

Celecoxib의 항산화 작용에 따른 성체 치주인대 줄기세포 사멸억제

이 경 희[‡]

[‡]동서대학교 치위생학과 교수

Inhibition of Human Periodontal Stem Cell Death Following the Antioxidant Action of Celecoxib

Kyung-Hee Lee, Ph.D[‡]

[‡]*Dept. of Dental Hygiene, Dongseo University, Professor*

Abstract

Purpose : Although human periodontal ligament stem cells (hPDLSCs) are a supportive factor for tissue engineering, oxidative stress during cell culture and transplantation has been shown to affect stem cell viability and mortality, leading to failed regeneration. The aim of this study was to evaluate the antioxidant and protective effects against cell damage of celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor, and the antioxidant signal of hPDLSCs in H₂O₂-induced oxidative stress.

Methods : To induce oxidative stress in cultured hPDLSCs, H₂O₂ was used as an exogenous reactive oxygen species (ROS). Dose-dependent celecoxib (.1, 1, 10, or 100 μM) was administered after H₂O₂ treatment. WST-1 assay was used to assess cell damage and western blot was used to observe antioxidant activity of hPDLSCs in oxidative stress. Immunohistochemistry was performed for inverting the localization of the SOD and Nrf2 antibody.

Results : We found that progressive cell death was induced in hPDLSCs by H₂O₂ treatment. However, low-dose celecoxib reduced H₂O₂-induced cellular damage and eventually enhanced the SOD activity and Nrf2 signal of hPDLSCs. Oxidative stress-induced morphological change in hPDLSCs included lowered the survival and number of spindle-shaped cells, and shrinkage and shortening of cell fibers. Notably, celecoxib promoted cell survival function and activated antioxidants such as SOD and Nrf2 by positively regulating the cell survival signal pathway, and also reduced the number of morphological changes in hPDLSCs. Immunohistochemistry results showed a greater number of SOD- and Nrf2-stained cells in the celecoxib-treated group following oxidative stress.

Conclusion : By increasing SOD and Nrf2 expression at the antioxidant system, the findings suggest that celecoxib enhanced the antioxidative ability of hPDLSCs and protected cell viability against H₂O₂-induced oxidative stress by increasing SOD and Nrf2 expression in the antioxidant system.

Key Words : antioxidant, celecoxib, human periodontal ligament stem cells, Nrf2, SOD

[‡]교신저자 : 이경희, kyhee@dongseo.ac.kr

※ 이 논문은 2022년도 동서대학교 "Dongseo Frontier Project" 지원에 의하여 이루어진 것임.

제출일 : 2023년 4월 13일 | 수정일 : 2023년 5월 8일 | 게재승인일 : 2023년 5월 11일

I. 서론

1. 연구의 배경 및 필요성

대표적인 구강질환인 치주염은 치주인대와 치은 등을 파괴하고 만성적인 작용으로 치아 손실을 유발한다. 치주염은 염증성 세균에 의한 산화적 스트레스가 주원인으로 인지되고 있으며, 특히 과산화수소(hydrogen peroxide; H₂O₂)는 대사 과정 중 발생하는 중간 대사산물로 과다 발생 시 세포에 산화 스트레스를 유발하고, 이는 치주질환 발생의 주요 원인이 된다(Baltacıoğlu 등, 2014; Kim & Park, 2015). 산화적 스트레스와 치주질환 발병기전은 관련성이 있으며, 과량의 산화 반응은 다양한 구강질환의 병증성 진행을 유발한다(Oktay 등, 2015). 치주인대는 특수결합조직으로 세포 성분으로 섬유모세포, Malassez 상피잔사, 뼈모세포, 백악모세포 및 미분화 중간엽세포 등 다양한 세포군으로 구성돼 있으며 뼈조직, 섬유성 결합조직, 백악질을 생성할 수 있는 전구세포가 다량 존재한다(Huang 등, 2009). 성체줄기세포(adult stem cell)의 일종인 성체 치주인대 줄기세포(human periodontal ligament stem cell; hPDLSC)는 재생능이 뛰어나며 자기 복제력이 우수하고 다른 조직으로 다중 분화될 수 있는 능력을 갖추고 있다(Lee, 2020). 하지만, 성체 치주인대 줄기세포(hPDLSC)는 조직공학에 유용한 자원이지만 산화 스트레스는 세포배양 및 이식 동안 줄기세포 생존력 및 줄기 세포성에 영향을 미쳐 재생 실패로 이어질 수 있다. 산화 스트레스는 자유 라디칼/활성산소종 생성과 항산화 방어기전 사이의 불균형으로 일어난다. 자유 라디칼은 매우 불안정하고 다른 분자와의 반응성이 크며, 각각 ROS(reactive oxygen species) RNS(reactive nitrogen species), RSS(reactive sulfur species)를 생성한다(Cha 등, 2004). 정상적인 항상성 조건에서 내인성 ROS의 생산은 효소(SOD, 카탈라아제 및 글루타티온 과산화효소) 및 비효소 종(글루타티온, 아스코르브산염, 토코페롤, 레티놀 등)을 포함하는 세포 항산화 방어 시스템의 작용으로 균형을 이룬다(Ou 등, 2012). 특히, SOD는 슈퍼옥사이드 음이온을 과산화수소로 분해하는 것을 촉매하는 강력한 항산화제로 간주되며, 세포 내 SOD 활성은 ROS 생성을 억제하여 세포자멸사를 완화

한다.

