

No Ozone Cold Plasma를 처리한 RAW 264.7 세포에서의 RANKL 유도된 초기 뼈파괴세포 분화 증가

최별보라^{1†} · 박상례^{2†} · 김규천³ · 김지영^{2*}

^{1†}피글 기업부설연구소 연구소장, ^{2†}경남정보대학교 치위생과 교수, ^{2*}경남정보대학교 치위생과 교수,
³부산대학교 치의학전문대학원 구강해부학교실 교수

RANKL-Induced Early Osteoclast Differentiation Increase in RAW 264.7 Cells Treated with No Ozone Cold Plasma

Byulbora Choi Ph.D^{1†} Sangrye Park Ph.D^{2†} Gyoocheon Kim Ph.D³ Jiyoung Kim Ph.D^{2*}

^{1†}Corporate Affiliated Research Institute, Feagle Co., Ltd., Yangsan, Research Director

^{2†}Dept. of Dental Hygiene, Kyungnam College of Information and Technology, Professor

^{2*}Dept. of Dental Hygiene, Kyungnam College of Information and Technology, Professor

³Dept. of Oral Anatomy, School of Dentistry, Pusan National University, Professor

Abstract

Purpose : Orthodontics is an essential treatment method for modern people with high aesthetic concerns, as it corrects malocclusion or uneven teeth. Orthodontic treatment changes the position of the teeth by moving them. Osteoclasts are formed on the side where the correction force is applied, and osteoblasts are formed on the other side. Plasma is the fourth substance and has been widely used in various medical fields, including bacterial killing, cell differentiation, and cancer cell death. This study aimed to assess the efficiency of no ozone cold plasma (hereafter referred to as NCP), which generates little ozone and is used in various medical fields, to induce osteoclast differentiation for proper tooth movement.

Methods : This study conducted the following experiment to investigate whether the treatment of RAW 264.7 cells with no-ozone cold plasma induces differentiation into osteoclast cells. Water-soluble tetrazolium salt-1 assay was used to examine the growth of RAW 264.7 mouse macrophages, and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining was used to evaluate NCP-induced osteoclast differentiation. Additionally, real-time polymerase chain reaction was used to measure the mRNA levels of osteoclast-related factors.

Results : In this study, RAW 264.7 cell growth was significantly lower in the NCP-treated group than in the untreated group at 24 and 48 h. TRAP staining revealed increased osteoclast differentiation of these cells. Moreover, real-time polymerase chain reaction revealed significantly higher mRNA levels of osteoclast-inducing factors c-FOS, cathepsin K, nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1, osteoclast-associated receptor, and TRAP in the NCP-treated group than in the untreated group.

Conclusion : Overall, our results demonstrate that no ozone cold plasma successfully induced the osteoclast differentiation of RAW 264.7 cells, showing potential for use in novel tooth movement devices for orthodontic treatment.

Key Words : cell differentiation, osteoclast, receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, tartrate-resistant acid phosphatase

*교신저자 : 김지영, kji@eagle.kit.ac.kr

†These authors contributed equally to this work

※ 본 연구는 2024년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 지자체-대학 협력기반 지역혁신사업의 결과임 [1345370815].

※ 이 성과는 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 [No. RS-2023-00249641].

제출일 : 2024년 12월 16일 | 수정일 : 2025년 2월 7일 | 게재승인일 : 2025년 2월 14일

I. 서론

1. 연구의 배경 및 필요성

치아는 사람이 먹거나 말하는 데에 꼭 필수적인 인체 구성기관이며, 외부로 드러나는 구조적인 위치적 특성 때문에 가지런하고 고른 치아 정렬이 중요한 요소로 작용하고 있다. 최근 현대인의 심미와 관련한 관심도는 나날이 증가하고 있으며, 이로 인하여 치열 교정은 치과 심미 치료 중 인기 있는 것 중 하나이며 필수적인 치료 분야가 되었다(Go, 2021).

보통 구조적인 이상이나 외적인 미용 때문에 치아 교정을 하는 경우가 많으며, 이 과정에서 치료 기간이 최소 2년 전후로 걸리는 것으로 알려져 있다(Fink & Smith, 1992). 치열 교정 연구에서는 치료 기간을 보다 줄이기 위한 방안으로 치아 이동을 빠르게 하여 치료 기간을 단축하는 데에 많은 관심이 쏠리고 있다.

