

무막줄기세포추출물의 H₂O₂에 의해 유도된 치주 세포의 염증 반응 보호 효과

허메이통¹, 김지현¹, 김영실², 박혜숙², 조은주^{1*}
¹부산대학교 식품영양학과 ²(주)티스템

Protective Effects of Membrane-Free Stem Cell Extract from H₂O₂-Induced Inflammation Responses in Human Periodontal Ligament Fibroblasts

Mei Tong He¹, Ji Hyun Kim¹, Young Sil Kim², Hye Sook Park², Eun Ju Cho^{1*}
¹Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University
²T-STEM Co., Ltd.

요약 대표적인 치주질환인 치주염은 출혈, 통증 및 치아 손실을 초래하며, 산화적 스트레스는 치주염의 주요 원인으로 알려져 있다. 본 연구는 지방조직 유래 무막줄기세포추출물의 H₂O₂ 유도 산화적 손상에 대한 치주염 보호 효과를 확인하고자, 치주인대 섬유모세포(human periodontal ligament fibroblasts; HPLF)를 이용하여 세포 생존율, 염증 및 세포 사멸 관련 단백질 발현을 측정하였다. H₂O₂로 산화적 스트레스를 유도한 HPLF 세포에 무막줄기세포추출물 처리 시, H₂O₂만을 처리한 control군에 비해 유의적으로 세포 생존율이 증가함을 통해 산화적 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인하였다. 또한, 무막줄기세포추출물은 nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells, inducible nitric oxide synthase 및 interleukin-6와 같은 염증 관련 단백질 발현을 감소시켜 H₂O₂로 유도된 염증 반응 보호 효과를 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라, 무막줄기세포추출물 처리 군은 caspase-9, -3, poly (ADP-ribose) polymerase 단백질 발현 감소와 B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)-associated X protein/Bcl-2 비율을 저하시켜 H₂O₂ 유도 산화적 손상에 대한 세포사멸 보호 효과를 보였다. 따라서 지방조직 유래 무막줄기세포추출물은 H₂O₂ 유도 산화적 손상에 대한 HPLF 세포의 염증반응 및 세포사멸을 저해함으로써 치주염으로부터 보호 효과가 있어, 치주질환 치료용 소재로서의 활용 가능성이 있을 것으로 기대된다.

Abstract Periodontal inflammation, a major kind of periodontal diseases, is characterized to bleed, pain, and teeth loss, and it is resulted from oxidative stress. Membrane-free stem cell extract could avoid the immunogenicity rejection by removal of cell membrane. In the present study, we investigated the protective effect of membrane-free stem cell extract from oxidative stress-induced periodontal inflammation in human periodontal ligament fibroblasts (HPLF). In the cell viability measurement, membrane-free stem cell extract showed significant increase of cell viability, compared with the H₂O₂-treated control group. To further investigation of molecular mechanisms, we measured inflammation and apoptosis related protein expressions. Membrane-free stem cell extract attenuated inflammation-related protein expressions such as nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells, inducible nitric oxide synthase, and interleukin-6. In addition, the treatment of membrane-free stem cell extract decreased apoptotic protein expressions such as cleaved caspase-9, -3, poly (ADP-ribose) polymerase, and B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)-associated X protein/Bcl-2 ratio in the H₂O₂-treated HPLF cells. In conclusion, membrane-free stem cell extract exhibited anti-oxidative stress effects by regulation of inflammation and apoptosis in HPLF, suggesting that it could be used as the treatment agents for periodontal inflammatory disease.

Keywords : Apoptosis, Human Periodontal Ligament Fibroblasts, Hydrogen Peroxide, Inflammation, Membrane-Free Stem Cell Extract

*Corresponding Author : Eun Ju Cho(Pusan National Univ.)

Tel: +82-51-510-2837 email: ejcho@pusan.ac.kr

Received February 26, 2019

Revised March 18, 2019

Accepted June 7, 2019

Published June 30, 2019

1. 서론

치주염은 가장 흔히 발생하는 대표적인 구강질환으로, 치주인대, 치은 등을 파괴하며, 심각할 경우 치아 손실의 원인이 된다[1]. 이러한 치주 염증의 발생은 염증성 세균으로 인한 산화적 스트레스가 주요 원인으로 알려져 있다[2]. H_2O_2 는 생체 대사과정 중 발생하는 중간 대사산물 중의 하나이지만, 과다 생성 시 세포에 산화적 스트레스를 유발하는 대표적인 물질 중의 하나이다[3]. H_2O_2 로 인한 산화적 스트레스는 치주질환의 발병에 중요한 역할을 하며, 특히 사람의 치주인대 섬유모세포(HPLF: Human Periodontal Ligament Fibroblasts, 이하 HPLF)에서 염증성 cytokines 및 chemokines 등의 염증 인자를 방출하여 염증반응, 세포 형태의 파괴 및 세포사멸을 일으켜 치주염을 일으키는 것으로 알려져 있다[4,5]. 따라서 염증 반응 개선을 통한 치주염 치료 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 본 연구에서는 줄기세포(stem cell)를 이용하여 치주염 개선 가능성을 확인하고자 한다.