비스테로이드성 항염증제(non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs)는 염증과 통증을 완화하고 혈소판 응집을 줄여 류마티스 및 뼈관절염 치료 등에 오랫동안 광범위하게 사용되었다. 하지만, 치주염에 있어 치주건강에 미치는 영향은 잘 규명되지 않았으며 위험과 이득에 대한 우려가 있으나, 치주재생에 사용될 때의 산화적 스트레스를 줄여 항염증 작용, T세포 활성 조절, M1 대식세포 억제, M2 대식세포 분화촉진 및 골세포 분화유도 등 다양한 측면의 긍정적 작용으로 치주치료의 보조제 역할로 활용되었다(Woo 등, 2021). 또한, 최근의 연구에서는 치주질환에서 비스테로이드성 항염증제가 조직공학 및 재생 분야에서 중요한 역할을 맡고 있음을 시사하고 있다(Ren 등, 2023). 비스테로이드성 항염증제는 cyclooxygenase(COX)의 억제를 표적으로 하여 진통, 해열 및 항염증 효과를 낸다. COX는 cyclooxygenase-1(COX-1)과 cyclooxygenase-2(COX-2)의 2가지 isoform으로 구성되며, COX-1은 주로 항상성 유지에 COX-2는 염증 요인 및 통증의 스트레스 하에서 작용한다(Lipsky 등, 2000). Celecoxib는 미국 식품의약청(food and drug administration; FDA)의 사용 승인을 받은 COX-2 효소를 억제하는 최초의 항염증제로 사용되었다(Whelton 등, 2001). COX-2는 염증반응과 생성에 필수 효소이며, prostaglandin E는 중요한 염증 매개체이다(Kurhe 등, 2014). Celecoxib는 프로스타글란딘(PG)E₂, 인터류킨(IL)-1 β , 종양괴사인자(TNF)- α , 일산화질소(NO) 방출을 감소시키는 능력을 보였고(Cheleschi 등, 2018; de Boer 등, 2009), MMP의 합성, 세포사멸, 핵인자(NF)-k β 및 NF-k β 리간드의 수용체 활성화를 감소시켰다(Ou 등, 2012; Tat 등, 2008). 특히, celecoxib는 비스테로이드성 소염진통제의 하나이자 cyclooxygenase-2(COX-2) 특이적 억제제로써 프로스타글란딘의 억제에 관여하며 해열, 항염, 진통에 관여한다. 몇몇 연구에서는 celecoxib의 항염증, 세포사 억제, 항산화제로서의 가능성을 제시하고 있다(Kurhe 등, 2014; Reksidler 등, 2007). Santiago 등(2014)은 우울한 쥐의 해마에서 celecoxib가 항산화 방어를 강화하고 산화 스트레스를 억제한다고 보고하였다.

2. 연구의 목적

본 연구의 구체적인 목적은 다음과 같다.

- 1) 성체 치주인대 줄기세포주에 H₂O₂ 처리에 따른 산화적 세포사멸 정도를 파악한다.
- 2) 산화적 손상에서 농도별 celecoxib 처치에 따른 세포사멸 정도를 확인하고자 한다.
- 3) Celecoxib 처치에 따른 항산화 작용의 세포 내 신호 전달 기전을 관찰하고자 한다.

II. 연구방법

1. 치주인대 줄기세포 배양

본 연구에 사용된 치주인대 줄기세포는 fluorescence-activated cell sorting(FACS) 분석법을 통해 치수유래 줄기세포의 특성을 확인한 세포주이며(Lee, 2020), 동서대학교 생명윤리위원회의 심의면제(1041493-E-2022-002)를 받았다. 이는 기존 부산지역 치과의원에 교정치료를 위해 내원한 환자 중 조직공여에 동의한 교정의 목적으로 소구치를 발거한 환자로부터 제공받은 제1소구치를 사용하여 성체 치주인대 줄기세포 주를 만들어 액화 질소에 보관 중인 치주인대 세포주를 본 연구에 사용하였다.

치주인대 줄기세포는 Huang 등(2009)의 방법으로 분리 배양하였으며 이를 간략히 요약하면, 발거한 소구치를 멸균상태 생리식염수에 담아 실험실로 이동한 후 치주인대 조직을 획득하였다. 치관을 멸균된 plier로 잡고 치근 중앙 1/3 부분을 #11 blade를 사용하여 치주인대 조직을 부드럽게 긁어 분리하고 조직은 α -MEM(Minimum essential medium α , Thermo fisher scientific, USA) 배지로 세척한 후 100 mm dish에 부착시켜 20 % FBS(Fetal bovine serum, Gibco™, USA)와 1 % P/S(Penicillin/streptomycin, Gibco™, USA)가 포함된 배지에서 37 °C, 5 % CO₂ 배양기에서 배양하였다. 계대 배양 후 2일마다 세포는 10 % FBS와 1 % p/s가 포함된 배지로 교환하고 배양한 후 실험에 사용하였다.

2. 산화적 세포 손상 및 항산화제 처리

96 well plate에 1×10⁴로 치주인대 줄기세포를 분주하여 24시간 동안 37 °C, 5 % CO₂ 배양기에서 배양하여 산화적 세포손상 및 항산화제 처리 효과 실험을 시행하였다. 세포의 산화적 손상을 일으키는 과산화수소(Hydrogen peroxide, Sigma, USA)는 100 μ M로 α -MEM(10 % FBS, 1 % P/S) 배지에 용해시켜 사용하였으며, 치주인대 줄기세포에 1시간 처리한 후 치주인대 세포사멸 정도를 확인하였다. 항산화제 약물인 celecoxib(Sigma, USA)의 치주인대 줄기세포 사멸억제 효과를 확인하기 위하여 celecoxib는 생리식염수 용액에 녹인 후, 10 mM의 stock용액을 만들어 사용하였다. 치주인대 줄기세포에 H₂O₂를 1시간 처리한 후 celecoxib를 .1, 1, 10, 100 μ M 농도로 처리하였고 24시간 배양하였다. 음성대조군은 치주인대 줄기세포에 H₂O₂를 1시간 처리한 후 항산화제 약물을 넣지 않은 세포배양 배지만 적용하여 관찰하였다. 양성대조군은 산화적 손상을 주지 않고 세포배양 배지만을 사용하였다.

3. 치주인대 줄기세포 생존율 측정

치주인대 줄기세포의 산화적 손상에 대한 생존율을 측정하기 위해 WST-1 assay를 실시하였다. 96 well plate에 1×10⁴로 치주인대 줄기세포를 분주하고 24시간 배양한 후, 100 μ M H₂O₂를 1시간 처리하여 산화적 손상을 유도하였다. 농도별 항산화제 약물 처리 24시간 후, 각각 WST-1(EZ-Cytox, Dongen bio, Korea) 10 μ l씩 분주하고 1시간 동안 배양기에서 반응을 시켰다. 치주인대 줄기세포 생존율은 흡광도 450 nm 파장에서 ELISA(Multiskan FC, Thermo fisher scientific, USA)를 이용하여 optical density를 측정하였으며, 각 분석은 4회 반복 시행한 실험 결과를 바탕으로 비교·분석하였다.

