PDL cells in less than 20 μ M EGCG was similar with HBSS ($p > 0.05$). Survival rate of PDL cells in 50 μ M EGCG was decreased after 3 hr ($p < 0.05$). Also, survival rates of PDL cells in 100 μ M EGCG and tap water were significantly low ($p < 0.05$).

Conclusion: PDL cells stored in less than 20 μ M appear to be effective concentration for preserving the viability of PDL cells.

Key words : Epigallocatechin-3-gallate; periodontal ligament cell; avulsion; storage medium

서 론

치아가 완전탈구 되었을 때에는 치아를 즉시 재식하는 것을 가장 권장하며, 즉시 재식되지 않을 경우 많은 합병증을 야기한다.^{1,2} 성공적인 재식에 영향을 주는 요소로는 재식 시까지의 경과 시간, 치아 보관방법, 치근발육 정도, 감염여부, 고정 기간 및 적절한 시기의 근관치료 등이 있다.³ 이 중 재식 시까지 경과된 시간과 보관 방법이 재식치아의 예후에 중요한 역할을 하며, 이는 치주인대세포의 생활력

과 밀접한 관련이 있다.^{4,5} 그러나 외상 당시의 위급함과 많은 출혈, 재식에 관한 환자와 보호자의 지식 부족 및 부상 부위의 복잡한 손상 등의 원인으로 외상장소에서 즉시 재식은 드물게 이루어지고 있다.^{3,4,6} 여러 문헌에 의하면 완전탈구 치아의 재식은 외상 후 1-4시간 사이에 가장 많이 이루어진다고 보고되고 있다.^{1,3,7} 따라서 탈구된 치아의 보관용액에 관한 연구는 치주인대세포의 생활력을 유지하는 방법에 중점을 두고 있다.^{3,4} 보관용액의 요구 조건으로는 적절한 pH와 삼투압 농도를 갖추어 치주인대 세포의 생활

Reprint request to : Sung Chul Choi, DMD, MSD, PhD Chair and professor

Department of Pediatric dentistry, School of Dentistry, Kyung Hee University 1 Hoegi-dong, Dongdaemun-gu, Seoul, Korea

Tel: 82-2-958-9339 Fax: 82-2-965-7247 E-mail: pedochoi@khu.ac.kr

력을 보존할 수 있어야 하며, 외상 시에 환자와 보호자가 주위에서 쉽게 구할 수 있어야 한다.⁸⁻¹¹ 탈구치의 보관용액으로는 Hank's balanced salt solution(HBSS)을 완전탈구치의 저장용액으로 권장하고 있으며, 일반인이 쉽게 구할 수 있는 우유를 그 다음의 적절한 저장매체로 권장하고 있다.^{12,13} 그 외에도 propolis, coconut water, 스포츠 음료, 녹차 등의 다른 저장매체를 찾기 위한 노력이 꾸준히 이루어지고 있다.¹⁴⁻¹⁷

녹차는 다량의 폴리페놀을 함유하고 있으며, 이 폴리페놀은 4가지 주요한 형태인 epicatechin, epigallocatechin, epicatechin-3-gallate, epigallocatechin-3-gallate(EGCG)로 구성되어 있다.¹⁸ 그 중에서 가장 풍부한 폴리페놀인 EGCG는 항염, 항균, 항산화 및 종양억제 물질로 작용하는 것으로 다양한 실험을 통하여 보고되고 있다.¹⁹⁻²¹ 또한 EGCG는 치은 섬유모세포와 골모세포에서 유래되는 염증 유도 관여세포를 제어하고 염증 cytokine의 생산을 감소시킨다고 하였으며, 파골세포의 발현을 억제하거나 파골세포의 사멸을 유도하는 효과가 있다고 보고된 바 있다.²²⁻²⁵ 따라서 EGCG의 항산화 및 항염 효과에 근거하여 사람의 피부 섬유모세포, 치은 섬유모세포, 골수세포 등과 같은 조직 및 세포의 저장용액으로서 다양하게 연구되어 왔다.^{23,25-27} 반면, 과량의 EGCG를 적용할 경우 많은 양의 과산화수소가 유리되어 세포 독성을 나타낸다고 보고된 바 있다.²⁸ 그러나 아직까지는 완전탈구치의 치주인대세포를 저장하기 위한 매체로서 EGCG의 효과에 대한 연구는 거의 보고된 바 없다. 이에 본 연구는 다양한 농도의 EGCG가 인간 치주인대 세포의 활성도 및 생존율에 미치는 효과를 평가하여 완전탈구치의 저장매체로서의 효용성을 확인하고자 하였다.