치열을 교정하기 위한 치아 이동은 치열 교정 기구인 브라켓과 와이어를 구강 내 치아에 위치시켜 이동을 유도하며 이 과정에서 구강 위생 관리가 제대로 되지 않으면 치아우식증이나 치주질환과 같은 합병증이 발생할 수 있다(Balenseifen & Madonia, 1970). 따라서 치아 교정 기간을 단축하고 구강 내 부작용 없는 비침습적인 치료 방법을 개발하는 것이 중요하다. 교정치료 시간을 단축시키는 과정은 여러 방법이 있으나 핵심적인 과정으로 알려져 있는 것은 뼈파괴세포를 직접적으로 분화시켜 치아 간의 이동을 유도하는 것이다. 치아에 교정력이 가해지면 치아주위 구조물의 이동이 일어나며, 압박이 되는 부위 측면에서 뼈흡수가 일어나게 된다(Mostafa 등, 1983). 이때 치주막에 가해지는 힘으로 인해 뼈파괴세포가 유도되며, 뼈파괴세포가 뼈를 흡수하면서 치아가 이동하게 된다. 즉 치아의 이동은 뼈파괴세포에 의한 뼈의 흡수와 뼈모세포에 의한 뼈형성으로 인해 활성화되면서 진행된다(Nakai 등, 2023).

뼈파괴세포의 분화에는 종양괴사(tumor necrosis factor)인자 계열인 receptor activator of nuclear factor(NF)- κ B ligand(RANKL) 수용체의 발현을 유도하여 뼈 흡수에 기여한다(Udagawa 등, 2021). RANKL은 수용체인 receptor activator of nuclear factor(NF)- κ B(RANK)에 결

합하여 뼈파괴세포의 생성을 유도하며 분화되기 시작한다(Park 등, 2017). 또한, 뼈파괴세포 분화에 필수 전사인자로 알려진 nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1(NFATc1)과 c-FOS를 활성화시키며(Huang 등, 2006), 뼈파괴세포의 지표라 알려진 tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP)은 뼈파괴세포에만 존재하는 뼈흡수 효소로 양성으로 판별된 세포는 뼈파괴세포의 분화를 판단하는 기준이 된다(Chun 등, 2020).

Plasma는 고체, 액체, 기체에 이어 4번째 상태로 알려져 있으며, 의학 및 생물학 영역에서 널리 연구되고 사용되고 있다(Laroussi, 2020). Plasma는 낮은 온도에서 ions이나 charged particles 외에도 reactive oxygen species(ROS)나 reactive nitrogen species와 같은 여러 반응성의 혼합물을 생성하여 항암, 항균 및 항염과 같은 생물학적 효능을 보인다(Braný 등, 2020). 이때 발생하는 다양한 활성종들의 양이 비교적 낮거나 미비한 수준일 경우 세포 증식과 분화를 유도하며 높은 수준의 ROS는 산화적 스트레스를 유도하며 더 나아가 세포 사멸을 유발하기도 한다(Nupangtha 등, 2018).

본 연구에서 사용한 no ozone cold plasma(NCP)는 plasma의 큰 이슈인 오존 발생을 크게 낮추어 조직에 부작용과 통증이 적어 안전하게 조직에 적용이 가능하며, NCP의 mouse 처리 시 상처치유 효과 및 피부성장인자들의 증가를 확인하였다(Choi 등, 2024a). 또한, 선행연구 결과 NCP를 이용한 골모세포의 분화 촉진 및 뼈 형성과 관련된 연구는 많이 진행되었으나(Choi 등, 2024b), 뼈 흡수에 미치는 영향은 거의 알려진 바 없다.

이에 본 연구에서는 NCP를 이용한 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포를 이용하여 RANKL을 처리한 뼈파괴세포로의 분화를 더 유도하는지 확인하고자 본 실험을 진행하였다.

2. 연구의 목적

본 연구에서는 NCP를 이용하여 RANKL로 유도된 RAW 264.7에서 뼈파괴세포 분화 유도과 이와 관련된 TRAP, c-FOS, cathepsin K(CTSK), NFATc1, 그리고 osteoclast-associated receptor(OSCAR)의 발현 여부를 통해 확인하고자 하였다.

II. 연구방법

1. 플라즈마 장치

실험에 사용된 NCP(Feagle, Korea)는 (주)피글에서 개발된 실험용 plasma로 오존 방출이 거의 없도록 설계된 장치이며, 특허로 등록된 저온 plasma이다. Food and Drug Administration에서 권고하는 오존 수준인 0.05 PPM보다 훨씬 낮은 오존 수치를 발생한다. 이 장치는 휴대용 핸드피스, 메인보드, 고전압 보드, solenoid valve, 가스 유량 제어기, 그리고 스위치 모드 전원 공급 장치로 구성되어 있다. 아르곤 가스는 케이블을 통해 본체 장치 기기로 전달되며 본체 내부의 가스 유량 제어기는 아르곤 가스를 1.0 slm(standard L/min)의 고정된 속도로 plasma 발생기로 전달하여 발생시킨다. NCP의 핸드피스는 움직이지 않도록 고정하여 편평한 장소에서 세포에 처리하였으며, 세포와 NCP 발생 부위와의 거리는 10 mm로, 세포 배양액이 NCP에서 발생하는 가스에 의해 건조되지 않고 처리 가능한 거리로 결정하고 실험을 진행하였다.