4. 항산화작용 신호전달기전

산화적 손상 후 항산화제 처리에 따른 세포 생존 관련 신호전달을 확인하기 위해 단백질의 발현량을 western blotting으로 확인하였다. 치주인대 줄기세포는 PBS로 2회 세척한 후 원심분리기를 이용하여 상층액을 제거하고, phosphatase inhibitor(PhosSTOP, Roche, Germany)를 첨가한 lysis buffer(PRO-PREP™ protein extraction

solution, Intron biotechnology, Korea)를 250 μ l씩 첨가하고 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 방치하여 세포를 분해시켰다. 분리된 세포를 모아서 microcentrifuge(Eppendorf, USA) 4 $^{\circ}$ C에서, 15,000 rpm의 속도로 15분간 원심분리시켜 단백질이 용출된 상층액을 수거한 후, 상층액의 분리된 단백질량은 BCA 단백질 분석방법을 사용해 분석하였다. 정량한 단백질량(60 μ g)에 따라 laemmli sample buffer를 넣어준 후 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 끓이고, 10 % SDS-PAGE를 사용하여 100V로 2시간 전기영동을 하였다. 전기영동 후 PVDF(Polyvinylidene difluoride membrane, Merck millipore, Germany)에 electro transfer를 실시하고 membrane은 5 % non-fat dry milk로 blocking 하였다. 5 % skim milk가 포함된 PBS에 1:10,000으로 희석한 1차 항체 1:10,000 Anti-SOD(Cell signaling technology, USA)과 anti-Nrf2(cell signaling technology)를 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 반응시켰다. 이후 Tris buffer로 10분씩 3회 세척 후, 2차 항체 1:15,000으로 희석한 Anti-mouse IgG를 이용하여 상온에서 2시간 반응시켰다. 세척 후 ECL kit(GE healthcare amershamTM, Fisher scientific, UK) 혼합액을 사용하여 밴드를 확인하였다.

또한, 항산화제의 신호전달 확인을 위한 세포의 단백질 발현 분포양상을 확인하기 위해 형광 면역염색을 시행하여 관찰하였다. 항산화 작용의 표지 인자인 SOD와 Nrf2의 발현을 관찰하기 위해 산화 손상 및 항산화제 처리한 세포를 10 % 포르말린으로 15분 고정 후 1 % BSA 용액으로 blocking 하였다. Mouse anti SOD, Nrf2 antibody를 넣고 실온에서 1시간 방치 후 PBS로 5분간 3회 세척 하였다. Goat anti mouse IgG-Alexa 488과 Texas Red(Abcam, USA)를 넣고 실온에서 1시간 방치 후 PBS로 세척하고 마운팅을 하였다. LSM700 confocal microscope(Zeiss, Germany)에서 400배 배율로 관찰하였다.

5. 분석방법

치주인대 세포 생존율 확인을 위한 WST-1 assay와 신호전달 기전 확인을 위한 Western blotting 분석 결과는 SPSS Windows 20(IBM Co, USA)를 이용하여 비교 분석하였으며, 일반선형 모형의 일변량 분산분석을 이용하였

다. 사후검정으로는 Turkey의 방법을 사용하였으며, 유의 수준은 p value<.05로 적용하였다.

III. 결 과

1. 농도별 항산화제 처리에 따른 치주인대 줄기 세포사멸 억제

성체 치주인대 줄기세포에서의 산화 스트레스로 인한 세포독성에 대한 항산화제인 celecoxib의 세포 생존 효과를 확인하고자, 성체 치주인대 줄기세포에 100 μ M H₂O₂를 1시간 처리하여 산화적 스트레스를 유도하고 celecoxib 약물효과를 확인하기 위해 농도별 항산화제를 치주인대 줄기세포에 각각 처리하였다. 성체 치주인대 줄기세포에 세포사를 유도하는 H₂O₂를 처리하고 세포손상을 관찰한 결과, H₂O₂를 처리하지 않은 normal 그룹에 비해 유의미하게 세포사멸이 일어남을 확인하였다(Fig 1, p<.001). 형태적 측면에서도 normal 그룹보다 세포의 수가 적었으며 전반적인 세포질이 축소되고 치주인대 줄기세포의 섬유가 짧아져 세포돌기가 위축된 형태적 변화도 관찰되었다.

항산화제인 celecoxib에 대한 항산화 정도를 확인하고자 농도별 처리 후 세포 생존율을 WST-1 분석법을 통해 확인하였다. 10 mM celecoxib는 수용성 용액으로 배지를 이용하여 .1, 1, 10, 100 μ M 농도로 희석하였으며, 치주인대 줄기세포에 대한 항산화 작용을 확인하고자 농도별 세포사멸 억제 정도를 분석하였다. 그 결과 저농도인 .1 μ M celecoxib 처리 24시간 후 H₂O₂만 처리한 대조군에 비해 치주인대 줄기세포의 생존율이 유의미하게 증가하였으며, celecoxib 처리 농도가 높아질수록 치주인대 줄기세포의 사멸이 억제되는 경향을 보였다(p<.01). 100 μ M 이상 고농도의 celecoxib에서는 치주인대 줄기세포의 세포 생존율이 감소하는 양상이 관찰되었으나 WST-1 분석 결과 H₂O₂만 처리한 대조군에 비해 유의미한 차이를 보였다(p<.01). 현미경적 형태적 변화에서는 성체 치주인대 줄기세포의 큰 변화는 없었으나 일부 섬유가 짧아지는 등의 미미한 형태적 변화가 관찰되었다 (Fig 1).