연구대상 및 방법

치주인대 세포의 분리 및 배양

본 연구는 경희대학교 치과병원 임상 연구 윤리 위원(Institutional Review Board, IRB)의 승인 하에 진행되었다(KHD-IRB 2009-8). 치아우식증 및 치주질환이 없는 사람의 교정 목적으로 발거된 건강한 소구치로부터 치주인대 세포를 분리하여 배양한 세포를 대상으로 하였다. 배양액으로는 10% fetal bovine serum(Gibco BRL, Life Tech. Grand Island, NY, USA)을 9%, Penicillin-Streptomycin solution(Gibco BRL)을 1%, Dulbecco's modified eagle's medium(Gibco BRL)을 90%로 혼합하여 사용하였다. 조심스럽게 발거된 소구치를 HBSS(Gibco BRL)에 넣어 실험실로 즉시 옮겨졌다. 무균 실험대 안에서 #11 blade 로 치근 중간 1/3을 긁어 치주인대조직을 치근면에서 채취하였다.

이를 24 well plate에 배양액을 넣어 37°C, 100% 습도, 5% CO₂ incubator(VS-9000C, Vision Scientific, Gyeonggi-do, Korea)에서 배양하였다. 이후 2-3일 간격으로 배양액을 교체하여 주었고, 세포 증식에 따라 0.05% trypsin(Gibco BRL)을 사용하여 계대배양하였다. 본 실험에서는 3-5세대의 치주인대 세포를 사용하였다.

실험 군의 분류

각 실험 군은 Dulbecco's phosphate-buffered saline(D-PBS) (Gibco BRL)으로 세척한 후 각 실험 용액에 저장하였다. EGCG는 Sigma Aldrich사의 제품을 사용하였으며, 용매로는 HBSS를 이용하였는데 이는 최적의 pH와 삼투압을 지니기 때문이다. 실험 군은 다음과 같이 분류하였다.

- Group I - HBSS
- Group II - HBSS + EGCG 1 μM
- Group III - HBSS + EGCG 5 μM
- Group IV - HBSS + EGCG 10 μM
- Group V - HBSS + EGCG 20 μM
- Group VI - HBSS + EGCG 50 μM
- Group VII - HBSS + EGCG 100 μM
- Group VIII - Tap water

MTS assay 를 이용한 cell viability 측정

각 저장용액에 보관된 치주인대 세포의 cell viability를 평가하기 위해 살아있는 세포의 세포 내 활성을 이용하는 방법인 MTS assay[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]를 이용하였다. 배양된 세포를 96 well plate 에 3×10³개씩 접종하여 12시간 정도 incubator에서 배양하였다. 세포 부착 상태를 확인한 후 D-PBS로 세척한 후 각 시약을 접종하여 22°C에서 1, 3, 6, 12 및 24시간 동안 지켜보았다. 정해진 시간이 지난 후 시약을 제거하고 D-PBS로 세척한 후 배양액을 100 μL씩 다시 넣고 MTS 시약을 20 μL 넣은 후 은박지로 plate를 감싸서 빛을 차단시킨 후 incubator에 4시간 다시 배양하였다. 그 후 ELISA(Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA)를 이용하여 제조사가 지시한 490 nm의 파장으로 활성화된 살아있는 세포를 정량화 하였다.