2. 세포 배양

본 실험에 사용된 세포는 RAW 264.7 세포로 한국 세포주 은행(KCLB, Korea)에서 분양받아 37 °C 5 % CO₂ 배양기(MCO-18AIC, Sanyo, Japan)에서 Dulbecco's modified Eagle's media(DMEM, Gibco BRL, USA), 10 % fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL, USA), 그리고 1 % penicillin-streptomycin(Gibco BRL, USA)가 함유된 배지를 이용하여 배양하였다. 배양 주기는 2~3일로 세포가 80 %로 confluence 되었을 때 계대 배양하였으며, 분양받은 시점부터 실험에 사용된 passage는 10이하로 사용하였다.

3. 세포 증식율 평가

세포의 증식율을 측정하기 위해 water-soluble tetrazolium salt-1(WST-1) assay (Daeil, Korea) 분석을 시행하였다. 먼저 RAW 264.7 세포를 24 well plate(SPL life sciences, Korea)에 1×10⁵의 양으로 분주한 다음 안정화를

위해 24시간 동안 37 °C의 5 % CO₂ 배양기에서 배양하였다. 그런 다음 NCP를 각각 30초와 1분씩 처리하고 다시 24시간과 48시간 동안 배양하였다. 그 후, WST-1 용액을 DMEM 배지와 제조사가 표시하고 있는 농도로 희석한 다음 세포에 처리하여 37 °C의 5 % CO₂ 배양기에 2시간 동안 배양하였다. 그런 다음 적절히 반응이 일어났는지 현미경으로 확인한 후 ELISA reader(Multiskan GO microplate spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Germany)를 이용하여 450 nm 파장으로 흡광도를 측정하였다. 실험의 정확성을 위해 3번씩 독립적으로 진행하였으며, 통계프로그램으로 분석하여 그래프로 나타내었다.

4. Osteoclast 분화 유도제인 RANKL과 플라즈마 처리

RAW 264.7 세포를 osteoclast로 분화를 유도하기 위해 RANKL(Mouse RANKL recombinant protein, peproTech, USA)을 처리하였다. 사용된 RANKL의 농도는 20 ng/ml로 분화 유도 기간은 7일 정도 진행하고 매 2~3일마다 교체해주었다. NCP는 RANKL을 처음 세포에 처리 시 같이 적용되었으며, 처음 1회만 처리하고 2일 후 RANKL이 포함된 새 배지로 교환해주었다. NCP의 처리 시간은 30초와 60초로 나누어 처리하였다.

5. TRAP stain

플라즈마가 RAW 264.7 세포의 뼈파괴세포 분화에 미치는 영향을 관찰하기 위해 뼈파괴세포만 특정적으로 염색되는 TRAP stain을 진행하였다. RAW 264.7 세포를 24 well plate(SPL life sciences, Korea)에 1×10⁵의 양으로 분주한 다음 안정화를 위해 24시간 동안 37 °C의 5 % CO₂ 배양기에서 배양하였다. 그 후, NCP를 시간대별로 처리하였으며, RANKL이 함유된 배지로 7일 동안 뼈파괴세포 유도를 진행하였다. 사용된 TRAP staining kit(Cosmo bio, USA)는 제조사의 매뉴얼대로 진행되었으며, 염색 이후 핵이 3개 이상 관찰된 다핵세포를 카운트하여 그래프로 나타내었다.

6. Real time polymerase chain reaction(PCR)

NCP가 RAW 264.7 세포의 뼈파괴세포 분화에 미치는

영향을 관찰하기 위해 mRNA 정량화하여 확인 가능한 real time PCR을 진행하였다. RAW 264.7 세포를 24 well plate (SPL life sciences, Korea)에 1×10^5 의 양으로 분주한 다음 안정화를 위해 24시간 동안 37 °C의 5 % CO₂ 배양기에서 배양하였다. 그 후, NCP를 시간대별로 처리하였으며, RANKL이 함유된 배지 처리 후 7일 동안 뼈파괴 세포 유도를 진행하였다. 그 후, DPBS로 세척한 다음

TRIzol reagent(Invitrogen, USA)를 이용하여 mRNA를 분리하고 정량한 다음 1 µg의 mRNA로부터 One-step PreMix kit(iNtRON Biotechnology Inc., Korea)를 이용하여 cDNA를 합성한 다음 제작된 primer와 SensiFAT SYBR No ROX kit(Bioline, USA)를 사용하여 real time pcr(CFX 96 real time PCR, Bio-rad, USA)을 진행하였다. 사용된 primer는 Table 1과 같다.