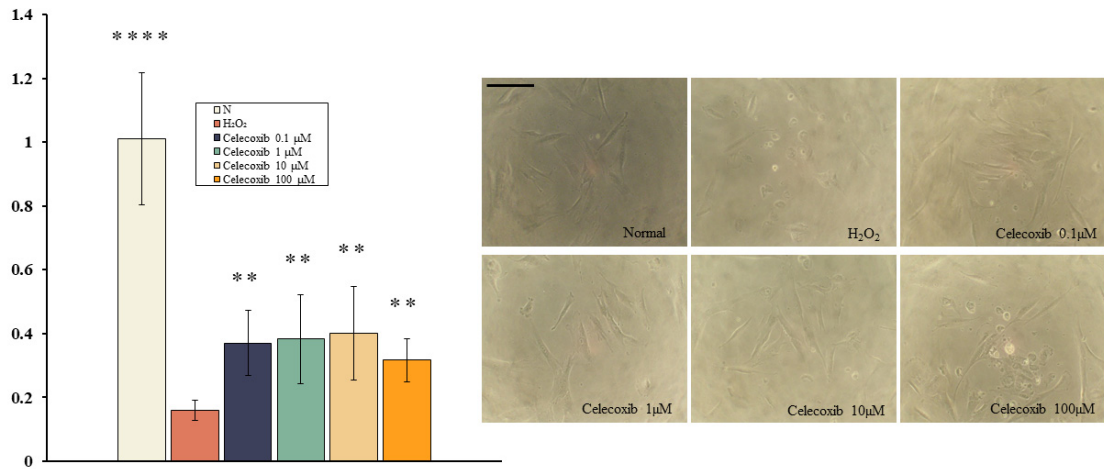


Fig 1. The cell viability of dose-dependent celecoxib (.1, 1, 10, 100 M treatment on the growth of hPDSCs in H₂O₂-induced oxidative stress. The images represent untreated, H₂O₂, different dose of celecoxib treated groups after 24 hours. Using the WST-1 assay, the quantification of cell survival as a ratio compared to the control group. The data presented as the mean \pm SEM from three independent experiments (* p <.05, ** p <.01, **** p <.001. Scale bar: 100 μ m)

2. Celecoxibe 처리에 따른 항산화 작용기전

치주인대 줄기세포의 항산화제 처리에 따른 항산화

메커니즘을 확인하기 위해, 세포 생존의 주요한 인자인 SOD의 발현 양상을 단백질 분석으로 확인하였다. ROS 관련 세포 신호전달의 핵심 요소인 SOD의 생성은 H₂O₂

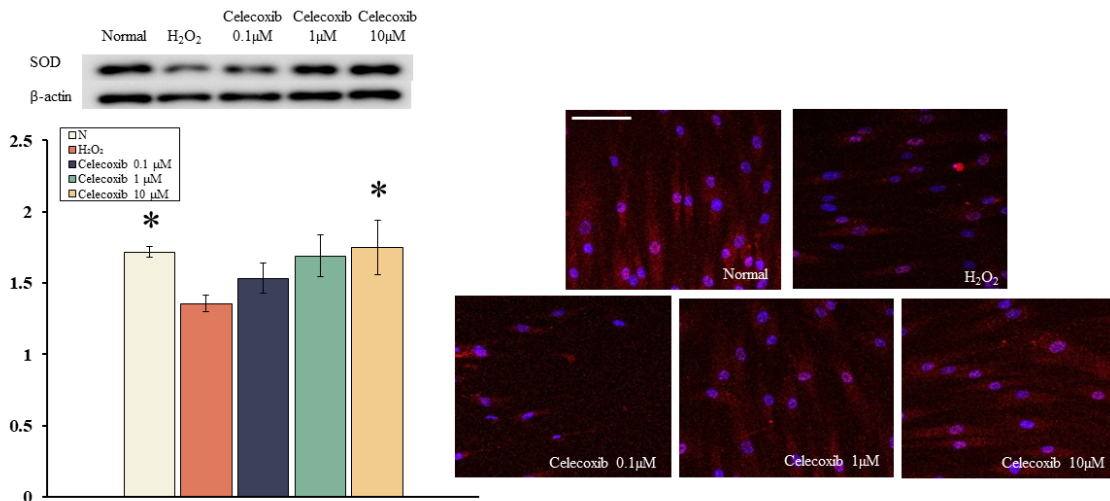


Fig 2. Activation of SOD results in reduction of ROS generation in hPDSCs following celecoxib treatment. The images represent immunohistochemistry at different dose of celecoxib treated groups after 24 hours. Texas red with DAPI showed the expression of the SOD in cell cytoplasm. hPDSCs were incubated with H₂O₂ oxidative stress in the presence or absence of celecoxib (.1, 1, 10). In western blot with antibodies against SOD and β -actin, the quantification of protein levels of SOD expression was normalized to β -actin. The data are presented as mean \pm SEM from three independent experiments (* p <.05 and ** p <.01 compared to the control group. Scale bar: 100 μ m)

만 처리한 대조군에서 정상 그룹보다 현저하게 감소된 것으로 관찰되었다. WST-1 분석법을 통해 확인한 세포 사멸 억제 효과를 보인 1과 10 μM celecoxib는 SOD 단백질 발현이 증가하는 양상은 보였으나 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 한편, celecoxib 처리 24시간 후 SOD 수준은 H₂O₂만 처리한 대조군에 비해 10 μM celecoxib 처리그룹에서만 유의하게 증가하였다(Fig 2, p<.05).

형광 면역염색을 통한 세포 내 SOD 발현 분포양상은 붉은색 형광 염색제로 확인하였다. 세포질에서 확인한 SOD 단백질 발현 감수성은 H₂O₂만 처리한 대조군에서 normal 그룹보다 현저하게 줄어든 세포 내 SOD 발현 양상이 관찰되었으며, 세포의 수도 줄어든 경향을 보였다. 반면, 1과 10 μM celecoxib 처리그룹에서는 세포의 SOD 발현이 전반적으로 증가하는 양상이 관찰되었으며, 이는 세포 내 항산화 작용에 의한 세포사멸 억제를 유도하였을 것으로 사료된다(Fig 2).

항산화 역할의 메커니즘을 확인하기 위해 ROS 관련 신호전달에서 세포 생존을 매개하는 Nrf2를 관찰하였다. Normal 그룹과 비교하여, ROS의 손상 효과에 대한 치주인대 줄기세포의 Nrf2 발현 감수성이 H₂O₂만 처리한 대조군에서 유의하게 감소하였다(Fig 3, p<.01). 그러나 Nrf2의 발현 수준은 H₂O₂ 그룹에 비해 10 μM celecoxib 처리그룹에서 유의하게 증가하였다(p<.05).

