

## Melatonin Rescues Human Dental Pulp Cells from Premature Senescence Induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Sera Park<sup>1</sup>, Kwang Je Bak<sup>1</sup>, Chang Youp Ok<sup>1,3</sup>, Hyun-Joo Park<sup>2</sup>, Hye-Ock Jang<sup>1</sup>, Moon-Kyoung Bae<sup>2</sup> and Soo-Kyung Bae<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Dental Pharmacology

<sup>2</sup>Department of Oral Physiology

<sup>3</sup>BK21 PLUS Project, School of Dentistry, Pusan National University, Yangsan 626-870, South Korea

(received August 09, 2017; revised September 07, 2017; accepted September 08, 2017)

Although anti-aging activities of melatonin, a hormone secreted by the pineal gland, have been reported in senescence-accelerated mouse models and several types of cells, its impact and mechanism on the senescence of human dental pulp cells (HDPCs) remains unknown. In this study, we examined the impact of melatonin on cellular premature senescence of HDPCs. Here, we found that melatonin markedly inhibited senescent characteristics of HDPCs after exposure to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), including the increase in senescence-associated β-galactosidase (SA-β-gal)-positive HDPCs and the upregulation of p21 protein, an indicator for senescence. In addition, as melatonin attenuated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stimulated phosphorylation of c-Jun N-terminal kinase (JNK), while selective inhibition of JNK activity with SP600125 significantly attenuated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced increase in SA-beta-gal activity. Results reveal that melatonin antagonizes premature senescence of HDPCs via JNK pathway. Thus, melatonin may have therapeutic potential to prevent

stress-induced premature senescence, possibly correlated with development of dental pulp diseases, and to maintain oral health across the life span.

**Key words:** Melatonin, premature senescence, human dental pulp cells, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 서론

치수는 치아 속에 있는 신경, 혈관, 림프관, 결합조직 및 여러 종류의 세포들 (fibroblast, mesenchyma cells, odontoblast, immune cells)과 세포외기질 등이 복합적으로 어우러져 있는 성긴 결합조직이다[1]. 치수의 기능으로는 치아의 형성 및 유지, 손상된 치아의 수복, 치아에 가해지는 여러 자극에 대한 적절한 감각 인지, 치아의 성장과 유지를 위한 영양 공급 담당, 각종 항균성 물질 및 면역세포들의 운반을 담당하여 외부 침입균에 대한 방어 기능 뿐만 아니라 경조직 손상 시 상처 치유와 항염증 기능 등이 있으며 건강한 치아를 위한 다양한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다[2].

치아의 건강상태는 치수나 치주조직의 염증에 의해 악화되기도 하며 치아의 노화로 인해 자연스럽게 퇴화되기도 한다[3-6]. 치아의 노화는 치수의 노화와 상당한 관련성[3]이 있으므로 건강한 치아를 유지하고 관리하기 위해서 치수의 노화 기전을 규명하고 노화 과정을 조절할 수 있는 항노화 물질에 대한 연구의 필요성이 높아

\*Correspondence to: Soo-Kyung Bae, Department of Dental Pharmacology, School of Dentistry, Pusan National University, Yangsan 626-770, South Korea  
Tel: 82-51-510-8253, Fax: 82-51-510-8232  
E-mail: [skbae@pusan.ac.kr](mailto:skbae@pusan.ac.kr)  
ORCID : 0000-0002-1106-9260

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

지고 있다. 치수세포의 노화는 나이가 들어감에 따라 자연적으로 발생할 수 있으며 치수염과 같은 질환에 의해 촉발될 수도 있다[3-6]. 두 경우 모두에서 공통적인 사항은 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS) 발생 및 축적에 의한 산화스트레스 유발이 노화의 주요 원인으로 작용할 수 있다는 점이다[4-7].

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hydrogen peroxide)는 세포 내 ROS를 증가시켜 산화스트레스를 유발하고 DNA 손상을 일으킨다. 이러한 DNA 손상이 제대로 복구되지 않으면 세포는 조기 노화를 일으킨다[7-10]. 연구에 따르면 세포 내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 장기간 축적이나 준치사용량의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 여러 종류의 세포에서 조기 노화가 발생한다고 보고되었다[11-16]. 이러한 특징으로 인해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 세포 노화의 기전 및 항노화 물질의 발굴 연구에 노화유발 물질로써 널리 이용되고 있다.