Nucleocounter[®] NC-100 system을 이용한 cell viability 측정

배양된 세포를 6 well 배양접시에 각각 2×10⁵개의 세포를 접종하고 접시에 붙을 수 있도록 12 시간 정도 incubator에서 배양하였다. 세포 부착 상태를 확인하고 배양액을 제거하고 D-PBS로 세척한 후 시약을 각각 2 mL씩 넣고 22°C 실온에 보관하였다. 초기 배양된 세포의 균일한 배양을 확인하기 위하여 0시간 군은 시약을 첨가하지 않고 바로 측

정하였다. 또한 각각의 well은 1, 3, 6, 12 및 24시간 후에 NucleoCounter[®] NC-100™ system(Chemometec, Allerød, Denmark) 을 이용하여 세포의 생존율을 측정하였다. 실험 과정은 회사의 지침에 따라 이루어 졌다. NucleoView™ (Windows 2000, version 2.2) 를 통하여 결과를 확인하였다. 본 실험은 각 군마다 3회 반복 시행하였다.

통계분석

EGCG 의 농도 차이에 따른 PDL cell의 시간에 따른 생활력을 비교하기 위하여 Repeated measurement ANOVA test를 시행하였으며 Duncan’s method 으로 사후검정 하였다. 그리고 각 시점에서 EGCG 의 농도 차이에 따른 유의성을 살펴보기 위하여 one-way ANOVA test를 실행하였으며, Duncan’s method로 사후 검정 하였다. 모든 실험에서 $p < 0.05$ 를 유의한 수준으로 평가하였다.

연구성적

MTS Assay를 이용한 세포활성도 검사

실험군은 다음과 같은 4가지의 경향으로 나타났다. 이중 첫 번째(HBSS, 1, 5 및 20 μM군)과 두 번째(HBSS, 1, 10, 20 및 50 μM군) 는 유사한 경향으로 세포활성도가 초기 1시간부터 12시간까지 큰 변화를 보이지 않았다. 그러나 24시간이 경과된 세포들에서는 흡광도(optical density; OD)가 0.30 수준으로 떨어지는 것을 볼 수 있었다 (Table 1). 즉, HBSS에 저장된 치주인대세포의 활성도와 비교하였을 때 5가지의 농도에서의 유의성이 없는 것으로 나타났다 ($p > 0.05$). 동일한 저장 시간대에서의 비교를 보았을 때 세포 활성도는 5 μM군 이상이 HBSS군과 모든 시간대에서 유사한 것으로 나타났다 ($p > 0.05$). 세 번째 경향은 100 μM 군으로 1시간 뒤의 세포활성이 0.35 수준으로 떨어졌으며, 6시간 이후에는 흡광도가 0.26 수준으로 활성도가 떨어지는 것을 관찰할 수 있었다 (Table 1). 마지막으로 Tap water 군은 1시간 이후부터 흡광도가 0.23 정도로 세포활성이 매우 낮게 떨어지는 것을 관찰 할 수 있었다 (Table 1).

**NucleoCounter[®] System을 이용한 세포 생존율 검사
HBSS, 6 단계 농도의 EGCG 용액 및 Tap water에 저장**

Table 1. Optical density of each experimental media

Experimental group		Storage time					
		0 h	1h	3h	6h	12h	24h
HBSS	1,2	0.57±0.03 ^{AB}	0.41±0.03 ^{AB}	0.38±0.03 ^{AB}	0.40±0.02 ^{AB}	0.45±0.02 ^A	0.34±0.04 ^A
1 μM EGCG	1,2	0.55±0.08 ^{AB}	0.43±0.16 ^{AB}	0.42±0.05 ^{ABC}	0.41±0.04 ^{AB}	0.45±0.03 ^A	0.35±0.04 ^A
5 μM EGCG	1	0.62±0.10 ^{BC}	0.54±0.17 ^B	0.38±0.05 ^{AB}	0.44±0.06 ^A	0.45±0.03 ^A	0.34±0.03 ^A
10 μM EGCG	2	0.49±0.07 ^A	0.40±0.07 ^{AB}	0.43±0.04 ^{AC}	0.36±0.05 ^B	0.44±0.08 ^A	0.29±0.01 ^{BC}
20 μM EGCG	1,2	0.61±0.07 ^{BC}	0.43±0.07 ^{AB}	0.47±0.06 ^C	0.43±0.05 ^A	0.30±0.11 ^B	0.30±0.01 ^B
50 μM EGCG	2	0.69±0.09 ^C	0.38±0.03 ^A	0.38±0.05 ^{AB}	0.37±0.07 ^B	0.36±0.10 ^{AB}	0.30±0.02 ^{BC}
100 μM EGCG	3	0.56±0.02 ^{AB}	0.35±0.03 ^{AC}	0.31±0.00 ^D	0.26±0.01 ^C	0.31±0.00 ^B	0.26±0.00 ^C
Tap water	4	0.49±0.06 ^A	0.23±0.10 ^C	0.22±0.09 ^E	0.24±0.08 ^C	0.30±0.08 ^B	0.26±0.49 ^C