형광 면역염색을 통한 세포 내 Nrf2 발현 분포양상은 초록색 형광 염색제로 확인하였으며, 핵은 파란색으로 염색되었다. 면역염색으로 확인된 Nrf2 단백질 발현 감수성은 H₂O₂만 처리한 대조군에서 normal 그룹보다 세포질에서 현저하게 줄어든 세포 내 Nrf2 발현 양상이 관찰되었으며, 파란색으로 염색된 핵의 수도 줄어든 형태를 보였다. 반면, 10 μM celecoxib 처리그룹에서는 세포의 Nrf2 발현이 전반적으로 세포질에서 강하게 증가되는 양상이 관찰되었다(Fig 3).

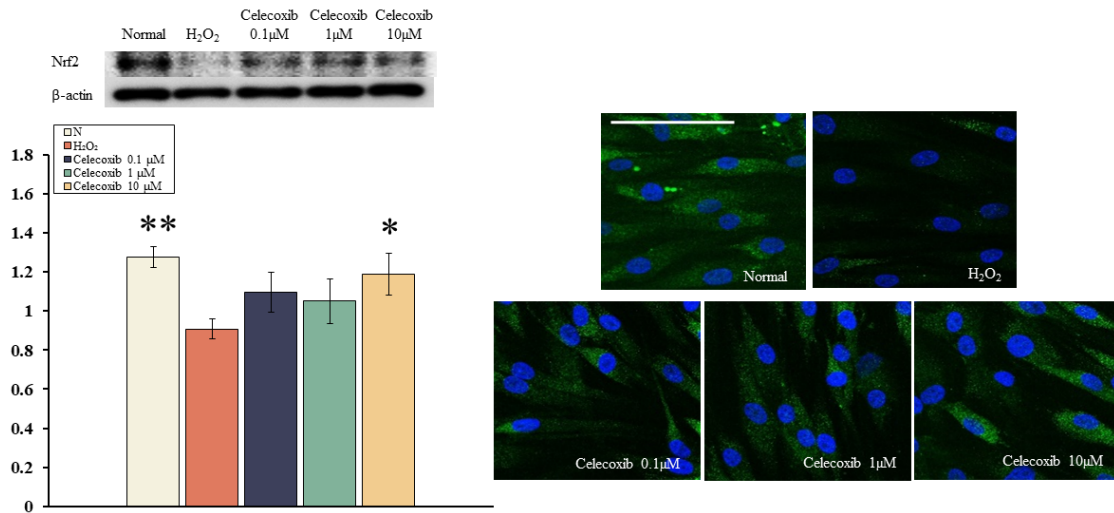


Fig 3. Activation of Nrf2 expression results in antioxidant effect in hPDSCs after dose-dependant celecoxib treatment. The images represent immunohistochemistry of Nrf2 expression at different groups. Alexa 488 with DAPI showed the expression of the Nrf2 protein in hPDSCs. The quantification of protein levels of Nrf2 protein level was normalized to β-actin using western blot analysis, The data are presented as mean ± SEM from three independent experiments (*p<.05 and **p<.01 compared to the control group. Scale bar: 100 μm)

IV. 고 찰

성체 치주인대 줄기세포(hPDLSC)의 세포사멸은 치아 지지 조직의 파괴 또는 손실과 밀접한 관련이 있으므로 스트레스 상황에서 세포 손실을 줄이기 위한 기본 메커니즘 연구가 이루어져 왔으며 치주조직 재생에 있어 중요한 역할이 밝혀져 자가이식 및 조직공학적 재생치료의 활용이 제시되고 있다(Merkel 등, 2019). 하지만, 지금까지 재생 의학에서 임상적 유용성에 도달하는 데 한계에 부딪히고 있다. 중요한 이유 중 하나는 성체 치주인대 줄기세포의 생체 외 확장 및 생체 내 생착에 대한 산화 스트레스의 영향으로 이식 부위의 생존율이 낮아 결국 조직 재생 실패를 초래하기 때문이다(Hu & Li, 2019). 이에 본 연구에서는 성체 치주인대 줄기세포 산화 스트레스 모델에서 항산화제 celecoxib 처리에 따른 세포 사멸억제 효과를 확인하고 단백질 발현 분석을 통한 세포 신호 전달기전을 확인하였다.

산화 스트레스의 전형적인 신호는 미분화 중간엽 줄기세포의 과도한 ROS 생성에 의한 미세환경손상으로 이는 줄기세포의 자가 재생, 증식 및 분화 능력을 감소시켜 조직 재생 실패로 이어진다(Zhao 등, 2020). 과산화수소(H_2O_2), 하이드록실 라디칼 및 슈퍼옥사이드 음이온에 의해 치주인대 줄기세포에서 높은 ROS 생성이 유도된다(Chen 등, 2019). 그중 H_2O_2 는 산화 스트레스를 유발하는 *in vitro* 모델에서 광범위하게 사용되고 있으며, 이는 ROS 과잉 생산 및 체내 항산화 방어 실패로 인한 산화/환원 불균형으로 이어진다. 특히, H_2O_2 는 주로 과도한 ROS를 유발하고 항산화 시스템 기전을 공격함으로써 산화적 세포 손상을 유도한다(Vergara 등, 2012). Adderley와 Fitzgerald(1999)는 10분 동안 H_2O_2 ($50\mu\text{ mol/L}$)에 노출된 쥐의 심장 근세포에서 자유라디칼 제거제(free radical scavenger)를 억제하는 COX-2의 발현이 유도되었다고 보고하였다. 또한, 여러 종류의 세포에서 많은 자극 요인(LPS, TNF- α 등)이 ROS 방출을 유도하고 COX-2 발현을 현저히 증가시키는 양상을 유도한다고 보고하고 있으며(Chanani 등, 2002; Ling 등, 2022), 이는 COX-2가 여러 가지 자극으로 유발되며 이 과정을 매개하는 공통 요인은 ROS임을 알 수 있다. 본 연구에서는 다양한 농