Table 1. Primer sequence and product length

Primer name		Sequence	Product length
-actin	Forward	5'-aggccaaccgtgaaaagatg-3'	186
	Reverse	5'-tggcgtgagggagagcatag-3'	
c-FOS	Forward	5'-cgggttcaacgccgacta-3'	165
	Reverse	5'-tggcactagagacggacagat-3'	
CTSK	Forward	5'-tgtataacgccacggcaaa-3'	195
	Reverse	5'- ggttcacattatcacggtcaca-3'	
NFATc1	Forward	5'-gccttttgcgagcagtatctg-3'	160
	Reverse	5'-gctgcacctcgatccgaag-3'	
OSCAR	Forward	5'-ccgtgctgacttcacaccaa-3'	165
	Reverse	5'-ggggtgacaaggccactttt-3'	
TRAP	Forward	5'-gaacattgaggacaaggcccc-3'	773
	Reverse	5'-ccacacaggtaggcagtgac-3'	

7. 통계적 방법

모든 실험의 결과는 3회 반복하여 진행하였으며 SPSS 프로그램(version 21.0, SPSS Inc, USA)을 통해 일원배치 분산분석을 실시하여 사후 분석을 진행하였다. 사용된 사후분석은 Duncan을 실시하고 Prism 프로그램(version 5.0, GraphPad, USA)을 통해 그래프로 나타내었다.

한 결과에서는 NCP를 처리하지 않은 군이 100 %, NCP를 30초간 처리한 군에서는 96.33 %, 그리고 NCP를 1분간 처리한 군에서 96.67 %의 생존율을 나타내었다 (p<.062). NCP를 처리한 후 48시간 지난 결과에서는 NCP를 처리하지 않은 군이 100 %, NCP를 30초간 처리한 군에서는 80.33 %, 그리고 NCP를 1분간 처리한 군에서 83.33 %의 생존율을 보였다(p<.000).

III. 결과

1. NCP를 처리한 RAW 264.7 세포에서의 세포 생존률 저하

마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포의 생존률을 확인하기 위해 NCP 처리 후 24시간과 48시간 배양하여 결과를 확인하였다(Fig 1). NCP를 처리한 후 24시간이 경과

2. NCP를 처리한 RAW 264.7 세포에서의 TRAP 양성 세포 증가

TRAP은 뼈파괴세포를 나타내는 지표로 염색 과정을 통해 현미경으로 판별 가능하다. 또한 뼈파괴세포로 분화될 시 다핵세포로 분화가 되며 이는 현미경 상으로 세포 당 최소 3개 이상의 다핵이 관찰될 경우 다핵세포라 한다. RANKL을 처리하지 않은 군보다 RANKL을 처리한 모든 군에서 뼈파괴세포 양성이 증가하였으며, 그 중

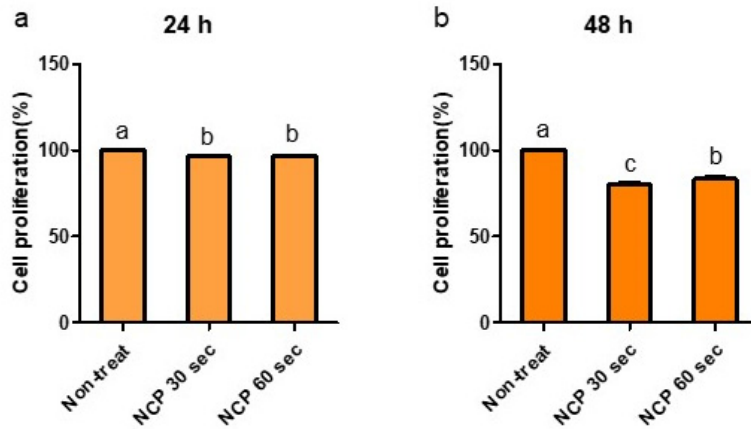


Fig 1. The cell proliferation rates of RAW 264.7 cells treated with no-ozone cold plasma (NCP) on (a) 24 h and (b) 48 h

NCP를 30초, 1분 처리한 군에서 다핵세포로 분화된 것을 확인하였다(Fig 2a). Fig 2b에서 핵이 3개 이상 뼈파괴 세포로 분화된 세포의 개수를 확인한 결과 RANKL과 아

무것도 처리하지 않은 군은 0개, RANKL만 처리한 군은 8.67개, RANKL과 NCP를 30초간 처리한 군은 25개, 그리고 RANKL과 NCP를 1분간 처리한 군이 16.67개로 확