인체의 장기, 피부, 뼈, 연골 등을 구성하는 세포들은 세포사멸과 세포생성을 통해 체내 항상성을 유지하는데, 세포 생성을 새롭게 유도하는 세포를 줄기세포라고 한다[6]. 줄기세포의 일종인 성체줄기세포(adult stem cell)는 주로 재생능력이 우수하며, 자가복제력이 매우 뛰어난 것으로 알려져 있다[6]. 또한, 성체줄기세포는 다른 조직으로 다중 분화될 수 있는 능력을 가지며, 조직의 손상 시 정상적인 복구와 회복에 도움을 줄 뿐만 아니라 항염증 작용이 동반되는 것으로 보고되었다[6,7]. 따라서 성체줄기세포를 이용하여 치매, 심장병, 당뇨병, 피부개선 등 다양한 질환에서의 치료에 활발히 이용되어지고 있다[7,8]. 줄기세포는 골수, 피부조직, 간조직, 지방조직 등 거의 모든 조직에 존재하여 얻을 수 있으며, 가장 먼저 알려진 줄기세포는 골수에서 유래되어 현재까지도 가장 많이 사용되어지고 있다[9]. 그러나 골수 내 줄기세포의 수는 다른 조직에 비해 적으며, 나이가 들어감에 따라 세포 수명이 감소하는 것으로 보고되었다[9,10]. 따라서 골수를 대체하여 줄기세포를 분리할 수 있는 조직이 필요한 실정이며, 최근 지방조직으로부터 분리된 줄기 세포의 질병 치료 가능성에 대한 관심이 증가하였다[10]. 골수조직에 비해 지방 조직은 획득 비용이 적게 들 뿐만 아니라 많은 양을 사용할 수 있다. 뿐만 아니라, 지방조직 유래 줄기세포는 지방세포, 골모세포, 연골모세포, 근섬유모세포 등으로 분화할 수 있는 다분화능의 특징을 갖고, 생리활성으로 혈관 신생 효능 등이 보고되었다[11,12].

줄기세포를 이용하여 임상시험에서의 질병치료 연구가 활발히 이루어지고 있으나, 인체의 면역 체계에 의해 세포 면역거부 가능성이 높으며, 경제적 부담이 크다[13,14]. 따라서 이러한 줄기세포 치료제의 단점을 보완하기 위해, 최근 무막줄기세포추출물에 대한 관심이 높다. 무막줄기세포추출물(membrane-free stem cell extract)은 면역 항체가 존재하는 줄기세포의 세포막을 제거한 뒤 각종 펩타이드와 성장인자들만을 함유한 추출물로서, 골프로 인한 손상에 대해 관절, 인대, 힘줄 및 근육 조직의 염증 개선 효능을 확인하였다[14]. 또한, 지방조직 유래 줄기세포의 치주염 동물 모델에서 치주조직 재생 효능이 보고되었으나[15], 지방조직 유래 무막줄기세포추출물의 치주염 보호 효과와 관련한 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구는 사람 지방조직 유래 무막줄기세포추출물의 H_2O_2 유도 산화적 손상에 대한 치주염 보호 효과를 확인하고자한다. 치주인대 섬유모세포를 이용하여 세포생존율, 염증 및 세포사멸 관련 단백질 발현 측정하여 치주염 보호 효과 및 작용기전을 알아보고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1 실험재료

H_2O_2 는 Junsei Chemical Co. (Tokyo, Japan)에서 구입하였으며, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 단백질 추출 및 western blot analysis에서 사용된 RIPA buffer는 Elpis Biotech. (Daejeon, Korea)에서, protease inhibitor cocktail은 Calbio Chem. (Novabiochem, La Jolla, CA)에서, 1차 항체와 2차 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)와 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2.2 무막줄기세포추출물 제조

본 시험에 사용된 무막줄기세포추출물은 ㈜티스텝으로부터 제공받았다. 무막줄기세포추출물은 줄기세포 성분 추출물로, 인체지방조직에서 줄기세포를 분리, 배양한 후 세포막을 제거하여 획득하였다. 원재료인 지방조직은

혈액검사를 통해 이상이 없는 20대 여성 중 BMI 25 ~ 29.9에 해당하는 사람을 대상으로 지방공여동의서를 받고 확보하였다. 시행한 혈액검사 항목은 B형간염바이러스, C형간염바이러스, 인체면역결핍바이러스, 인체T림프영양성바이러스, 파보바이러스B19, 사이토메가로바이러스, 엡스타인바바이러스, 매독크레포네마 등이다. 최종제인 무막줄기세포는 Good Laboratory Practice 인정기관에서 안전성 검사를 완료하여 독성이 없는 물질임을 확인하였다. 위의 과정을 거쳐 획득한 지방조직에서 지방줄기세포를 분리하여 정제한 후, 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 초기배양을 실시하였으며, 세포가 자란 정도를 확인한 후 계대배양을 6~10회 반복하였다. 배지를 제거하고 줄기세포를 일정한 수득하여 초음파 등의 물리적 방법을 사용하여 세포막을 벗기고, 필터 등의 방법을 이용하여 세포막 조각을 제거하여 무막줄기세포추출물을 획득하였다. 수용액 상태의 무막줄기세포추출물은 동결건조하여 파우더 제형으로 만든 후 5 ± 2°C에서 보관하였다.