도($.1\sim 1,000\ \mu\text{M}$)의 celecoxib 단독 처리 시 $500\ \mu\text{M}$ 이상 고농도 일부를 제외하고 세포 생존 및 형태적 변화에 영향을 미치지 않았으며, H_2O_2 에 의한 산화적 손상 유도 후 $.1\ \mu\text{M}$ 이상의 celecoxib를 처리한 결과 유의미한 성체 치주인대 줄기세포 사멸억제 효과를 보였다. Römer 등(2013)의 연구에서 COX-2 억제제인 celecoxib 처리는 LPS로 자극된 성체 치주인대 섬유아세포에서 염증성 사이토카인 및 RANK-L의 발현에 뚜렷한 억제 효과를 보임을 보고하였다. 또한, I/R 손상모델에서 COX-2 억제제와 비타민 C의 처리 시 강력한 항염증과 항산화 작용이 관찰되었다(Gugliandolo 등, 2020). 본 연구에서는 저농도 celecoxib도 H_2O_2 로 유도된 산화 스트레스에 대한 보호 효과를 보였으며, 이는 human neuroblastoma cell(SH-SY5Y) 세포에서 6-OHDA에 의한 산화적 손상 후 세포사멸 억제 효과를 보인 $10\ \mu\text{M}$ 농도와 유사하다(Dassati 등, 2021).

중요한 항산화 효소 중 하나인 SOD는 산화를 방지하기 위해 슈퍼옥사이드 라디칼을 촉매할 수 있으며, 이는 치주인대 파괴와 강한 상관관계를 보인다(Nanci & Bosshardt, 2006). 본 연구에서는 산화적 세포 손상에서 선택적 COX-2억제제 celecoxib가 성체 치주인대 줄기세포의 세포사멸을 감소시키고 SOD 활성을 증가하였다. 세포 내 ROS의 대량 축적과 caspase 활성화는 DNA 가닥의 파괴와 세포사멸을 가속화 시킨다(Liu 등, 2015). 또한, 미토콘드리아 막 전위의 탈분극은 미토콘드리아 투과성 전이 공극의 개방을 유도하고 cytochrome c와 같은 pro-apoptosis 인자의 방출을 유도하며, cytochrome c를 산화제 생성 퍼옥시다제로 전환 시켜 미토콘드리아 분열을 유도하여 세포사멸이 일어난다(Wang 등, 2018). 본 연구결과 celecoxib는 H_2O_2 에 의해 유도된 세포 독성을 현저하게 억제하고 세포 내 ROS 수준의 감소와 SOD 활성의 증가와 관련이 있을 수 있는 세포사멸을 감소시킨 것으로 추정된다. 이는 리코펜 및 비타민 E와 같은 항산화제를 사용한 치주 치료가 기존 치주 치료에 비해 임상적 치주 치료방법을 개선하고 국소 및 전신 ROS 수준을 감소시킨다고 보고한 결과와 유사하다(Muniz 등, 2015; Singh 등, 2014). Nrf2는 항산화 및 해독 효소를 유도하여 세포 ROS 방어에 관여하는 중요한 전사 조절인자로 보고되고 있다(Chiu 등, 2017). 또한, 지속적인 박테리아,

호중구 및 대식세포 상호작용에 직면하여 치주조직을 보존하는 데 중요한 역할을 하며(Hasturk 등, 2012), Akt 신호는 과도한 ROS를 방어하기 위해 Nrf2를 활성화하기 때문에(Zhuang 등, 2019), celecoxib의 항산화 효과는 적어도 부분적으로는 Akt/Nrf2 신호전달 시스템을 활성화시킬 것으로 생각된다. 본 연구에서는 산화적 스트레스 손상에 대한 성체 치주인대 줄기세포의 Nrf2 발현 감수성이 H₂O₂만 처리한 실험군에서 유의하게 감소하였으나, 10 uM celecoxib 처리그룹에서 Nrf2의 발현이 유의하게 증가됨을 관찰하였다. Sima 등(2016)은 Nrf2 knockout 마우스에서 심각한 국소 산화적 손상이 관찰되었으며, 치주염이 있는 부위에서 치조골 소실과 부착력 손실이 증가됨을 확인하여 Nrf의 활성화에 대한 잠재력을 보고하였다. 이러한 Nrf2의 작용을 보다 체계적으로 활성화시키고 항산화제의 기능을 활용한다면, Nrf2 활성화는 치주염에 의한 조직 파괴를 차단할 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 본 연구결과를 바탕으로 볼 때 산화스트레스에 대하여 celecoxib가 성체 치주인대 줄기세포를 보호 역할을 하는 것으로 추측되며, 본 연구는 치주염과 관련된 산화 스트레스 반응 조절 네트워크의 복잡한 메커니즘 내에서 celecoxib의 항산화적 작용기전을 이용한 새로운 치료적 대안을 제공하였다 생각된다.

산화 스트레스는 돌이킬 수 없는 치주 부착 소실과 치조골 흡수를 초래하는 치주염의 진행에 밀접하게 관련되어 있고(Varela-López 등, 2015), 성체 치주인대 줄기세포는 세포 기반 조직 재생법으로 scaffold 및 가이드 생체 재료와 결합하여 다방향 분화 가능성과 자가 재생 능력으로 인해 성체 치주인대 줄기세포는 치주재생을 위한 유용한 자원으로 간주되어왔으나(Kim 등, 2016; Seo 등, 2004), 현재까지 염증성 미세환경의 산화 스트레스로 인해 임상적 조직 재생에 사용하는 것은 제한적이었다. 하지만, 본 연구결과 성체 치주인대 줄기세포에 celecoxib 항산화제 처리는 치주조직의 산화적 손상을 감소시켜 치주인대 줄기세포보호 및 분화에 관여할 것으로 생각되며 이는 나아가 치주염 개선에 기여할 것으로 생각된다. 이에 추후 연구에서는 in vivo 실험을 통해 성체 치주인대 줄기세포 이식과 celecoxib의 처리 농도 및 방법에 따른 미세환경의 산화적 스트레스에서 치조골 및 섬유아세포 분화에 관한 추후 연구가 필요하다고

생각된다.

V. 결론

본 연구에서는 성체 치주인대 줄기세포주에 선택적 COX-2 inhibitor로 알려진 celecoxib 약물을 처리함으로써 H₂O₂ 처리로 유발된 산화 스트레스로부터 성체 치주인대 줄기세포 사멸억제 효과 여부 및 신호전달기전을 관찰하였으며, 다음과 같은 결과를 확인하였다.