멜라토닌 (N-acetyl-5-methoxytryptamine, melatonin)은 송과선으로부터 주로 분비되는 호르몬으로 수면과 각성을 조절하며 항염증 및 항산화 작용을 한다[17]. 본 연구진은 이전 연구에서 멜라토닌에 의해 iNOS-NO 생성이 감소되고 이로 인해 대식세포에 의한 염증반응이 억제됨을 보고한 바 있다[18]. 멜라토닌은 과도한 자유 라디칼을 제거하고 세포 내 항산화 효소의 합성을 증가시킴으로써 항산화 작용을 한다[17,19]. 최근 연구결과에 따르면 멜라토닌은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 같은 산화 스트레스가 가해진 여러 세포 (예를 들면, 치주섬유모세포, 중간엽줄기세포, 신경세포, 그리고 심장전구세포 등)에서 유도되는 조기 노화를 억제하며 노화모델 생쥐를 대상으로 한 연구에서도 항노화 작용을 나타낸다는 사실이 확인되었다[11-16, 20-23]. 이러한 결과들은 노화 연구에 있어서 멜라토닌이 유용한 항노화 물질로 사용될 수 있음을 보여준다.

본 연구에서는 사람의 치수세포 (human dental pulp cells, HDPCs)를 연구대상으로 하여 HDPCs의 노화를 억제할 수 있는 항노화 물질로서 멜라토닌의 기능에 대해 알아보고자 한다.

## 실험재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에서 사용된 멜라토닌은 Sigma (St. Louis, USA)에서 구입하였고 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 JUNSEI (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. p21, p53, 그리고 p65에 대한 항체 각각은 Santa Cruz (Dallas, USA)에서 구입하였고 p-IκB, IκB, p-JNK와 p-ERK의 항체는 모두 Cell Signaling (Danvers, USA)에서 구입하여 사용하였다. α-tubulin은 BioGenex (Fremont, USA)에서 구입하였으며 JNK의 선택적 억제제

인 SP600125는 Enzo Life Sciences (Farmingdale, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 세포배양

HDPCs는 일본 히로시마 대학의 Takashi Takata 박사 연구실에서 분양 받았다. HDPCs는 10% FBS (Fetal Bovine Serum)와 penicillin G (10 units/ml) 그리고 streptomycin (10 mg/ml)이 혼합된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였으며, 3-5 일마다 계대 배양하면서 유지하였다.

### MTT assay

세포배양용 48-well plate에 HDPC를 1x10<sup>4</sup> cells/ml로 분주하고 16시간 동안 배양시킨 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 또는 멜라토닌을 조건에 맞게 농도별로 처리하였다. 24시간 배양한 뒤, 0.5 mg/ml의 농도로 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)를 처리하고 4시간 동안 CO<sub>2</sub> 배양기에서 반응시켰다. MTT 시약이 들어있는 상층액 배지를 제거하고 각 well에 DMSO를 200 μl씩 넣어 반응과정에서 생성된 세포 내 formazan을 녹인 후, 96well plate에 100 μl씩 옮겨 ELISA reader (TECAN, Männedorf, Switzerland)로 흡광도를 측정하였다.

### Western blot analysis

배양 중인 HDPCs에 lysis buffer (40 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA, 120 mM NaCl, and 0.1% NP-40 with a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 처리한 뒤 단백질을 분리하였고, 단백질 추출액 (30 μg/lane)은 SDS/PAGE에서 전기영동 한 후 nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Little Char Font, UK)에 transfer하였다. 그리고 5% skim milk를 사용하여 blocking을 진행하였고 0.1% tween-20이 들어있는 PBS 용액에 1차 항체와 HRP 결합을 가진 2차 항체를 순차적으로 처리하여 적당한 시간동안 반응시켰다. ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Little Char Font, UK) 시스템을 이용하여 발색시키고 암실에서 X-ray 필름에 감광시켜 특정 단백질 양을 분석하였다.

### Senescence-associated beta-galactosidase (SA-β-gal) staining assay

노화된 세포를 확인하기 위해 SA-β-gal staining을 실시하였다. HDPCs를 배양한 뒤 PBS로 2회 세척하고 fixation buffer (2% formaldehyde/0.2% glutaraldehyde)로 세포를 고정시켰다. 고정이 끝나면 PBS로 3번 세척한 뒤 β-gal staining solution (1 mg/mL X-Gal, 40 mM citric acid-sodium phosphate buffer, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM potassium

ferrocyanide, and 5 mM potassium ferricyanide; pH 6.0; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)을 첨가하여 37°C에서 12시간 동안 반응시켰다. β-gal 활성이 나타나는 노화된 세포(blue, positive)와 활성이 나타나지 않는 세포(negative)는 현미경을 통해 확인하고 사진 촬영 후 세포를 계수하였다.