1, 2, 3, and 4 presents a significant difference in repeated measurement ANOVA test ($p < 0.05$), different letters indicate statistical significant in one way ANOVA test comparing each group at the same storage time ($p < 0.05$).

Table 2. Survival rate of PDL cells at each experimental medium using NucleoCounter[®] system

Experimental group		Storage time					
		0 h	1h	3h	6h	12h	24h
HBSS	1	91.4±5.7 ^A	94.8±2.4 ^A	92.2±6.0 ^A	96.0±0.9 ^A	91.6±7.2 ^A	86.1±7.0 ^A
1 μM EGCG	1	93.8±5.2 ^A	95.5±1.8 ^A	89.3±4.7 ^{AB}	96.5±1.3 ^A	94.3±1.9 ^A	87.3±5.5 ^A
5 μM EGCG	1	91.8±7.0 ^A	95.1±2.4 ^A	91.4±5.7 ^A	93.7±0.6 ^A	90.3±1.5 ^A	85.7±2.1 ^A
10 μM EGCG	1	94.0±2.5 ^A	92.2±5.0 ^A	91.0±3.1 ^A	94.8±2.7 ^A	93.1±1.7 ^A	85.4±8.8 ^A
20 μM EGCG	1	92.6±7.6 ^A	93.1±1.9 ^A	94.2±1.5 ^A	90.6±1.5 ^{AB}	86.7±2.1 ^A	86.8±3.0 ^A
50 μM EGCG	1	93.9±5.3 ^A	93.9±1.7 ^A	81.5±5.4 ^{BC}	77.3±6.8 ^C	73.5±6.0 ^B	60.3±5.9 ^B
100 μM EGCG	2	95.0±3.6 ^A	88.1±8.0 ^A	74.6±6.9 ^C	79.1±13.5 ^{BC}	30.8±53.4 ^{BC}	31.3±54.2 ^{BC}
Tap water	3	92.5±7.6 ^A	16.3±28.2 ^B	0.0±0.0 ^D	6.3±11.0 ^D	11.7±20.2 ^C	0.0±0.0 ^C

1, 2, and 3 presents a significant difference in repeated measurement ANOVA test ($p < 0.05$), different letters indicate statistical significant in one way ANOVA test comparing each group at the same storage time ($p < 0.05$).

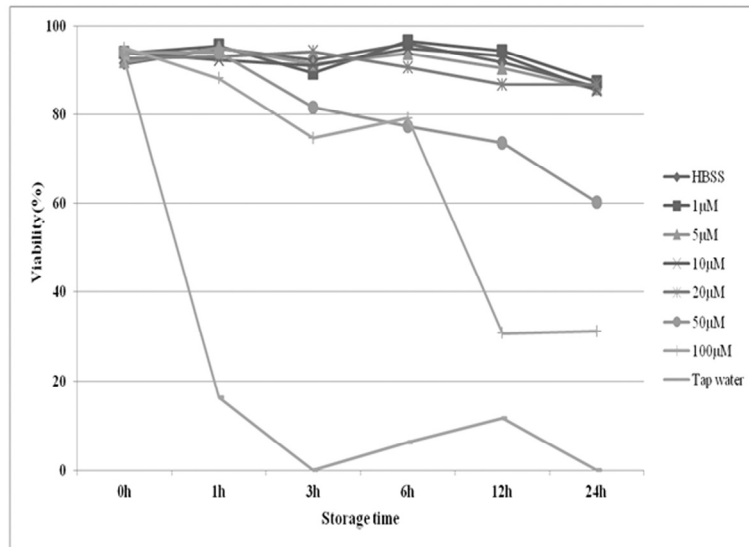


Fig. 1. Viability of PDL cells maintained in each experimental medium using NucleoCounter® system.