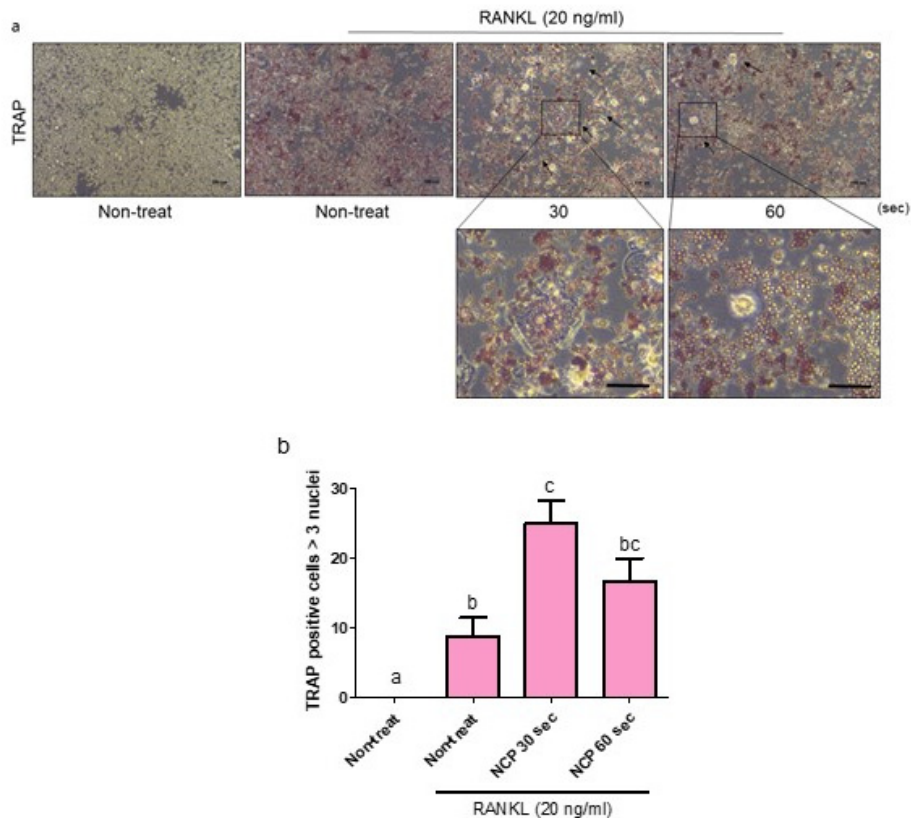


Fig 2. The tartrate-resistant acid phosphatase assay of RAW 264.7 cells treated with NCP after 7 days on (a) TRAP stain photo (b) counts of TRAP positive cells

인되었다($p < .001$).

3. NCP를 처리한 RAW 264.7 세포에서의 뼈파괴세포 분화 관련 인자 발현 증가

RANKL을 처리한 RAW 264.7 세포에서의 뼈파괴세포 분화와 관련된 mRNA의 발현을 확인하기 위해 real-time PCR을 통해 평가하였다(Fig 3). c-FOS, CTSK, NFATc1, OSCAR 및 TRAP의 mRNA가 모두 RANKL만 처리한 군보다 RANKL과 NCP를 같이 처리한 군에서 전부 유의하