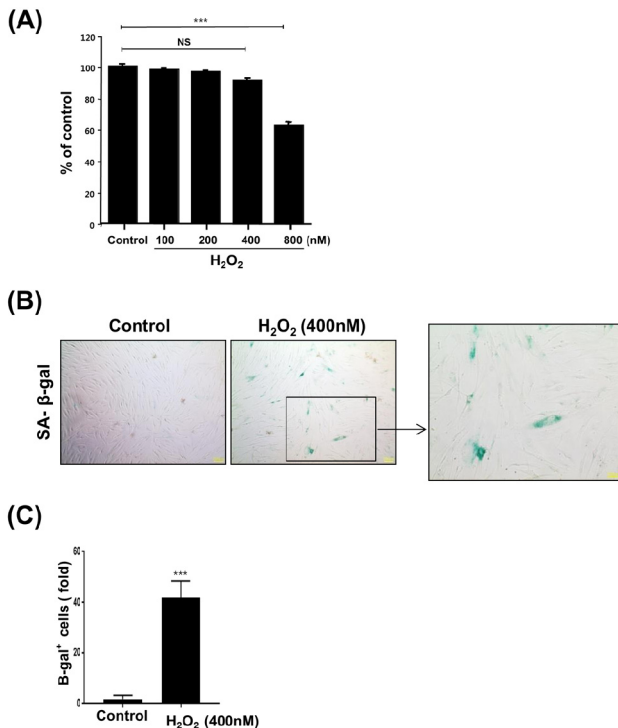
### 통계처리

본 실험에 대한 실험결과는 세 번의 독립적인 실험에서 얻어진 평균치 및 표준편차를 나타내었고 그룹간의 통계적 차이는 Student's t-test를 이용하여 분석하였다.

## 결 과

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 HDPCs의 조기 노화에 미치는 영향

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 세포의 조기노화를 일으키는 노화유발 물질로 알려져 있다 [11,12,24]. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 치수 세포의 조기 노화에 어떠한 영향을 미치는지를 관찰하기 위하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 농도별로 24시간 처리한 뒤 HDPCs 생존정도를 MTT assay로 확인하



**Figure 1. Increase of SA-β-galactosidase activity by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** (A) Human dental pulp cells (HDPCs) were treated with different concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0-800 nM) for 24 hrs and cell viability was measured by the MTT assay. (B) A representative image of senescence-associated beta-galactosidase (SA-β-gal) activity staining. (C) Quantitative results for the percentage of SA-β-gal-positive stained cells. Scale bar: 200 μm. n=3, \*\*\*P<0.001 vs. control. ns=not significant.

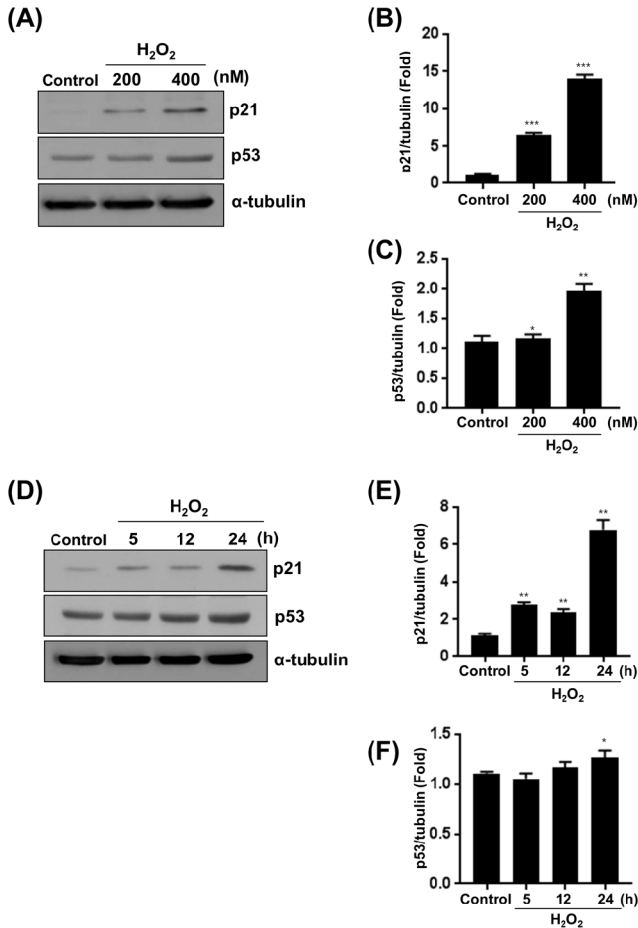
였다. 그 결과, 그림 1A에서 보는 바와 같이 HDPCs의 생존에는 영향을 미치지 않는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도가 400 nM임을 확인하였고 이후의 실험에 400 nM 농도를 사용하였다. HDPCs에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하였을 때 조기 노화가 일어나는지를 알아보기 위하여 SA-β-galactosidase 염색을 실시하였다. 그 결과 400 nM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 24시간 처리하였을 때, 노화 마커인 SA-β-galactosidase의 세포 내 염색 정도와 SA-β-galactosidase (+) 세포 수가 대조군에 비해 크게 증가함을 확인하였다 (그림 1B와 1C).