1. 산화적 스트레스 유도 후 세포손상을 관찰한 결과, H₂O₂를 처리하지 않은 normal 그룹에 비해 유의하게 세포사멸이 일어나고 형태적 측면에서 전반적인 세포질 축소 및 세포의 섬유가 짧아지고 세포돌기가 위축됨을 확인하였다.
2. COX-2 inhibitor인 celecoxib 처리 24시간 후 H₂O₂만 처리한 대조군에 비해 치주인대 줄기세포의 생존율이 유의하게 증가하였다. 현미경적 형태적 변화에서는 큰 변화는 없었지만, 일부 섬유가 짧아지는 등의 미미한 변화를 보였다.
3. SOD의 생성은 정상 그룹에 비해 H₂O₂만 처리한 대조군에서 감소하였고, 10 uM celecoxib 처리그룹에서 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 형광 면역염색에서 texas red와 DAPI로 염색된 세포내 SOD 단백질 발현 감수성은 H₂O₂만 처리한 대조군에서 현저하게 줄어든 양상이 관찰되었으나 1과 10 μM celecoxib 처리그룹에서는 대조군보다 세포의 수와 세포 내 SOD 발현이 전반적으로 증가되는 양상이 관찰되었다.
4. ROS의 손상 효과에 대한 치주인대 줄기세포의 Nrf2 발현 감수성이 H₂O₂만 처리한 대조군에서 유의하게 감소하였으나 10 μM celecoxib 처리그룹에서 유의하게 증가하였다. Alexa 488과 DAPI로 형광 면역염색된 Nrf2 단백질 발현 감수성은 H₂O₂만 처리한 대조군에서 normal 그룹보다 세포질에서 현저하게 줄어들었다. 하지만, 10 μM celecoxib 처리그룹에서는 세포의 Nrf2 발현이 전반적으로 세포질에서 강하게 증가하는 양상이 확인되었다.

따라서, 본 연구결과 celecoxib 처리를 통해 치주조직의 산화적 손상을 감소시키고 항산화작용을 통한 성체 치주인대 줄기세포 보호함으로써 나아가 치주질환 개선에 기여할 것으로 생각된다. 또한, 산화 스트레스로 인해 임상적 응용 및 재생에 제한이 있었던 성체 치주인대 줄기세포 이식의 한계점에 새로운 임상적 적용을 제시할 수 있다고 생각된다.

참고문헌

- Adderley SR, Fitzgerald DJ(1999). Oxidative damage of cardiomyocytes is limited by extracellular regulated kinases 1/2-mediated induction of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*, 274(8), 5038-5046. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.8.5038>.
- Baltacıoğlu E, Yuva P, Aydın G, et al(2014). Lipid peroxidation levels and total oxidant/antioxidant status in serum and saliva from patients with chronic and aggressive periodontitis. oxidative stress index: a new biomarker for periodontal disease?. *J Periodontol*, 85(10), 1432-1441. <https://doi.org/10.1902/jop.2014.130654>.
- Cha HS, Ahn KS, Jeon CH, et al(2004). Inhibitory effect of cyclo-oxygenase-2 inhibitor on the production of matrix metalloproteinases in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatol Int*, 24(4), 207-211. <https://doi.org/10.1007/s00296-003-0359-3>.
- Chanani NK, Cowan DB, Takeuchi K, et al(2002). Differential effects of amrinone and milrinone upon myocardial inflammatory signaling. *Circulation*, 106(12), Printed Online. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000032904.33237.8e>.
- Cheleschi S, Calamia V, Fernandez-Moreno M, et al(2018). In vitro comprehensive analysis of VA692 a new chemical entity for the treatment of osteoarthritis. *Int Immunopharmacol*, 64, 86-100. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.08.025>.
- Chen H, Huang X, Fu C, et al(2019). Recombinant klotho protects human periodontal ligament stem cells by regulating mitochondrial function and the antioxidant system during H₂O₂-induced oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, Printed Online. <https://doi.org/10.1155/2019/9261565>.
- Chiu AV, Saigh MA, McCulloch CA, et al(2017). The role of Nrf2 in the regulation of periodontal health and disease. *J Dent Res*, 96(9), 975-983. <https://doi.org/10.1177/0022034517715007>.
- Dassati S, Schweigreiter R, Buechner S, et al(2021). Celecoxib promotes survival and upregulates the expression of neuroprotective marker genes in two different in vitro models of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*, 194, Printed Online. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108378>.
- de Boer TN, Huisman AM, Polak AA, et al(2009). The chondroprotective effect of selective COX-2 inhibition in osteoarthritis: ex vivo evaluation of human cartilage tissue after in vivo treatment. *Osteoarthritis Cartilage*, 17(4), 482-488. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2008.09.002>.
- Gugliandolo E, Cordaro M, Siracusa R, et al(2020). Novel combination of COX-2 inhibitor and antioxidant therapy for modulating oxidative stress associated with intestinal ischemic reperfusion injury and endotoxemia. *Antioxidants*, 9(10), Printed Online. <https://doi.org/10.3390/antiox9100930>.
- Hasturk H, Kantarci A, Van Dyke TE(2012). Oral inflammatory diseases and systemic inflammation: role of the macrophage. *Front Immunol*, 3, Printed Online. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00118>.
- Hu C, Li L(2019). Melatonin plays critical role in mesenchymal stem cell-based regenerative medicine in vitro and in vivo. *Stem Cell Res Ther*, 10(1), Printed Online. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-1114-8>.
- Huang CYC, Pelaez D, Dominguez-Bendala J, et al(2009). Plasticity of stem cells derived from adult periodontal ligament. *Regen Med*, 4(6), 809-821. <https://doi.org/10.2217/rme.09.55>.
- Kim K, Yi T, Yun JH(2016). Maintained stemness of