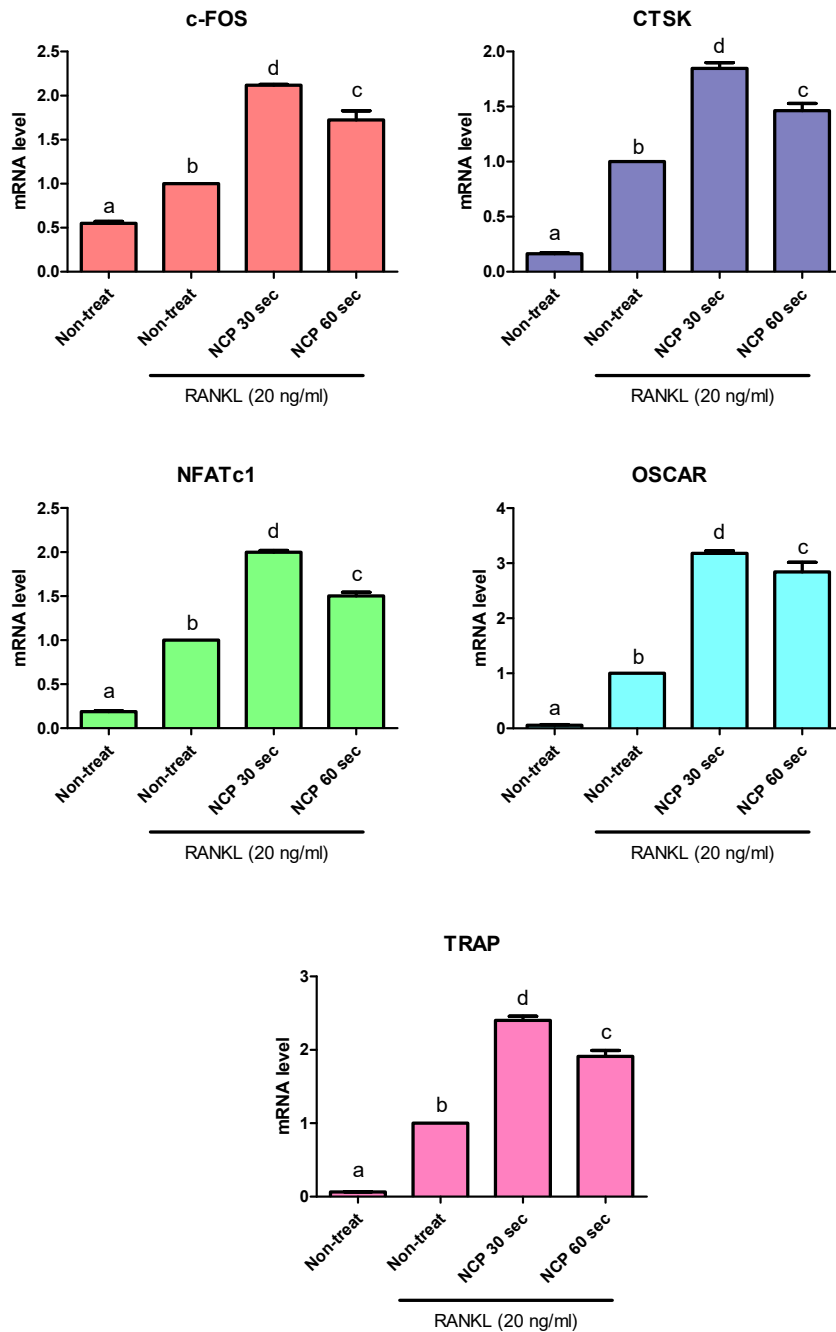


Fig 3. The real time polymerase chain reaction of RAW 264.7 cells treated with NCP after 7 days on expression of osteoclast differentiation marker

게 증가하였으며, 최소 1.46배에서 최대 3.18배로 증가하였다. 또한 NCP를 30초만 처리한 군이 1분만 처리한 군보다 발현량이 증가한 것으로 확인되었다($p < .000$).

IV. 고 찰

뼈파괴세포는 뼈를 형성하는 뼈모세포와는 반대로 뼈의 흡수나 파괴를 담당하는 단핵구 대식세포의 계통으로 RANKL과 같은 특정한 cytokine에 의해서 분화되어 생성된다(Takeshita 등, 2000). 뼈파괴세포는 뼈를 파괴하여 치아 이동에 필요한 공간 형성을 해주며, 궁극적으로 치아의 이동에 중요한 역할을 한다(Jeon 등, 2021).

본 실험에서는 NCP가 세포에 미치는 독성효과를 확인하기 위해 먼저 RAW 264.7 세포 생존율을 평가하였다. NCP 처리 후 세포 생존률을 확인한 결과, 24시간 후 NCP를 처리하지 않은 군에서 생존률 100 %, 30초 처리 시 96.33 %의 생존률을 나타내었으며, 이는 통계적으로 유의하지 않았다. 그러나 48시간 후 30초 처리한 군에서 80.33 %, 60초 처리한 군에서 83.33 %의 생존 효과를 나타내었다. 48시간 처리 후 NCP에 의한 RAW 264.7 세포의 생존률은 감소하였으나, 세포 독성 판정 기준인 IC50이 NCP 처리 후 나타나지 않았으며, 또한 현미경 확인 결과 세포의 형태 변화 등이 나타나지 않았다.

세포 생존율 확인을 위한 NCP 처리 시간 조건과 동일하게 뼈파괴세포로의 분화가 유도되는지 확인하기 위해 TRAP 염색 방법을 통해 관찰하였다. 그 결과 30초 처리된 NCP 군에서 처리하지 않은 군보다 2.88 배 증가된 뼈파괴세포를 나타내었으며, 1분 처리된 NCP 군에서는 1.92 배 증가된 비율을 보였다. 이는 NCP 처리 시 RANKL이 처리된 RAW 264.7 세포에서 뼈파괴세포로 분화를 효과적으로 유도한다는 사실을 확인하였다. 이러한 결과는 low level laser를 이용하여 RAW 264.7 세포를 뼈파괴세포로 분화를 촉진하는 연구와 동일한 연구 결과를 나타내었다(Huang 등, 2024; Song 등, 2021). 그러나 Boyle 등(2003)에서 뼈파괴세포에 특징적으로 나타나는 다핵의 형태가 NCP 처리 이후 초기 발현의 형태를 띠는 것으로 보아 NCP에 의한 단핵 대식세포가 성숙된 뼈파

괴세포로 유도되지 않는다는 것을 확인하였다. 이는 뼈파괴세포로 유도하는 RANKL의 농도 및 기간을 조절하여 성숙 뼈파괴세포의 분화를 유도하는지 NCP를 이용한 실험을 더 진행하는 것이 좋을 것으로 사료된다.

뼈파괴세포로 분화 시 c-FOS와 NFATc1 유전자가 특징적으로 발현하며, 그 중 c-FOS는 면역 세포나 다른 세포 유형에서 다양한 인자들의 자극에 따라 활성화되는 유전자로 알려져 있다(Grigoriadis 등, 1994). 또한, RANKL과 같은 수용체에 결합되어 뼈파괴세포 전구체에서 활성화되는 것으로 알려져 있다(Boyce 등, 2005). NFATc1은 뼈파괴세포를 형성하는 전사인자로 RANKL로 유도된 뼈파괴세포 분화의 중요한 조절자이며 뼈파괴세포 활성화에 중추적인 역할을 한다(Zhao 등, 2010). Aliprantis 등(2008)의 연구에 따르면 NFATc1 knockout 마우스가 뼈파괴세포의 생성 장애로 골화석증을 발병한다고 보고된 바 있다. 또한 NFATc1은 뼈파괴세포 분화 시 중요한 인자인 CTSK, OSCAR 및 TRAP 등의 발현을 촉진시킨다(Kim & Kim, 2014). CTSK는 뼈파괴세포로부터 분비되어 뼈가 흡수되는 동안 콜라겐과 같은 다른 기질을 가진 단백질을 분해한다(Lotinun 등, 2013). 그리고 OSCAR는 면역 글로블린 유형 수용체이며 뼈파괴세포 분화를 자극하여 전 뼈파괴세포에 특이적으로 발현된다(Park 등, 2020). TRAP은 뼈파괴세포가 뼈의 재흡수 과정에서 분비하는 산성 인산 가수분해효소로 알려져 있다(Solberg 등, 2014).