2.3 세포 종류 및 시약

본 실험에 사용한 human periodontal ligament fibroblasts (이하 HPLF) 세포는 ScienCell사(Carlsbad, CA, USA)에서 분양받아 실험에 사용하였다. 배양을 위해 fetal bovine serum (FBS), fibroblast growth supplement, penicillin/streptomycin solution, fibroblast medium 배지, trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 용액은 ScienCell사 (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2.4 세포 배양

HPLF 세포는 2% FBS, 1% fibroblast growth supplement, 1% penicillin/streptomycin solution을 포함하는 fibroblast medium 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 세포는 1~3일에 한 번씩 배양액을 교체하면서 배양하여 80~90% confluence 상태에서 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 세포를 세척한 후 0.25% trypsin EDTA 혼합액으로 부착된 세포를 분리하여 1,000 rpm에서 5분간 원심분리 한 후 현탁하여 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

2.5 세포 생존율 측정

산화적 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인하기 위해 세포 생존율을 MTT assay에 의해 측정하였다[16]. HPLF 세포는 5×10⁴ cells/mL로 96 well plate에 seeding 후 24시간 동안 37°C에서 배양하였다. 세포가 잘 부착되면 무막줄기세포추출물(0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 µg/mL)을 각각의 농도로 처리하여 4시간 재배양한 후, H₂O₂ (100 µM)를 처리하여 24시간 배양한 뒤 5 mg/mL의 MTT solution을 각 well에 주입하였다. MTT solution을 처리한 후, 37°C에서 4시간 동안 재배양한 후 생성된 formazan 결정을 DMSO에 녹여 30분간 실온에서 방치 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Control군의 경우 무막줄기세포추출물을 처리하지 않고, H₂O₂ (100 µM)만을 처리하여 실험을 진행하였다.

2.6 Western blot analysis

염증 및 세포사멸 관련 단백질 발현 확인은 western blot analysis에 의해 측정하였다. 배양한 세포에 RIPA buffer를 첨가하여 4°C, 12,000 rpm에서 30분간 원심분리한 뒤, 상층액을 이용하여 단백질 정량을 실시하였다. 각각의 시료를 8~10% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide (SDS-PAGE) gel 에서 전기영동하여 membrane에 transfer하였다. 단백질이 부착된 membrane은 5% skim milk로 상온에서 50분간 blocking 한 다음, 1차 항체 [nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells (NF-κB, 1:1000); inducible nitric oxide synthase (iNOS, 1:1000); caspase-9 (1:1000); caspase-3 (1:1000); Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP, 1:1000); interleukine-6 (IL-6, 1:200); B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)-associated X protein (Bax, 1:100); Bcl-2 (1:200)]를 4°C에서 overnight 반응시킨 후, PBS-T로 세척하고 2차 항체 [Anti-rabbit and anti-mouse IgG HRP-linked antibody (1:1000)]와 상온에서 1시간 반응시켰다. 이후 enhanced chemiluminescence (ECL) solution과 반응시켜 Chemiluminescence image system (Davinch-Chemi™)을 이용하여 단백질 발현을 확인하였다.

2.7 통계분석

모든 실험 결과는 Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, Chicago, USA) 프로그램을 통해 analysis of variance (ANOVA) test를 하였으며,

시료간의 유의성 분석을 위해 Duncan's multiple range test를 이용하여 $P < 0.05$ 유의수준으로 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 무막줄기세포추출물의 H₂O₂로 인한 손상으로부터 세포 생존에 미치는 효과

HPLF 세포에 각 무막줄기세포추출물을 농도별로 처리하고(0.025 - 1 µg/mL) 24시간 배양한 뒤, MTT assay를 이용하여 무막줄기세포추출물의 세포 독성을 검토하였다. 그 결과, 무막줄기세포추출물 0.5 µg/mL까지 95% 이상의 세포 생존율을 보여 세포 독성이 없는 것으로 나타났다(Table 1).

Table 1. Cytotoxicity of membrane-free stem cell extract on HPLF cells

Treatment (µg/mL)	Cell viability (%)
0	100.00 ± 1.07
0.025	100.53 ± 2.99
0.05	93.02 ± 1.46
0.1	91.79 ± 1.59
0.25	90.85 ± 2.32
0.5	95.41 ± 1.54

Values are mean ± SD.

무막줄기세포추출물의 H₂O₂로 인한 산화적 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인하기 위해, HPLF 세포에 100 µM H₂O₂를 처리하여 산화적 손상을 유도한 뒤, 세포 독성이 없는 범위 내의 농도별 무막줄기세포추출물을 처리하여 세포 생존율을 측정하였다. HPLF 세포에 H₂O₂를 단독으로 처리한 control군의 경우 normal군 100% 대비 61.50%의 세포 생존율을 보여 H₂O₂의 처리로 인한 세포 손상을 확인하였다(Fig. 1). 반면 무막줄기세포추출물을 처리한 군의 경우, control군에 비해 세포 생존율이 증가하는 것을 확인하였으며, 이는 지방조직 유래 무막줄기세포추출물이 H₂O₂로 인한 세포 손상에 대해 보호 효과를 갖는 것으로 사료된다.