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-유도성 HDPCs 조기 노화에서 노화관련 단백질 p21과 p53의 발현 패턴

세포의 노화가 진행될 때 노화관련 단백질의 발현 변화가 동반되며 특히 p21과 p53은 대표적인 노화 마커로 알려져 있다[4,11,25]. 본 연구에서는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 HDPCs의 노화과정 동안 p21과 p53 단백질의 발현변화를 조사하기 위하여 Western blot analysis를 실시하였다. HDPCs에 200 nM과 400 nM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 경우, p21 단백질의 발현은 대조군에 비해 각각 7배, 17배 정도 증가하는 농도-의존적 발현증가 패턴을 나타내었다 (그림 2A와 2B). p53 단백질의 경우, 400 nM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 HDPCs에서 그 발현이 대조군에 비해 2배 정도 증가하였다 (그림 2A와 2C). 또한 HDPCs에 400 nM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 시간 별로 처리한 후 단백질들의 발현 변화를 확인한 결과, 24시간 처리된 세포에서 p21과 p53 단백질의 발현이 증가됨을 확인할 수 있었다 (그림 2D, 2E와 2F).

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-유도성 HDPCs 조기 노화에 대한 멜라토닌의 작용

멜라토닌은 세포 노화에 대해 억제작용을 하는 것으로 알려져 있다[21-23]. 본 실험에서는 멜라토닌이 HDPCs에서도 항노화 작용을 나타내는지 조사하였다. 먼저 MTT assay를 실시하여 HDPCs 생존율에 대한 여러 농도에서의 멜라토닌 효과를 조사하였다. 그림 3A에서 보는 바와 같이, 1 mM 멜라토닌 농도까지는 HDPCs의 생존율에 큰 영향을 미치지 않았으나 5 mM과 10 mM에서는 세포의 생존율이 50% 이하로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 이후의 실험에서는 HDPCs의 생존율에 영향을 미치지 않는 멜라토닌 농도인 1 mM을 사용하였다. 멜라토닌의 항노화 효과를 조사하기 위하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 전에 멜라토닌을 처리하였고 이후 SA-β-galactosidase 염색을 실시하였다. 그 결과, 멜라토닌은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 HDPCs의 조기 노화를 억제하는 작용을 나타내었다 (그림 3B와 3C). 또한 멜라토닌 전처리로 인해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 p21 단백질 발현의 증가가 저해되는 것을 확인할 수 있었다 (그림 3D와

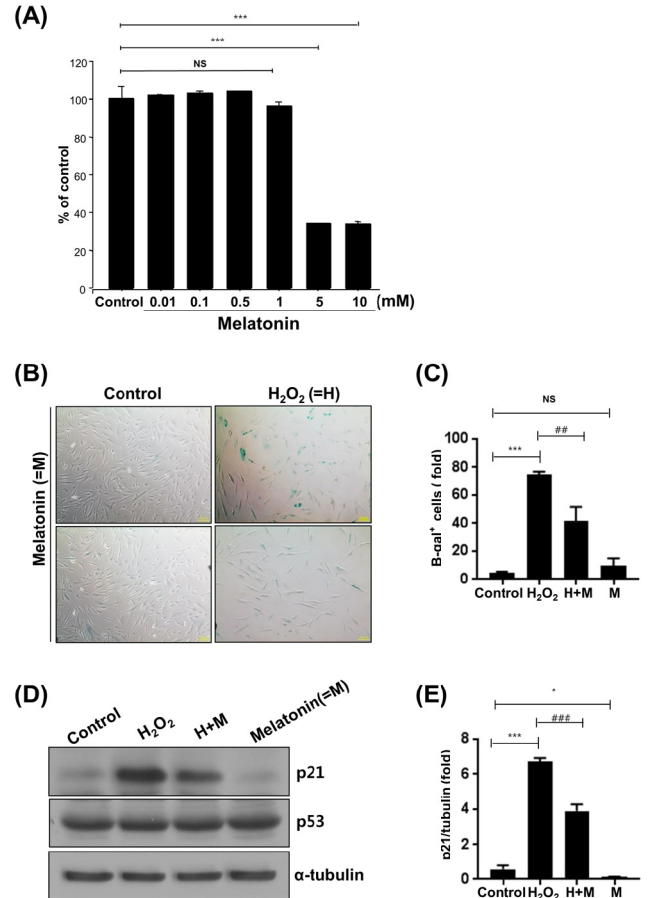


**Figure 2. Altered expression of p21 and p53 by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** (A-C) HDPCs were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 and 400 nM) for 24 hrs. Cell lysates were subjected to Western immunoblot analysis for detecting p21 and p53 proteins. α-tubulin served as the loading controls; representative Western blot (A), cumulative densitometric data (B and C). (D-F) HDPCs were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (400 nM) for the indicated time. Cell lysates were subjected to Western immunoblot analysis for detecting p21 and p53 proteins. α-tubulin served as the loading controls; representative Western blot (D), cumulative densitometric data (E and F). n=3, \*P<0.05, \*\*P<0.01, and \*\*\*P<0.001 vs. control.