한 치주인대세포는 실온에서 1, 3, 6, 12 및 24시간 동안 저장한 후 치주인대 세포의 생존율을 생세포의 핵을 형광 염색하여 개수를 직접 측정하는 방법인 NucleoCounter® System을 이용하여 평가하였다. 8가지 실험군은 세 가지의 경향으로 나타났다. 첫 번째 경향은 HBSS, 1, 5, 10, 20 및 50 µM군으로 시간에 따라서 서서히 세포가 사멸하는 경향을 보였다 ($p < 0.05$). 이 실험군 중 50 µM군을 제외한 군에서는 초기에 90% 이상의 세포생존율을 보였으며 24시간 뒤에 약 85%의 대체로 높은 세포생존율로 HBSS와 유사한 결과를 보였다 (Table 2). 그러나 이 중 50 µM군은 동일시간에서의 세포생존율을 비교한 one-way ANOVA검사에서 6시간 이후부터의 생존율이 낮게 나타났다 ($p < 0.05$) (Table 2 and Figure 1). 두 번째 경향을 보인 것은 100 µM군으로 6시간까지의 세포생존율은 첫 번째 경향을 보인 군들과 큰 차이가 없었으나 12시간 이후에 세포생존율이 30% 대로 급격히 떨어지는 경향을 보였다 (Table 2). 마지막으로 Tap water군은 1시간 이후부터 생존율이 확연히 떨어지는 것을 관찰할 수 있었다 ($p < 0.05$).

총괄 및 고찰

EGCG는 녹차의 성분 중 가장 풍부한 폴리페놀로 항산화, 항염, 항균 및 항암작용이 있는 것으로 보고되고 있다.^{18,23,29,30} 이러한 EGCG의 약리학적 효과 중 항산화 효과는 EGCG가 세포의 세포분열 과정 중 S기를 억제하고 동면 상태로 만들어 증식을 중단하게 하며, 세포의 형태학적 파괴를 감소시키고 더불어 산화로 인한 손상에서 세포를

보호하여 조직 및 장기 보관의 가능성을 보이고 있다.³¹ 그러나 이러한 녹차의 폴리페놀이 세포 배양액에 첨가되었을 때 과산화 수소를 발생시킬 수 있으며, 이러한 과산화 수소는 세포의 사멸 및 세포 독성을 나타낸다고 보고되고 있다.³² 또한 고농도의 EGCG를 쥐의 섬유아세포에 적용했을 시, 포름알데히드나 글루타알데히드와 같은 정도의 세포 독성을 보이는 H₂O₂가 유리된다고 보고되었다.²⁸ 이에 본 연구는 완전 탈구된 치아의 저장 매체로서 EGCG의 효과를 검증하고자 여러 농도를 설정하여 세포 독성을 가지지 않는 EGCG의 적절한 농도를 알아보고자 하였다. 또한 HBSS는 세계치과외상학회에서 추천되는 완전 탈구치의 저장용액으로 삼투압 농도는 270-290 mosmol/kg이고 pH는 7.2로 세포 생존에 적절한 조건을 가지고 있으며, 치주인대 세포의 생활력을 오랜 기간 동안 보존하는 능력을 지닌 것으로 보고되었다.¹³ 이에 본 연구에서 HBSS를 용매로 하여 1, 5, 10, 20, 50 및 100 µM농도의 EGCG용액을 만들어 치주인대세포의 저장매체로 선택하였다.

치주인대세포의 활성도를 평가하는데 주로 사용되는 실험 방법으로는 염색 과정을 통하여 직접 세포 수를 세는 방법, 세포 증식 시 방사선 동위원소를 이용하여 측정하는 방법, MTT assay, MTS assay와 같이 미토콘드리아 효소 활성을 이용하는 방법 등이 주로 사용되고 있다.³³⁻³⁶ 이 중 MTS assay는 MTT assay와 동일한 원리를 사용하나 MTS assay에서 합성되는 formazan은 높은 용해도를 가지므로 유기용제를 사용할 필요가 없는 장점을 가진다.^{37,38} 따라서 본 실험과 같은 저장용액 실험에서 MTS assay는 MTT assay에서와 달리 저장용액의 제거 과정이 필요하지 않아 세포의 손상을 줄일 수 있으므로 더욱 확실한 실험 결과를

가질 수 있는 장점을 가지고 있어 세포활성도 검사법으로 채택하였다.