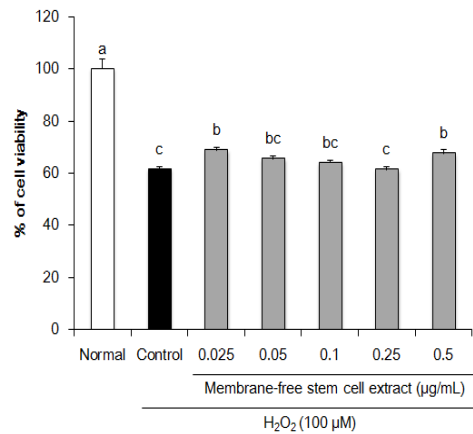


Fig. 1. Effect of membrane-free stem cell extract on H₂O₂-treated HPLF cells. Values are presented as mean ± SD. The different letters (a-c) indicate significant differences ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.2 무막줄기세포추출물의 염증 개선 효과

염증 반응은 감염이나 자극에 대한 체내 면역체계의 초기 반응 중 하나로, H₂O₂로 인한 산화적 손상은 NF-κB pathway를 활성화시켜 염증 반응을 일으킨다[17]. NF-κB는 p50와 p65의 두 가지 subunits으로 구성되어 heterodimer 구조를 형성하고 있으며, inhibition of nuclear transcription factor-κB (IκB)와 결합하여 비활성화 형태로 존재한다[18]. 산화적 손상 등의 외부 자극에 의해 활성화 될 경우 IκB가 분리되어 NF-κB의 subunits이 핵 내로 이동하면서, 염증 관련 매개체 및 cytokine 등의 유전자 전사를 유도한다[18,19]. 이렇게 과발현된 염증 매개체 및 cytokine 등은 유전자 변이 및 세포 손상을 유도한다[20].

H₂O₂를 처리한 HPLF 세포는 치주 염증에 대한 *in vitro* 모델로 널리 사용되고 있다[21,22]. 따라서 본 연구에서 HPLF 세포에서 무막줄기세포추출물의 H₂O₂에 대한 염증 보호 기전을 확인하기 위해, 염증 관련 인자인 NF-κB, iNOS 및 IL-6 단백질 발현을 측정하였다(Fig. 2). 아무것도 처리하지 않은 normal군에 비해 H₂O₂만을 처리한 control군에서 염증 관련 단백질의 발현이 유의적으로 증가하여 H₂O₂에 의해 염증 반응이 유도되었음을 알 수 있었다. 반면 무막줄기세포추출물을 처리하였을 때 control군에 비해 이들 단백질의 발현이 억제됨을 확인하였다. 특히 무막줄기세포추출물 0.5 µg/mL의 농도에서 가장 낮은 발현을 보이는 것을 확인하였다. 이는

무막줄기세포추출물이 H₂O₂에 의해 활성화된 NF- κ B pathway 조절을 통해 염증 매개체 및 염증성 cytokine을 조절하여 염증 반응 보호 효과를 나타낸 것을 사료된다. 국내·외 연구에 의하면, 지방조직 유래 줄기세포는 pro-inflammation factor 억제 및 NF- κ B pathway 활성화 조절과 nitric oxide 생성을 저해함으로써 항염증 효과가 있는 것으로 보고되었다[23]. 또한, 지방조직 유래 무막줄기세포추출물은 골프로 인한 관절, 인대, 힘줄 및 근육에 염증을 동반한 통증을 항염증 및 재생기능에 의해 개선시켰으며[14], 산화적 손상으로 인한 피부 세포의 염증반응 또한 개선시켰다[24]. 따라서 지방조직 유래 무막줄기세포추출물은 산화적 손상으로 인한 염증 반응에 대한 보호 효과가 있는 것으로 사료된다.

3.3 무막줄기세포추출물의 세포사멸 보호 기전

세포 내 과량의 H₂O₂로 인한 산화적 손상은 미토콘드

리아 막전위를 감소시켜 미토콘드리아 기능 장애에 의해 DNA 및 단백질의 분해와 세포 사멸을 매개하는 caspase를 활성화시킨다[25]. 산화적 손상 시 미토콘드리아는 cytochrome-c를 방출시키고, 이는 caspase-9, caspase-3, PARP의 활성화를 통해 세포 핵 응축을 유도시켜 세포사멸을 일으킨다[26,27]. 본 연구에서 H₂O₂로 산화적 손상을 유도한 HPLF 세포에서 지방유래 무막줄기세포추출물의 세포사멸 보호 작용 기전을 확인하기 위해, caspase-9, -3, PARP 단백질 발현을 측정하였다 (Fig. 3). 아무것도 처리하지 않은 정상군과 비교하여 H₂O₂를 처리한 control군은 유의적으로 cleaved caspase-9/caspase-9, cleaved caspase-3/caspase-3, cleaved PARP/PARP의 단백질 발현 비율이 증가하여 caspase 활성화를 통한 세포사멸이 유발됨을 확인하였다. 반면 무막줄기세포추출물을 처리한 군의 경우 control군에 비해 cleaved caspase-9, -3, PARP 단백