본 연구에서 real time PCR 실험을 통한 c-FOS mRNA 발현량이 NCP를 처리하지 않은 군보다 NCP를 30초 처리한 군에서 2.12배 증가된 발현량을 보였으며, CTSK는 1.85배 증가된 발현량을 보였다. 또한 NFATc1은 2배 정도 증가되었으며, OSCAR는 3.18배 증가되었다. 그리고 TRAP은 2.40배 증가된 패턴을 보였다. 이러한 결과는 NCP를 RAW 264.7 세포에 처리함으로써 뼈파괴세포로의 분화를 증가시킨다는 사실을 증명하며 또한 1분 처리보다는 30초 처리가 더 효과적임을 시사하고 있다. NCP를 이용한 뼈파괴세포로의 분화 유도는 치열 교정을 완료하는데 치료 시간을 줄이고 부작용의 발생을 줄이는 새로운 교정 치료 접근 방식이다. 다른 plasma 장비와는 달리 오존의 발생량이 적고 처리 방식이 간단하며, 저온으로 발생하기 때문에 통증을 유발하지 않는다(Choi 등,

2021). 또한, NCP는 치아 교정으로 인해 발생 가능한 치아우식증이나 치주질환과 같은 세균성 박테리아로 인한 부작용의 발생을 저해시키며 예방 가능한 효능을 가지고 있다(Park 등, 2022).

하지만 *in vitro* 상의 세포 level에서만 뼈파괴세포로의 분화 효과를 확인한 점이 제한점으로 들 수 있으며 차후 *in vivo* 동물 실험 및 임상 시험을 통해 안전하고 빠른 치아 교정을 위해 새로운 장비로서의 평가하는 것이 필요할 것으로 사료된다.

V. 결론

본 연구는 NCP를 이용한 RAW 264.7 세포에서의 뼈파괴세포 분화 유도과 그 기전에 관하여 확인하였으며 그 결과 세포생존을 감소 및 TRAP 양성 세포의 증가를 관찰하였고 관련된 c-FOS, CTSK, NFATc1, OSCAR 및 TRAP의 mRNA 증가가 나타났다. *In vitro* 세포 level에서는 NCP의 처리 시간이 1분보다 30초간 처리한 것이 가장 효과적인 것으로 나타났다. 본 연구는 NCP가 치아 이동을 위한 뼈파괴세포의 분화와 활성화를 촉진하여 치아 교정을 위한 기간 단축에 큰 효과를 나타낼 것으로 판단되며, 차후 뼈파괴세포 분화 조절을 위한 장비로서 모든 임상 분야에 적용 가능성이 있음을 시사한다.

참고문헌

Aliprantis AO, Ueki Y, Sulyanto R, et al(2008). NFATc1 in mice represses osteoprotegerin during osteoclastogenesis and dissociates systemic osteopenia from inflammation in cherubism. *J Clin Invest*, 118(11), 3775-3789. DOI: 10.1172/JCI35711

Balenseifen JW, Madonia JV(1970). Study of dental plaque in orthodontic patients. *J Dent Res*, 49(2), 320-324. DOI: 10.1177/00220345700490022101

Boyce BF, Yamashita T, Yao Z, et al(2005). Roles for NF-kappaB and c-Fos in osteoclasts. *J Bone Miner*

Metab, 23, 11-15. DOI: 10.1007/BF03026317

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL(2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(6937), 337-342. DOI: 10.1038/nature01658

Braný D, Dvorská D, Halašová E, et al(2020). Cold atmospheric plasma: a powerful tool for modern medicine. *Int J Mol Sci*, 21(8), Printed Online. DOI: 10.3390/ijms21082932

Choi BB, Choi JH, Kang TH, et al(2021). Enhancement of osteoblast differentiation using no-ozone cold plasma on human periodontal ligament cells. *Biomedicines*, 9(11), Printed Online. DOI: 10.3390/biomedicines9111542

Choi BBR, Park SR, Kim GC(2024b). Effects of different no-ozone cold plasma treatment methods on mouse osteoblast proliferation and differentiation. *Medicina*, 60(8), Printed Online. DOI: 10.3390/medicina60081318

Choi BBR, Song KW, Lee HJ, et al(2024a). Effects of no-ozone cold plasma and mouse mesenchymal stem cell treatments on wound healing in a mouse skin model. *Biochem Biophys Res Commun*, 738, Printed Online. DOI: 10.1016/j.bbrc.2024.150562