3E). 하지만 p53의 경우는 멜라토닌 처리에 의한 변동이 나타나질 않았다 (그림 3D).

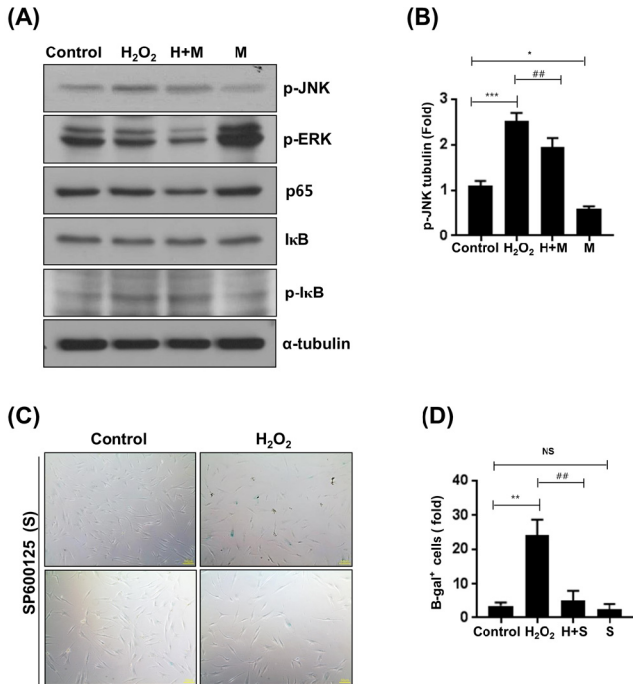
**멜라토닌의 항노화 작용에서 JNK의 관련성**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포의 노화 유도과정에 관여하는 대표적인 신호전달계로는 NF-κB, ERK, 그리고 JNK 가 있다[26]. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-유도성 HDPCs의 조기 노화에 대한 멜라토닌의 항노화 작용 기전을 규명하기 위하여 세포 내 신호전달계 단백질의 활성을 조사하였다. 그림 4A에서 보는 바와 같이, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 시 활성화 상태인 인산화 형태의 c-Jun N-terminal kinase (p-JNK) 발현양이 대조군에 비해 증가하



**Figure 3. Retardation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced premature senescence by melatonin.** (A) HDPCs were treated with different concentration of melatonin (0-800 nM) for 24 hrs and cell viability was measured by the MTT assay. n=3, \*\*\*P<0.001 vs. control. (B-E) HDPCs were pretreated with melatonin (1 mM) for 2 hrs and then incubated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (400 nM). Twenty-four hours after treatment, the cells were either fixed for SA-β-galactosidase staining or lysed for Western blot analysis. A representative image of SA-β-galactosidase activity staining (B). Quantitative results for the percentage of SA-β-gal-positive stained cells (C). Cell lysates were subjected to Western immunoblot analysis for detecting p21 and p53 proteins. α-tubulin served as the loading controls; representative Western blot (D), cumulative densitometric data (E). Scale bar: 200 μm. n=3, \*P<0.05, and \*\*\*P<0.001 vs. control; ##P<0.01, and ###P<0.001 vs. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone. ns=not significant.

였고 이러한 증가는 멜라토닌의 전처리에 의해 억제되는 것을 확인하였다. 또한 멜라토닌 단독 처리의 경우에도, 대조군에 비해 p-JNK의 양이 감소되었다 (그림 4A와 4B). NF-κB 신호전달 단백질들의 경우엔 실험군들 사이에 유의성 있는 차이가 없었고 ERK는 대조군에 비해 멜라토닌 단독처리한 세포에서 그 활성이 크게 증가하였으나 멜라토닌 전처리 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>을 처리한 HDPCs에서는 오히려 ERK 활성이 감소하는 것으로 나타났다 (그림 4A). 이러



**Figure 4. Effect of melatonin on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced JNK activation.** HDPCs were pretreated with melatonin (1 mM) for 2 hrs and then incubated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (400 nM) for 24 hrs. (A and B) The expression of signaling proteins was examined by western blotting using specific antibodies. α-tubulin served as the loading controls; representative Western blot (A), cumulative densitometric data for p-JNK (B). (C and D) HDPCs were pretreated with SP600125 (50 μM) for 2 hrs and then incubated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (400 nM) for 24 hrs. A representative image of SA-β-galactosidase activity staining (C). Quantitative results for the percentage of SA-β-gal-positive stained cells (D). Scale bar: 200 μm. n=3, \*P<0.05, \*\*P<0.01, and \*\*\*P<0.001 vs. control; ##P<0.01 vs. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone. ns=not significant.