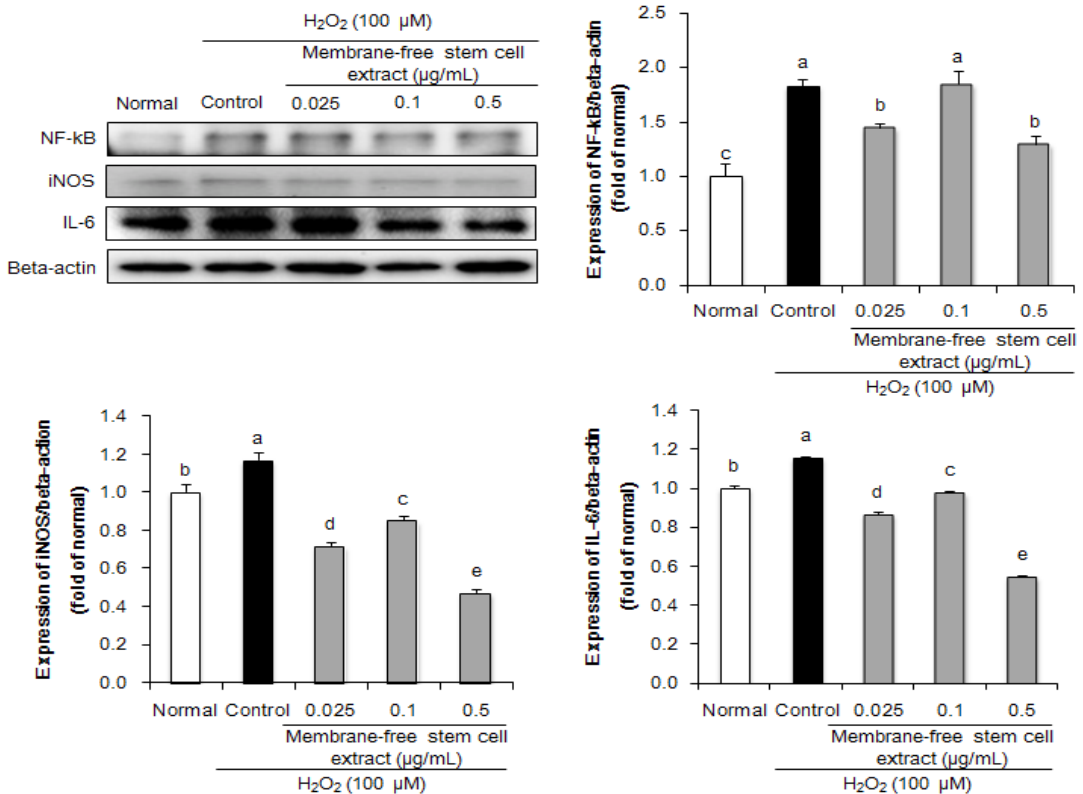


Fig. 2. Effect of membrane-free stem cell extract on inflammation-related protein expression in H₂O₂-treated HPLF cells. Values are presented as mean \pm SD. The different letters (a-e) indicate significant differences ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

질 발현이 감소함을 확인하였다. 또한, 이전 연구에 의하면, 지방조직 유래 줄기세포는 cisplatin으로 세포사멸이 유도된 허 편평세포에서 caspase-9, -3 활성화 조절을 통해 세포사멸 보호 효과를 나타내었다[28]. 따라서 지방조직 유래 무막줄기세포추출물은 caspase 활성화 감소를 통해 산화적 손상에 대한 세포사멸 보호 효과가 있는 것으로 생각된다.

Bcl family는 세포사멸에 관여하는 대표적인 작용 기전 중 하나로써, pro-apoptotic 인자인 Bax의 과발현은 cytochrome-c의 생성을 증가시켜 세포사멸을 유도하며, anti-apoptotic 인자인 Bcl-2는 cytochrome-c 생성을 감소시켜 세포사멸을 보호하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다[29]. Bax/Bcl-2 비율의 단백질 발현 측정을 통해 세포사멸 보호 효과를 측정할 결과, 정상군에 비해 control군에서 유의적인 단백질 발현 증가를 확인하였다. 반면 무막줄기세포추출물을 처리하였을 때 0.1,

0.5 µg/mL 농도에서 control군에 비해 유의적으로 세포사멸과 관련된 단백질 발현을 하향 조절함으로써 지방 유래 무막줄기세포추출물은 Bax와 Bcl-2 단백질 발현 비율 조절을 통해 세포사멸 보호 효과가 있는 것으로 사료된다. Chiu 등[28]은 지방조직 유래 줄기세포는 세포사멸이 유도된 허 편평세포의 pro-apoptotic 인자인 Bad 단백질 억제제를 통해 세포사멸 억제 효능을 보고하였으며, 이 외에도 다양한 조직에서의 세포사멸 보호를 통한 조직 재생성 효능이 보고되었다[30]. 또한, 지방조직 유래 줄기세포 추출물은 amyloid beta로 유도된 신경세포 사멸에 대해 p53/Foxo pathway 조절을 통한 세포 보호 효과가 확인되었다[31]. 따라서 지방조직 유래 줄기세포 추출물은 caspase 활성화, Bcl family 조절 등 다양한 pathway 조절을 통해 세포 사멸 보호 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