최근에는 형광 염색된 세포핵을 자동화 과정을 통하여 쉽고 빠르게 계수하는 방법으로 NucleoCounter[®] system이 소개되었다. NucleoCounter[®] System은 형광 현미경에 기반한 자동 세포 계수기로 전통적인 haemocytometer와 trypan blue 염색 계수법보다 효과적이고 믿을 만한 결과를 보인다. 또한 이 장치는 반복되는 분석에 일관성을 나타내며, 관찰자의 변이를 줄일 수 있는 장점을 가진다.³⁹ NucleoCounter[®] System의 기본 원리는 세포막이 파괴된 사세포의 핵에 propidium iodine이 결합하여 형광물질을 방출하게 된다. 또한 생세포의 세포막은 Lysis buffer로 처리되어 파괴되며 세포핵이 유출되면 전체 세포핵의 개수를 검출하게 된다. 이 값들은 Nucleoview[™] (windows 2000, version 2.2)를 통하여 자동 계산되며 세포 생존율을 알 수 있게 된다. 본 실험에서는 MTS assay의 세포활성도 검사와 더불어 NucleoCounter[®] system을 이용하여 저장용액에서의 세포생존율을 측정하였다.

MTS assay에서는 네 개의 경향으로 나타났다. 그러나 첫 번째와 두 번째 경향은 본 실험의 대조군인 HBSS와 비교하였을 때 각각 유의성 있는 결과를 나타냈다. 이는 시간의 변화에 따른 1, 10 및 50 μM 농도의 EGCG의 OD값의 차이로 나타나며, HBSS를 직접 비교하였을 때는 5개의 농도는 차이가 없는 것으로 예측할 수 있었다. 100 μM 농도의 EGCG는 3시간 이후부터 세포의 활성도가 현저히 떨어지는 것을 볼 수 있었으며, 이는 Matsumura 등²⁸의 연구에서 세포독성이 나타나는 용량과 유사한 정도의 양이라 할 수 있다. 따라서 100 μM 농도의 EGCG용액은 세포독성이 나타나는 것으로 추측할 수 있다. Tap water군은 1시간 저장한 뒤 측정된 세포활성도 검사에서 활성이 거의 없는 것으로 측정되었는데 이는 수돗물의 낮은 삼투압 농도로 인한 세포사에서 기인한다고 볼 수 있다.

Nucleocounter[®] system을 이용한 분석에서는 세 가지의 경향이 나타났다. 첫 번째 경향은 HBSS 군으로 지속적인 세포생존율을 보여주었고, 다른 1, 5, 10, 20 및 50 μM 농도의 EGCG와 유의성이 없었다. 이는 기존의 녹차 추출물을 이용한 논문과 유사한 결과를 보였다. 황 등¹⁷에 의하면 녹차 추출물을 치주인대 세포 저장용액으로 사용하였을 경우 24시간까지 HBSS와 유사한 세포생존율을 보인다고 하였다. 반면 100 μM 농도의 EGCG는 기존의 연구와 다르게 12시간 후에 낮은 세포생존율을 보였다. 이는 MTS assay에서와 유사한 경향을 보이는 것으로 EGCG의 세포독성에 기인한다고 볼 수 있다. 50 μM 농도의 EGCG는 동일한 시간대의 다른 EGCG용액에 비하여 3시간 이후부터 세포생존율이 떨어지는 경향을 볼 수 있었으며, 24시간 저장시 세포생존율이 60%까지 떨어지는 것을 볼 수 있었다.

황 등¹⁷의 연구에 의하면 우유에 저장하는 경우 NC-100을 이용한 세포생존율 실험에서 24시간에 60% 정도의 세포생존율을 보였으며 이는 다른 녹차 추출물에 비하여 세포생존율이 떨어지므로 추천 용량에서 제외되었다. 세 번째 경향인 Tap water군은 MTS assay와 같이 1시간 이후부터 세포의 생존율이 급격하게 떨어졌다.