한 결과들로 미루어 보아 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 HDPCs의 조기 노화과정 동안 JNK의 활성이 증가되며 멜라토닌은 JNK 활성 증가를 방해함으로써 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-유도성 조기 노화를 억제할 수 있는 것으로 추정된다. 이러한 가설을 검증하기 위하여, JNK의 선택적 저해제인 SP600125가 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-유도성 HDPCs 조기 노화에 어떠한 영향을 미치는지를 SA-β-galactosidase 염색을 통해 조사하였다. 그 결과, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 시 유도되었던 HDPCs의 조기 노화는 SP600125의 전 처리에 의해 억제됨을 확인하였다 (그림 4C와 4D).

## 고찰

본 연구를 통해 멜라토닌은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 HDPCs의 조기노화를 감소시킬 수 있음을 최초로 밝혔다. 항산화 기능을 가진 멜라토닌의 노화방지 효과 및 기전에 관한

연구결과는 여러 종류의 세포나 동물을 대상으로 한 실험에서 보고된 바 있다. 예를 들면, 멜라토닌에 의해 중간엽 줄기세포, 신경세포, 심장전구세포, 상피세포의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-유도성 노화가 억제되었으며 이는 멜라토닌 처리된 세포 내에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 ROS 생성의 감소, p21 또는/그리고 p53 등 세포주기 억제 단백질의 증가, NF-κB, ERK, 또는/그리고 JNK 신호전달계의 조절 때문인 것으로 알려졌다 [4,13-15,21,25,26]. 본 연구결과를 상기의 연구결과들과 비교해 보면, HDPCs에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리할 경우 p53 발현은 증가하였으나 p21보다 그 정도가 낮았고 멜라토닌에 의한 감소 효과도 p21의 급격한 감소에 비해 p53의 변화는 미비하였으며 멜라토닌에 의한 조절이 뚜렷하게 나타나는 신호전달계는 JNK라는 사실을 확인할 수 있었다. 이러한 사실로 미루어 볼 때 HDPCs에서 멜라토닌은 p21 단백질과 JNK 신호전달을 억제함으로써 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 조기 노화로부터 HDPCs를 성공적으로 보호하는 효과가 있는 것으로 생각된다.

치수는 치아의 내부에 있는 치수강과 치근관이라는 제한적이고 한정된 공간을 채우고 있는 결합조직으로 혈관과 신경이 풍부하게 분포하고 있어 조그마한 공간에 존재하지만 거의 완벽한 조직구성을 하고 있는 특징으로 인해 치아분화 연구뿐만 아니라 혈관연구, 신경연구, 결합조직 연구 및 조직재생연구 분야 등에서도 좋은 연구대상이 될 수 있다[2]. 최근에는 치수 (유치 치수, 사랑니 치수, 영구 치 치수)로부터 치아줄기세포 (dental pulp stem cells)를 분리할 수 있게 되어 향후 치과 분야 (치조골, 치아재생 등)와 여러 임상분야 (뇌신경 관련 분야, 자가면역 관련 분야, 당뇨병 등)에 치아줄기세포를 세포치료제로 적용할 수 있는 가능성이 보고되면서 온전한 치수 상태 유지를 위한 연구의 필요성이 매우 높아지고 있다[27-29]. 따라서 본 연구를 통해 밝혀진 멜라토닌의 HDPCs에 대한 항노화 기능은 온전한 치수 상태를 유지하는데 응용될 수 있을 것이며 이를 위한 후속연구로 멜라토닌을 섭취한 그룹과 대조군 간의 치수상태에 대한 전임상 및 임상 연구가 진행되어야 한다고 생각한다.

백세 시대라 불리는 현대사회에서 노인 인구수가 증가함에 따라 치주건강 및 치주연구에 대한 관심이 집중되었던 반면 치수의 경우는 관심 정도가 상대적으로 덜한 편이었다[30,31]. 하지만, 치수조직 내 줄기세포의 존재가 밝혀지고 치수줄기세포를 분리하여 분화연구에 사용하려는 시도가 증가하면서 치수 조직은 새롭고 유용한 연구 분야로 부각되고 있다. 최근 치수 조직의 노화 정도가 치수줄기세포 분화 능력에 영향을 미치는 주요 인자가 된다는 보고로 인해 치수 조직의 항노화 연구에 대한 중요도가 높아지고 있다[32]. 또한 치매모델 생쥐에 치수줄기세

포 배양액을 처리하면 치매 생쥐의 인지능력이 향상되는 것으로 보아 치수는 치아를 형성·보호·유지하는 고유 기능뿐만 아니라 뇌기능에도 상당한 영향을 미치는 것으로 생각된다[33]. 따라서 HDPCs의 노화에 대한 기전을 밝히고 노화로부터 HDPCs를 건강하게 유지시킬 수 있는 노화억제 즉 항노화 물질을 발굴해 내는 연구는 건강하고 온전한 치수줄기세포를 유지하는데 중요한 역할을 할 것이다. 따라서 본 연구결과를 기반으로 하여 치수줄기세포에 대한 멜라토닌의 항노화 작용에 관한 연구와 멜라토닌과 같은 HDPCs 노화억제 효과를 가진 새로운 약물의 추가적인 발굴에 관한 연구가 추가적으로 이루어지기를 기대하는 바이다.