Chun KH, Jin HC, Kang KS, et al(2020). Poncirin inhibits osteoclast differentiation and bone loss through down-regulation of NFATc1 *in vitro* and *in vivo*. *Biomol Ther*, 28(4), 337-343. DOI: 10.4062/biomolther.2018.216

Fink DF, Smith RJ(1992). The duration of orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 102(1), 45-51. DOI: 10.1016/0889-5406(92)70013-Z

Go EJ(2021). Relation between oral health knowledge and behavior and treatment satisfaction in orthodontic patients. *Journal of Korean Clinical Health Science*, 9(2), 1486-1492. DOI: 10.15205/kschs.2021.12.31.1486

Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, et al(1994). c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science*, 266(5184), 443-448. DOI: 10.1126/science.7939685

Huang CY, Le HHT, Tsai HC, et al(2024). The effect of low-level laser therapy on osteoclast differentiation:

- clinical implications for tooth movement and bone density. *J Dent Sci*, 19(3), 1452-1460. DOI: 10.1016/j.jds.2024.03.023
- Huang H, Chang EJ, Ryu JY, et al(2006). Induction of c-Fos and NFATc1 during RANKL-stimulated osteoclast differentiation is mediated by the p38 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 351(1), 99-105. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.10.011
- Jeon HH, Teixeira H, Tsai A(2021). Mechanistic insight into orthodontic tooth movement based on animal studies: a critical review. *J Clin Med*, 10(8), Printed Online. DOI: 10.3390/jcm10081733
- Kim JH, Kim NS(2014). Regulation of NFATc1 in osteoclast differentiation. *J Bone Metab*, 21(4), 233-241. DOI: 10.11005/jbm.2014.21.4.233
- Laroussi M(2020). Cold plasma in medicine and healthcare: the new frontier in low temperature plasma applications. *Front Phys*, 8, Printed Online. DOI: 10.3389/fphy.2020.00074
- Lotinun S, Kiviranta R, Matsubara T, et al(2013). Osteoclast-specific cathepsin K deletion stimulates S1P-dependent bone formation. *J Clin Invest*, 123(2), 666-681. DOI: 10.1172/JCI64840
- Mostafa YA, Weeks-Dybvig M, Osdoby P(1983). Orchestration of tooth movement. *Am J Orthod*, 83(3), 245-250. DOI: 10.1016/0002-9416(83)90088-X
- Nakai Y, Praneetpong N, Ono W, et al(2023). Mechanisms of osteoclastogenesis in orthodontic tooth movement and orthodontically induced tooth root resorption. *J Bone Metab*, 30(4), 297-310. DOI: 10.11005/jbm.2023.30.4.297
- Nupangtha W, Kuensaen C, Sarapirom S, et al(2018). Investigation of cold atmospheric plasma induce apoptosis in cancer cell. *J Phys Conf Ser*, 1144, Printed Online. DOI: 10.1088/1742-6596/1144/1/012025
- Park DR, Kim JH, Kim GM, et al(2020). Osteoclast-associated receptor blockade prevents articular cartilage destruction via chondrocyte apoptosis regulation. *Nat Commun*, 11(1), Printed Online. DOI: 10.1038/s41467-020-18208-y
- Park JH, Lee NK, Lee SY(2017). Current understanding of RANK signaling in osteoclast differentiation and maturation. *Mol Cells*, 40(10), 706-713. DOI: 10.14348/molcells.2017.0225
- Park NS, Yun SE, Lee HY, et al(2022). No-ozone cold plasma can kill oral pathogenic microbes in H₂O₂-dependent and independent manner. *Sci Rep*, 12(1), Printed Online. DOI: 10.1038/s41598-022-11665-z
- Solberg LB, Brorson SH, Stordalen GA, et al(2014). Increased tartrate-resistant acid phosphatase expression in osteoblasts and osteocytes in experimental osteoporosis in rats. *Calcif Tissue Int*, 94(5), 510-521. DOI: 10.1007/s00223-013-9834-3
- Song JM, Park BS, Shin SH, et al(2021). Low-level laser irradiation stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via the MAPK pathway in RAW 264.7 cells. *Appl Sci*, 11(12), Printed Online. DOI: 10.3390/app11125360
- Takeshita S, Kaji K, Kudo A(2000). Identification and characterization of the new osteoclast progenitor with macrophage phenotypes being able to differentiate into mature osteoclasts. *J Bone Miner Res*, 15(8), 1477-1488. DOI: 10.1359/jbmr.2000.15.8.1477
- Udagawa N, Koide M, Nakamura M, et al(2021). Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways. *J Bone Miner Metab*, 39(1), 19-26. DOI: 10.1007/s00774-020-01162-6
- Zhao Q, Wang X, Liu Y, et al(2010). NFATc1: functions in osteoclasts. *Int J Biochem Cell Biol*, 42(5), 576-579. DOI: 10.1016/j.biocel.2009.12.018