EGCG의 항염, 항균, 및 항산화 작용을 고려하여 완전탈구치 저장액의 첨가물로서 그 가능성을 확인하고자 본 실험을 시행하였다. 이상의 연구결과로 미루어 보았을 때 세포생존율과 세포 활성을 유지하는 적절한 농도는 1-20 μM 사이의 EGCG 농도를 추천할 수 있었다. 하지만 50 μM 이상의 EGCG의 첨가는 아직 논란의 여지가 남아있다고 생각된다. 따라서 향후 추가적인 연구에서는 1-20 μM 사이의 EGCG 적용이 치주 인대세포에서 발생 가능한 유전적인 변이를 관찰하여 치아 저장 용액이나 다른 조직 및 세포 저장시 얻을 수 있는 장단점을 알아내는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구를 통해 EGCG가 치주인대세포의 활성도 및 생존율에 영향을 줄 수 있음을 관찰하였으며, 치주인대세포의 저장에 있어 세포사를 일으키지 않는 EGCG의 적절한 농도를 확인하였다. 따라서 20 μM 농도 이하의 EGCG 용액을 이용한 저장매체에 관한 세포생활력 유지, 항산화, 항균 및 항염증 작용에 관한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Reference

1. Andreasen JO, Andreasen FM, Andersson L. Textbook and color atlas of traumatic injuries to the teeth. 4th edition. Copenhagen: Blackwell Munksgaard; 2007.
2. Andersson L. Tooth avulsion and replantation. Dent Traumatol 2007;23:129.
3. Blomlof L, Andersson L, Lindskog S, et al. Periodontal healing of replanted monkey teeth prevented from drying. Acta Odontol Scand 1983;41:117-123.
4. Andreasen JO. Effect of extra-alveolar period and storage media upon periodontal and pulpal healing after replantation of mature permanent incisors in monkey. Int J Oral Surg, 1981;10:43-53.
5. Jeon I, Kim E, Kim J, Lee SJ. Evaluation of periodontal ligament cell viability in rat teeth according to various extra-oral dry storage times using MTT assay. J Kor Acad Cons Dent 2006;31:398-409.
6. Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 4. Factors related to periodontal ligament healing. Endod Dent Traumatol 1995;11:76-89.
7. Bakland LK. Tooth avulsion and replantation. J Calif Dent