- human periodontal ligament stem cells isolated after prolonged storage of extracted teeth. *J Periodontol*, 87(7), 148-158. <https://doi.org/10.1902/jop.2016.150693>.
- Kim YH, Park BS(2015). Antioxidant effect of eugenol in human periodontal ligament fibroblasts. *Korean J Phys Anthropol*, 28(1), 45-53. <https://doi.org/10.11637/kjpa.2015.28.1.45>.
- Kurhe Y, Mahesh R, Gupta D(2014). Effect of a selective cyclooxygenase type 2 inhibitor celecoxib on depression associated with obesity in mice: an approach using behavioral tests. *Neurochem Res*, 39(7), 1395-1402. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1322-2>.
- Lee K(2020). Protective effect of NACA on periodontal stem cell. *J Korean Soc Integr Med*, 8(3), 53-62. <https://doi.org/10.15268/ksim.2020.8.3.053>.
- Ling T, Boyd L, Rivas F(2022). Triterpenoids as reactive oxygen species modulators of cell fate. *Chem Res Toxicol*, 35(4), 569-584. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.1c00428>.
- Lipsky PE, Brooks P, Crofford LJ, et al(2000). Unresolved issues in the role of cyclooxygenase-2 in normal physiologic processes and disease. *Arch Intern Med*, 160(7), 913-920. <https://doi.org/10.1001/archinte.160.7.913>.
- Liu J, Xu Y, Zhang Z, et al(2015). Hydrogen peroxide promotes programmed cell death and salicylic acid accumulation during the induced production of sesquiterpenes in cultured cell suspensions of *aquilaria sinensis*. *Funct Plant Biol*, 42(4), 337-346. <https://doi.org/10.1071/fp14189>.
- Merkel A, Chen Y, George A(2019). Endocytic trafficking of DMP1 and GRP78 complex facilitates osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Front Physiol*, 10, Printed Online. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01175>.
- Muniz FWMG, Nogueira SB, Mendes FLV, et al(2015). The impact of antioxidant agents complimentary to periodontal therapy on oxidative stress and periodontal outcomes: a systematic review. *Arch Oral Biol*, 60(9), 1203-1214. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.05.007>.
- Nanci A, Bosshardt DD(2006). Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol* 2000, 40, 11-28. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00141.x>.
- Oktay S, Chukkapalli SS, Rivera-Kweh MF, et al(2015). Periodontitis in rats induces systemic oxidative stress that is controlled by bone-targeted antiresorptives. *J Periodontol*, 86(1), 137-145. <https://doi.org/10.1902/jop.2014.140302>.
- Ou Y, Tan C, An H, et al(2012). Selective COX-2 inhibitor ameliorates osteoarthritis by repressing apoptosis of chondrocyte. *Med Sci Monit*, 18(6), 247-252. <https://doi.org/10.12659/msm.882901>.
- Reksidler AB, Lima MMS, Zanata SM, et al(2007). The COX-2 inhibitor parecoxib produces neuroprotective effects in MPTP-lesioned rats. *Eur J Pharmacol*, 560(2-3), 163-175. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.12.032>.
- Ren J, Fok MR, Zhang Y, et al(2023). The role of non-steroidal anti-inflammatory drugs as adjuncts to periodontal treatment and in periodontal regeneration. *J Transl Med*, 21(1), Printed Online. <https://doi.org/10.1186/s12967-023-03990-2>.
- Römer P, Köstler J, Koretsi V, et al(2013). Endotoxins potentiate COX-2 and RANKL expression in compressed PDL cells. *Clin Oral Investig*, 17(9), 2041-2048. <https://doi.org/10.1007/s00784-013-0928-0>.
- Santiago RM, Barbiero J, Martynhak BJ, et al(2014). Antidepressant-like effect of celecoxib piroxicam in rat models of depression. *J Neural Transm*, 121(6), 671-682. <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1159-5>.
- Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al(2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364(9429), 149-155. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(04\)16627-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(04)16627-0).
- Sima C, Aboodi GM, Lakschevitz FS, et al(2016). Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 down-regulation in oral neutrophils is associated with periodontal oxidative damage and severe chronic periodontitis. *Am J Pathol*, 186(6), 1417-1426. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.05.007>.

- 2016.01.013.
- Singh N, Chander Narula S, Kumar Sharma R, et al(2014). Vitamin E supplementation, superoxide dismutase status, and outcome of scaling and root planing in patients with chronic periodontitis: a randomized clinical trial. *J Periodontol*, 85(2), 242-249. <https://doi.org/10.1902/jop.2013.120727>.
- Tat SK, Pelletier JP, Lajeunesse D, et al(2008). Differential modulation of RANKL isoforms by human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts: influence of osteotropic factors. *Bone*, 43(2), 284-291. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.04.006>.
- Varela-López A, Quiles JL, Cordero M, et al(2015). Oxidative stress and dietary fat type in relation to periodontal disease. *Antioxidants*, 4(2), 322-344. <https://doi.org/10.3390/antiox4020322>.
- Vergara R, Parada F, Rubio S, et al(2012). Hypoxia induces H₂O₂ production and activates antioxidant defence system in grapevine buds through mediation of H₂O₂ and ethylene. *J Exp Bot*, 63(11), 4123-4131. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers094>.
- Wang H, Chen Y, Zhai N, et al(2018). Correction to ochratoxin A-induced apoptosis of IPEC-J2 cells through ROS-mediated mitochondrial permeability transition pore opening pathway. *J Agric Food Chem*, 66(33), Printed Online. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04009>.
- Whelton A, Fort JG, Puma JA, et al(2001). Cyclooxygenase-2-specific inhibitors and cardiorenal function: a randomized, controlled trial of celecoxib and rofecoxib in older hypertensive osteoarthritis patients. *Am J Ther*, 8(2), 85-95. <https://doi.org/10.1097/00045391-200103000-00003>.
- Woo HN, Cho YJ, Tarafder S, et al(2021). The recent advances in scaffolds for integrated periodontal regeneration. *Bioact Mater*, 6(10), 3328-3342. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.03.012>.
- Zhao Y, Liu H, Xi X, et al(2020). TRIM16 protects human periodontal ligament stem cells from oxidative stress-induced damage via activation of PICOT. *Exp Cell Res*, 397(1), Printed Online. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.112336>.
- Zhuang S, Yu R, Zhong J, et al(2019). Rhein from rheim rhabarbarum inhibits hydrogen-peroxide-induced oxidative stress in intestinal epithelial cells partly through PI3K/Akt-mediated Nrf2/HO-1 pathways. *J Agric Food Chem*, 67(9), 2519-2529. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00037>.