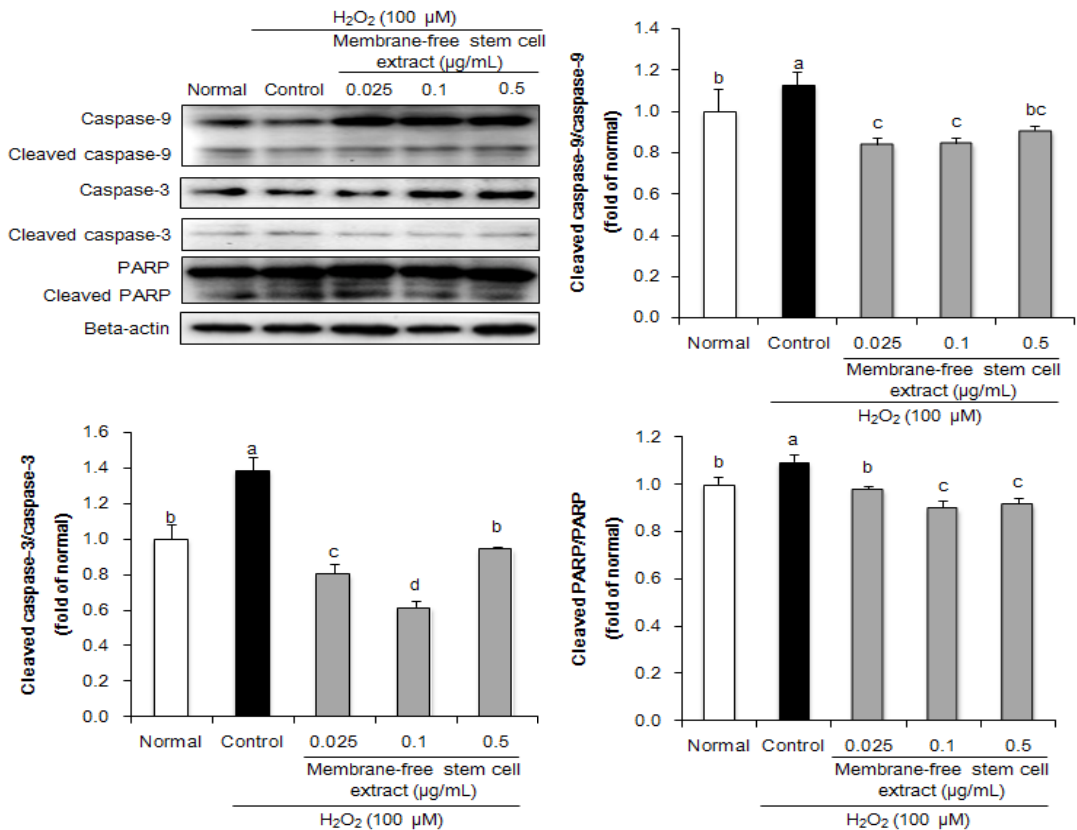


Fig. 3. Effect of membrane-free stem cell extract on apoptosis-related protein expression such as caspase-9, -3, and PARP in H₂O₂-treated HPLF cells. Values are presented as mean ± SD. The different letters (a-d) indicate significant differences (*P* < 0.05) by Duncan's multiple range test.

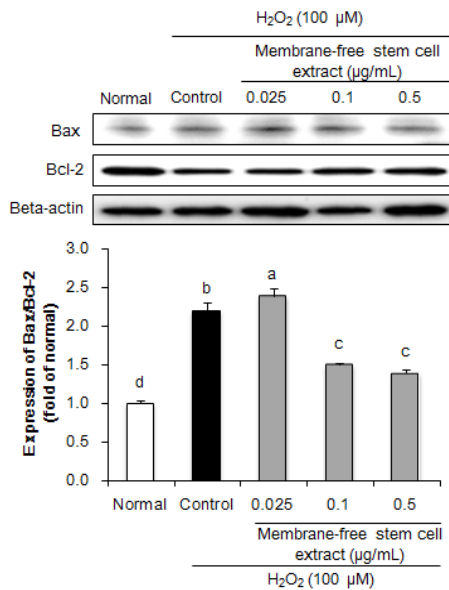


Fig. 4. Effect of membrane-free stem cell extract on apoptosis-related protein expression such as Bax and Bcl-2 in H₂O₂-treated HPLF cells. Values are presented as mean ± SD. The different letters (a-d) indicate significant differences ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

4. 결론 및 요약

본 연구에서는 사람의 지방조직 유래 무막줄기세포추출물의 HPLF 세포에서 H₂O₂로 인한 산화적 스트레스 보호 효과를 확인하였다. H₂O₂로 산화적 손상을 유도한 HPLF 세포에 무막줄기세포추출물 처리 시, 세포 생존율이 증가함을 통해, 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 효과가 있음을 확인하였다. 또한, 무막줄기세포추출물은 H₂O₂를 처리한 HPLF 세포에서 NF- κ B, iNOS 및 IL-6 단백질 발현의 감소를 통해 NF- κ B pathway 조절을 통한 염증 반응 개선 효과를 나타내었다. 뿐만 아니라, caspase-9, -3, PARP 활성화 감소 및 Bax/Bcl-2 비율 조절을 통해 무막줄기세포추출물의 세포사멸 보호 작용기전을 확인하였다. 따라서 지방조직 유래 무막줄기세포추출물은 염증 반응과 세포사멸의 조절을 통해 HPLF 세포에서 산화적 손상에 대한 보호 효과가 있는 것으로 사료되며, 치주염 등의 치주질환에서의 치료제로써 이용 가능성이 있을 것으로 기대된다.