## 감사의 글

이 논문은 2015년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(과제번호: 2015R1D1A1A01061335) (to Bae S-K).

## Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicting interest.

## References

- Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P Jr, Han J, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development* 2000;127:1671-1679.
- Kumaraswamy J, Naidu J, Nagarajachar RB, Mahesh Reddy MBS. Truth from untruth: Dental pulp and its role in forensic odontology - a retrospective review *International. J Forensic Dent Sc*, 2017;2(1);30-33
- Murray PE, Stanley HR, Matthews JB, Sloan AJ, Smith AJ. Age-related odontometric changes of human teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;93:474-82.
- Chung HY, Lee EK, Choi YJ, Kim JM, Kim DH, Zou Y, Kim CH, Lee J, Kim HS, Kim ND, Jung JH, Yu BP. Molecular inflammation as an underlying mechanism of the aging process and age-related diseases. *J Dent Res* 2011;90:830-40. doi: 10.1177/0022034510387794
- Couve E, Schmachtenberg O. Autophagic activity and aging in human odontoblasts. *J Dent Res* 2011;90:523-8. doi: 10.1177/0022034510393347.
- Lee YH, Kim GE, Cho HJ, Yu MK, Bhattarai G, Lee NH, Yi HK. Aging of in vitro pulp illustrates change of inflammation and dentinogenesis. *J Endod*. 2013;39:340-5. doi: 10.1016/j.joen.2012.10.031.
- Lombard DB, Chua KF, Mostoslavsky R, Franco S, Gostissa M, Alt FW. DNA repair, genome stability, and aging. *Cell* 2005;120:497-512
- Lee KY, Koh SH, Noh MY, Park KW, Lee YJ, Kim SH. Glycogen synthase kinase-3beta activity plays very important roles in determining the fate of oxidative stress-inflicted neuronal cells. *Brain Res*. 2007;1129:89-99
- Unterluggauer H, Hampel B, Zwerschke W, Jansen-D€urr P. Senescence-associated cell death of human endothelial cells: the role of oxidative stress. *Exp Gerontol* 2003;38(10): 1149-60.
- Wang C, Jurk D, Maddick M, Nelson G, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T. DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell* 2009;8(3):311-323. doi: 10.1111/j.1474-9726.2009.00481.x.
- Kiyoshima T, Enoki N, Kobayashi I, Sakai T, Nagata K, Wada H, Fujiwara H, Ookuma Y, Sakai H. Oxidative stress caused by a low concentration of hydrogen peroxide induces senescence-like changes in mouse gingival fibroblasts. *Int J Mol Med*. 2012;30(5):1007-12. doi: 10.3892/ijmm.2012.1102.
- Burova E, Borodkina A, Shatrova A, Nikolsky N. Sublethal oxidative stress induces the premature senescence of human mesenchymal stem cells derived from endometrium. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:474931. doi: 10.1155/2013/474931
- Zhou L, Chen X, Liu T, Gong Y, Chen S, Pan G, Cui W, Luo ZP, Pei M, Yang H, He F. Melatonin reverses H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced premature senescence in mesenchymal stem cells via the SIRT1-dependent pathway. *J Pineal Res*. 2015 Sep;59(2): 190-205. doi: 10.1111/jpi.12250.
- Mehrzadi S, Safa M, Kamrava SK, Darabi R, Hayat P, Motevalian M. Protective mechanisms of melatonin against hydrogen-peroxide-induced toxicity in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Can J Physiol Pharmacol*. 2017;95(7):773-786. doi: 10.1139/cjpp-2016-0409.
- Nopparat C, Sinjanakhom P, Govitrapong P. Melatonin reverses H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescence in SH-SY5Y cells by enhancing autophagy via sirtuin 1 deacetylation of the RelA/p65 subunit of NF-κB. *J Pineal Res*. 2017 Aug;63(1). doi: 10.1111/jpi.12407.
- Guo XH, Li YH, Zhao YS, Zhai YZ, Zhang LC. Anti-aging effect of melatonin on the myocardial mitochondria of rats and associated mechanism. *Mol Med Rep*, 2016;15(1): 403-410. doi: 10.3892/mmr.2016.6002.
- Becker-André M, Wiesenberger I, Schaeren-Wiemers N, André E, Missbach M, Saurat JH, Carlberg C. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem* 1994;269(46):28531-28534.
- Kang YS, Kang YG, Park HJ, Wee HJ, Jang HO, Bae MK, Bae SK. Melatonin inhibits visfatin-induced inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in macrophages. *J Pineal Res*. 2013;55(3):294-303. doi: 10.1111/jpi.12072.
- Antolín I, Rodríguez C, Sainz RM, Mayo JC, Uría H, Kotler ML, Rodríguez-Colunga MJ, Tolivia D, Menéndez-Peláez A.

- Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect of gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J*. 1996;10(8):882-890.
20. Majidinia M, Sadeghpour A, Mehrzadi S, Reiter RJ, Khatami N, Yousefi B. Melatonin: A pleiotropic molecule that modulates DNA damage response and repair pathways. *J Pineal Res* 2017;63(1). doi: 10.1111/jpi.12416.
  21. Cai B, Ma W, Bi C, Yang F, Zhang L, Han Z, Huang Q, Ding F, Li Y, Yan G, Pan Z, Yang B, Lu Y. Long noncoding RNA H19 mediates melatonin inhibition of premature senescence of c-kit(+) cardiac progenitor cells by promoting miR-675. *J Pineal Res*. 2016;61(1):82-95. doi: 10.1111/jpi.12331.
  22. Gutierrez-Cuesta J, Tajés M, Jiménez A, Coto-Montes A, Camins A, Pallàs M. Evaluation of potential pro-survival pathways regulated by melatonin in a murine senescence model. *J Pineal Res*. 2008;45(4):497-505. doi: 10.1111/j.1600-079X.2008.00626.x.
  23. Caballero B, Vega-Naredo I, Sierra V, Huidobro-Fernández C, Soria-Valles C, De Gonzalo-Calvo D, Tolivia D, Pallàs M, Camins A, Rodríguez-Colunga MJ, Coto-Montes A. Melatonin alters cell death processes in response to age-related oxidative stress in the brain of senescence-accelerated mice. *J Pineal Res*. 2009;46(1):106-14. doi: 10.1111/j.1600-079X.2008.00637.x.
  24. Forman HJ. Redox signaling: An evolution from free radicals to aging. *Free Radic Biol Med*. 2016;97:398-407. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.07.003.
  25. Seomun Y, Kim JT, Kim HS, Park JY, Joo CK. Induction of p21<sup>Cip1</sup>-mediated G2/M arrest in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated lens epithelial cells. *Mol Vis*. 2005;11:764-74.
  26. Wang X, Martindale JL, Liu Y, Holbrook NJ. The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem J*. 1998;333 (Pt 2):291-300
  27. Martínez-Sarrà E, Montori S, Gil-Recio C, Núñez-Toldrà R, Costamagna D, Rotini A, Atari M, Luttun A, Sampaolesi M. Human dental pulp pluripotent-like stem cells promote wound healing and muscle regeneration. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):175. doi: 10.1186/s13287-017-0621-3
  28. Piva E, Tarlé SA, Nör JE, Zou D, Hatfield E, Guinn T, Eubanks EJ, Kaigler D. Dental Pulp Tissue Regeneration Using Dental Pulp Stem Cells Isolated and Expanded in Human Serum. *J Endod*. 2017;43(3):568-574. doi: 10.1016/j.joen.2016.11.018.
  29. Sanen K, Martens W, Georgiou M, Ameloot M, Lambrichts I, Phillips J. Engineered neural tissue with Schwann cell differentiated human dental pulp stem cells: potential for peripheral nerve repair? *J Tissue Eng Regen Med*. 2017. doi: 10.1002/term.2249.
  30. López R, Smith PC, Göstemeyer G, Schwendicke F. Ageing, dental caries and periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 2017;44 Suppl 18:S145-S152. doi: 10.1111/jcpe.12683.
  31. Reynolds MA. Modifiable risk factors in periodontitis: at the intersection of aging and disease. *Periodontol 2000*. 2014; 64(1):7-19. doi: 10.1111/prd.12047.
  32. Alraies A, Alaidaroos NY, Waddington RJ, Moseley R, Sloan AJ. Variation in human dental pulp stem cell ageing profiles reflect contrasting proliferative and regenerative capabilities. *BMC Cell Biol*. 2017;18(1):12. doi: 10.1186/s12860-017-0128-x.
  33. Wang F, Jia Y, Liu J, Zhai J, Cao N, Yue W, He H, Pei X. Dental pulp stem cells promote regeneration of damaged neuron cells on the cellular model of Alzheimer's disease. *Cell Biol Int*. 2017;41(6):639-650. doi: 10.1002/cbin.10767.