- Assoc 2005;33:676-677.
8. Blomof L, Otteskog P. Viability of human periodontal ligament cells after storage in milk or saliva. *Scand J Dent Res* 1980;88:436-440.
 9. Courts FJ, Mueller WA, Tabeling HJ. Milk as an interim storage medium for avulsed teeth. *Pediatr Dent* 1983;5:183-186.
 10. Lekic PC, Kenny DJ, Barret EJ. The influence of storage conditions on the clonogenic capacity of periodontal ligament cells: implications for tooth replantation. *Int Endod J* 1998;31:137-140.
 11. Ashkenazi M, Sarnat H, Keila S. *In vitro* viability, mitogenicity and clonogenic capacity of periodontal ligament cells after storage in six different media. *Endod Dent Traumatol* 1999;15:149-156.
 12. American Association of Endodontists. Recommended Guidelines of the American Association of Endodontists. Treatment of the Avulsed permanent Tooth. 1994;221-225. Flores MT, Andersson L, Andersen JO, et al. Guidelines for the management of traumatic dental injuries. II. Avulsion of permanent teeth. *Dent Traumatol* 2007;23:130-136.
 13. Martin MP, Pileggi R. A quantitative analysis of Propolis: a promising new storage media following avulsion. *Dent Traumatol* 2004;20:85-89.
 14. Gopikrishna V, Baweja PS, Venkateshbabu N, et al. Comparison of coconut water, propolis, HBSS, and milk on PDL cell survival. *J Endod* 2008;34:587-589.
 15. Chamorro MM, Regan JD, Opperman LA, et al. Effect of storage media on human periodontal ligament cell apoptosis. *Dent Traumatol* 2008;24:11-16.
 16. Hwang JY, Choi SC, Park JH, et al. The use of green tea extract as a storage medium for the avulsed tooth. *J Endod* 2011;37:962-967.
 17. Nagle DG, Ferreira D, Zhou YD. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Chemical and biomedical perspectives. *Phytochemistry* 2006;67:1849-1855.
 18. Dreosti IE. Bioactive ingredients: antioxidants and polyphenols in tea. *Nutr Rev* 1996;54:S51-S58.
 19. Crespy V, Williamson G. A review of the health effects of green tea catechins in *in vivo* animal models. *J Nutr* 2004;134:S3431-S3440.
 20. Elbling L, Weiss RM, Teufelhofer O, et al. Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities. *FASEB J* 2005;19:807-809.
 21. Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Adachi S, et al. (-)-Epigallocatechin gallate reduces platelet-derived growth factor-BB-stimulated interleukin-6 synthesis in osteoblasts: suppression of SAPK/JNK. *Mediators Inflamm* 2008;2008:291808.
 22. Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, et al. Catechins inhibit CCL20 production in IL-17 A stimulated human gingival fibroblasts. *Cell Physiol Biochem* 2009;24:391-396.
 23. Nakamura H, Ukai T, Yoshimura A, et al. Green tea catechin inhibits lipopolysaccharide-induced bone resorpti in vivo. *J Periodontal Res* 2010;45:23-30.
 24. Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, et al. Catechins inhibit CXCL10 production from oncostatin M-stimulated human gingival fibroblasts. *J Nutr Biochem* 2010;21:659-664.
 25. Hyon SH. A non-frozen living tissue bank for allotransplantation using green tea polyphenols. *Yonsei Med J* 2004;45:1025-1034.
 26. Kashiwa K, Kotobuki N, Tadokoro M, et al. Effects of epigallocatechingallate (EGCG) on osteogenic capability of human mesenchymal stem cells (MSCs) after suspension in phosphate buffered saline. *Tissue Eng Part A* 2009;16:91-100.
 27. Matsumura K, Kim JY, Tsutsumi S, Hyon SH. Hibernation, reversible cell growth inhibition by epigallocatechin-3-Ogallate. *J Biotechnol* 2007;127:758-764.
 28. Elemets CA, Singh D, Tubesing K, et al. Cutaneous photoprotection from ultraviolet injury by green tea polyphenols. *J Am Acad Dermatol* 2001;44:425-432.
 29. Ahn WS, Huh SW, Bae SM, et al. A major constituent of green tea, EGCG, inhibits the growth of a human cervical cancer cell line, CaSki cells, through apoptosis, G(1) arrest, and regulation of gene expression. *DNA Cell Biol* 2003;22:217-224.
 30. Han DW, Hyon SH, Park JC, et al. Non-frozen preservation of mammalian tissue using green tea polyphenolic compounds. *Biomed Mater* 2006;1:18-29.
 31. Long LH, Clement MV, Halliwell B. Artifacts in cell culture: rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallo- catechin gallate, (+)-catechin, and quercetin to commonly used cell culture media. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273:50-53.
 32. Altman SA, Randers L, Rao G. Comparison of Trypan Blue Dye Exclusion and Fluorometric Assays for Mammalian Cell Viability Determinations. *Biotechnol Prog* 1993;9:671-674.
 33. Lindskog S, Blomlof L, Hammarstrom L. Mitosis and microorganism in the periodontal membrane after storage in milk or saliva. *Scand J Dent Res* 1983;91:465-472.
 34. Casaroto AR, Hidalgo MM, Sell AM, et al. Study of the effectiveness of propolis extract as a storage medium for avulsed teeth. *Dent Traumatol*, 2010;26:323-331.
 35. Souza BDM, Luckemeyer DD, Felipe WT, et al. Effect of temperature and storage media on human periodontal ligament fibroblast viability. *Dent Traumatol* 2010;26:272-275.
 36. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
 37. Santini V, Bernabei PA, Silvestro L, et al. *In vitro* chemosensitivity testing of leukemic cells: prediction of response to chemotherapy in patients with acute non-lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol* 1989;7:243-253.
 38. Shah D, Naciri M, Clee P, et al. Nucleocounter-An efficient technique for the determination of cell number and viability in animal cell culture processes. *Cytotechnology* 2006;51:39-44.