References

- [1] B. L. Pihlstrom, B. S. Michalowicz, N. W. Johnson, "Periodontal diseases", *The Lancet*, Vol.366, No.9499, pp.1809-1820, 2005.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67728-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67728-8)
- [2] Y. H. Kim, B. S. Park, "Antioxidant effect of eugenol in human periodontal ligament fibroblasts", *Korean Journal of Physical Anthropology*, Vol.28, No.1, pp.45-53, 2015.
DOI: <https://doi.org/10.11637/kjpa.2015.28.1.45>
- [3] J. E. Seo, E. S. Hwang, G. H. Kim, "Antioxidative and differentiation effects of *Artemisia capillaris* T. extract on hydrogen peroxide-induced oxidative damage of MC3T3-E1 osteoblast cells", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol.40, No.11, pp.1532-1536, 2011.
DOI: <https://doi.org/10.3746/ikfn.2001.40.11.1532>
- [4] Y. Choe, J. Y. Yu, Y. O. Son, S. M. Park, J. G. Kim, X. Shi, J. C. Lee, "Continuously generated H₂O₂ stimulates the proliferation and osteoblastic differentiation of human periodontal ligament fibroblasts", *Journal of Cellular Biochemistry*, Vol.113, No.4, pp.1426-1423, 2012.
DOI: <https://doi.org/10.1002/icb.24017>
- [5] C. F. Canakci, Y. Cicek, V. Canakci, "Reactive oxygen species and human inflammatory periodontal diseases", *Biochemistry (Moscow)*, Vol.70, No.6, pp.619-628, 2005.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0161-9>
- [6] N. S. Hwang, C. Zhang, Y. S. Hwang, S. Varghese, "Mesenchymal stem cell differentiation and roles in regenerative medicine", *Systems Biology and Medicine*, Vol.1, No.1, pp.97-106, 2009.
DOI: <https://doi.org/10.1002/wsbm.26>
- [7] A. Goldberg, K. Mitchell, J. Soans, L. Kim, R. Zaidi. "The use of mesenchymal stem cells for cartilage repair and regeneration: a systematic review", *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, Vol.12, No.1, pp.39, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s13018-017-0534-y>
- [8] J. W. Rhie, K. J. Kim, "Adipose stem cell therapy: present, future", *Journal of Korean Wound Management Society*, Vol.12, No.2, pp.39-45, 2016.
- [9] S. Kern, H. Eichler, J. Stoeve, H. Klüter, K. Bieback, "Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue", *Stem Cells*, Vol.24, No.5, pp.1294-1301, 2006.
DOI: <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0342>
- [10] H. A. Makhluif, S. M. Mueller, S. Mizuno, J. Glowacki, "Age-related decline in osteoprotegerin expression by human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.268, No.3, pp.669-672, 2000.
DOI: <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2182>

- [11] Y. Zhu, T. Liu, K. Song, X. Fan, X. Ma, Z. Cui, "Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC", *Cell Biochemistry and Function*, Vol.26, No.6, pp.664-675, 2008.
DOI: <https://doi.org/10.1002/cbf.1488>
- [12] M. Tobita, H. Mizuno, "Adipose-derived stem cells for periodontal tissue regeneration.", *Methods in Molecular Biology*, Vol.702, pp.461-470, 2011.
DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-61737-960-4_34
- [13] F. J. Vizoso, N. Eiro, S. Cid, J. Schneider, R. Perez-Fernandez, "Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine." *International Journal of Molecular Sciences*, Vol.18, No.9, pp.E1852, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18091852>
- [14] Y. S. Kim, J. T. Lim, "Golf injury therapy using stem cell", *Journal of Golf Studies*, Vol.11, No.3, pp.55-65, 2017.
- [15] E. Mohammed, E. Khalil, D. Sabry, "Effect of adipose-derived stem cells and their exo as adjunctive therapy to nonsurgical periodontal treatment: a histologic and histomorphometric study in rats." *Biomolecules*, Vol.8, No.4, pp.E167, 2018.
DOI: <https://doi.org/10.3390/biom8040167>
- [16] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.", *Journal of Immunological Methods*, Vol.65, pp.55-63, 1983.
- [17] C. Wittmann, P. Chockley, S. K. Singh, L. Pase, G. J. Lieschke, C. Grabher, "Hydrogen peroxide in inflammation: messenger, guide, and assassin", *Advances in Hematology*, Vol.2012, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/541471>
- [18] Y. Yamamoto, R. B. Gaynor, "Role of the NF- κ B pathway in the pathogenesis of human disease states", *Current Molecular Medicine*, Vol.1, No.3, pp.287-296, 2001.
DOI: <https://doi.org/10.2174/1566524013363816>
- [19] C. S. Kim, T. Kawada, B. S. Kim, I. S. Han, S. Y. Choe, T. Kurata, R. Yu, "Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibiting I κ B- α degradation in LPS-stimulated peritoneal macrophages", *Cellular Signalling*, Vol.15, No.3, pp.299-306, 2003.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(02\)00086-4](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(02)00086-4)
- [20] S. M. Park, R. J. Zhao, J. R. Lee, C. W. Lee, H. J. Kim, Y. K. Kwon, S. C. Kim, "Inhibitory effect of oyster conchiolin on pro-inflammatory mediator in lipopolysaccharide-activated Raw 264.7 cells", *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine*, Vol.22, No.4, pp.878-883, 2008.
- [21] S. I. Lee, J. K. Yi, W. J. Bae, S. Lee, H. J. Cha, E. C. Kim, "Thymosin β -4 suppresses osteoclastic differentiation and inflammatory responses in human periodontal ligament cells", *Plos One*, Vol.11, No.1, pp.e0146708, 2016.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146708>
- [22] L. Gözl, S. Memmert, B. Rath-Deschner, A. Jäger, T. Appel, G. Baumgarten, W. Götz, S. Frede, "LPS from *P. gingivalis* and hypoxia increases oxidative stress in periodontal ligament fibroblasts and contributes to periodontitis", *Mediators of Inflammation*, Vol.2014, No.2014, pp.986264, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/986264>
- [23] M. I. Guillen, J. Platas, P. del. Caz, M. Dolores, V. Mirabet, M. J. Alcaraz, "Paracrine anti-inflammatory effects of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in human monocytes", *Frontiers in Physiology*, Vol.9, pp.661, 2018.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00661>
- [24] Y. B. Chae, J. S. Lee, H. J. Park, I. H. Park, M. M. Kim, Y. H. Park, D. S. Kim, J. H. Lee, "Advanced adipose-derived stem cell protein extracts with antioxidant activity modulates matrix metalloproteinases in human dermal fibroblasts", *Environmental Toxicology and Pharmacology*, Vol.34, No.2, pp.263-271, 2012.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.04.010>
- [25] S. Elmore, "Apoptosis: a review of programmed cell death", *Toxicologic Pathology*, Vol.35, No.4, pp.495-516, 2007.
DOI: <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- [26] K. Kannan, S. K. Jain, "Oxidative stress and apoptosis", *Pathophysiology*, Vol.7, No.3, pp.153-613, 2000.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0928-4680\(00\)00053-5](https://doi.org/10.1016/S0928-4680(00)00053-5)
- [27] C. Soldani, A. I. Scovassi, "Poly (ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update", *Apoptosis*, Vol.7, No.4, pp.321-328, 2002.
DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1016119328968>
- [28] Y. J. Chiu, J. S. Yang, H. S. Hsu, C. H. Tsai, H. Ma, "Adipose-derived stem cell conditioned medium attenuates cisplatin-triggered apoptosis in tongue squamous cell carcinoma", *Oncology Reports*, Vol.1, No.39, pp.651-658, 2018.
- [29] K. J. Botting, K. C. Wang, M. Padhee, I. C. McMillen, B. Summers-Pearce, L. Rattanaraj, N. Cutri, G. S. Posterino, D. A. Brooks, J. L. Morrison, "Early origins of heart disease: low birth weight and determinants of cardiomyocyte endowment," *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, Vol.39, No.9, pp.814-823, 2012.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05649.x>
- [30] T. Liu, M. Lee, J. J. Ban, W. Im, I. M. Jung, M. Kim, "Cytosolic extract of human adipose stem cells reverses the amyloid β -induced mitochondrial apoptosis via P53/Foxo3a pathway", *Plos One*, Vol.3, No.12, e0168859, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168859>
- [31] A. Bergmann, H. Steller, "Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration", *Science Signaling*, Vol.3, No.145, pp.8, 2010.
DOI: <https://doi.org/10.1126/scisignal.3145re8>

허 메 이 통(Mei Tong He)

[정회원]



- 2016년 8월 : 부산대학교 식품영양학과 (학사)
- 2018년 2월 : 부산대학교 식품영양학과 (석사)
- 2018년 3월 ~ 현재 : 부산대학교 식품영양학과 (박사과정)

<관심분야>
식품영양, 기능성식품

김 지 현(Ji Hyun Kim)

[정회원]



- 2014년 2월 : 동의대학교 식품영양학과 (학사)
- 2016년 2월 : 부산대학교 식품영양학과 (석사)
- 2016년 3월 ~ 현재 : 부산대학교 식품영양학과 (박사과정)

<관심분야>
식품영양, 기능성식품

김 영 실(Young Sil Kim)

[정회원]



- 1985년 2월 : 부산대학교 의과대학 (학사)
- 2002년 2월 : 부산대학교 의과대학 (석사)
- 2006년 2월 : 부산대학교 의과대학 (박사)
- 2000년 2월 ~ 현재 : 티아라의원성형외과 대표원장
- 2011년 9월 ~ 현재 : ㈜티아라줄기세포연구소 대표이사
- 2014년 : (사)한국줄기세포산업협회 회장
- 2016년 4월 ~ 현재 : ㈜티스팀 대표이사

<관심분야>
생명공학, 줄기세포, 의생명

박 혜 숙(Hye Sook Park)

[정회원]



- 1986년 2월 : 부산대학교 식품영양학과 (학사)
- 1989년 2월 : 부산대학교 일반대학원 (이학석사)
- 2001년 3월 : 부산대학교 일반대학원 (이학박사 수료)
- 2018년 3월 ~ 현재 : ㈜티아라줄기세포연구소 대표이사
- 2016년 4월 ~ 현재 : ㈜티스팀 전무/ R&D 대표

<관심분야>
생명공학, 줄기세포, 의생명

조 은 주(Eun Ju Cho)

[정회원]



- 1996년 2월 : 부산대학교 식품영양학과 (석사)
- 1999년 2월 : 부산대학교 식품영양학과 (박사)
- 2002년 3월 : 일본 토야마의과약과대학교 조교수
- 2003년 10월 ~ 현재 : 부산대학교 식품영양학과 (교수)

<관심분야>
식품영양, 기능성식품