creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

[UCI]I804:24011-200000361110

2021년 2월
박사학위논문

5% 불화나트륨을 함유한 고분자 접착필름의 항균효과 및 세포독성

조선대학교 대학원

치 의 학 과

지 명 관

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

5% 불화나트륨을 함유한 고분자 접착필름의 항균효과 및 세포독성

Antibacterial effect and cytotoxicity of polymer adhesive film supplemented with 5% NaF

2021년 2월 25일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

지 명 관

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

5% 불화나트륨을 함유한 고분자 접착필름의 항균효과 및 세포독성

지도교수 이 상 호

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2020년 10월

조선대학교 대학원

치 의 학 과

지 명 관

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

지명관의 박사학위논문을 인준함

위원장 연세대학교 교수 이 제 호 (인)

위 원 조선대학교 교수 이 상 호 (인)

위 원 조선대학교 교수 이 난 영 (인)

위 원 조선대학교 교수 안 상 건 (인)

위 원 조선대학교 교수 유 재 식 (인)

2020년 12월

조선대학교 대학원

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

목 차

영문초록 ····· v

Ⅰ. 서 론 ····· 1

Ⅱ. 연구 재료 및 방법 ····· 3

Ⅲ. 연구 결과 ····· 10

Ⅳ. 총괄 및 고찰 ····· 33

Ⅴ. 결 론 ····· 41

참고문헌 ····· 42

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

표 목 차

Table 1. Gene set enrichment analysis (GSEA) of differentially expressed genes(DEGs) on human gingival fibroblast (HGF) cells in pullulan + NaF-PVA tape ····· 26

Table 2. Gene set enrichment analysis (GSEA) of differentially expressed genes(DEGs) on human periodontal ligament (PDL) cells in pullulan + NaF-PVA tape ····· 27

Table 3. Gene set enrichment analysis (GSEA) of differentially expressed genes(DEGs) on human periodontal ligament (PDL) cells in NaF-PVA tape ····· 28

Table 4. Gene set enrichment analysis (GSEA) of differentially expressed genes(DEGs) on human periodontal ligament (PDL) cells in pullulan + NaF-PVA tape and NaF-PVA tape ····· 29

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

도 목 차

Fig. 1. Illustration of the manufacturing process on polymer adhesive film supplemented NaF. ····· 4

Fig. 2. An agar plate showing zone of inhibition. ····· 10

Fig. 3. SEM images of *S. mutans* biofilm. ····· 12

Fig. 4. CLSM images of *S. mutans* biofilm. ····· 14

Fig. 5. Cell viability evaluated by MTT assay. ····· 16

Fig. 6. Gene caregory chart of human gingival fibroblast (HGF) and periodontal ligament (PDL) cells. ····· 18

Fig. 7. Scatter plots of gene expression. ····· 21

Fig. 8. Gene set enrichment analysis, Venn diagram. ····· 24

Fig. 9. Gene set overlap matrix prepared be gene set enrichiment analysis (GSEA) at human gingival fibroblast (HGF) cells. ····· 30

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Fig. 10. Gene set overlap matrix prepared be gene set enrichiment analysis (GSEA) at human pediodonatal ligament (PDL) cells. ····· 31

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Abstract

Antibacterial effect and cytotoxicity of polymer adhesive film supplemented with 5% NaF

Jih, Myeong-Kwan, D.D.S
Advisor : Prof. Lee, Sang-Ho, D.D.S., Ph.D.
Department of Dentistry
Graduate School of Chosun University

NaF-PVA tape that attaches to teeth by adding fluoride to polymer tape was developed in the Department of Pediatric Dentistry, Chosun University. A NaF-PVA pullulan double adhesive tape, which improved tensile strength and elongation by adding a pullulan to the NaF-PVA adhesive tape, was developed to enhance adhesion to the tooth surface. Previous studies have demonstrated the efficacy of NaF-PVA tape on teeth, but studies on stability and effects on bacteria have been insufficient. In this study, cytotoxicity and antibacterial tests of three groups (group 1: general tape without fluoride; control group, group 2: adhesive tape containing fluoride, group 3: double adhesive tape containing fluoride with pullulan) were conducted.

To investigate the antibacterial effect of the NaF tapes, the agar diffusion technique was performed using *Mitis salrivarius* agar plates. Also, field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) and confocal laser scanning microscopy (CLSM) were performed.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

The cytotoxicity test was performed using human gingival fibroblast (HGF) and human periodontal ligament (PDL) cells. These cells were subjected to the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay by applying an adhesive tape containing fluoride, and genetic analysis of the cells was performed to conduct a stability test in humans.

In the antibacterial test, Group 2 (NaF-PVA tape group) showed the highest zone of inhibition at 48 hours, and this result was significantly higher than that of the control group and group 3 (pullulan + NaF-PVA tape group). In the MTT assay, Group 3 (pullulan + NaF-PVA tape group) had more cytotoxicity than the control group by 66% in PDL and 69% in HGF. Interestingly, even though group 2 (NaF-PVA tape group) had more antibacterial effect against *S. mutans*, it showed less cytotoxicity than group 3 (pullulan + NaF-PVA tape group) by 29% in PDL and 33% in HGF. A value that can support the results of the MTT test was also derived in a biostability experiment through genetic analysis.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅰ. 서 론

현대 치의학은 예방적 치의학이 중심이라고 할 수 있다. 이중 가장 대표적인 것은 재광화를 통해 비와동성 병소를 비침습적으로 관리하는 것이며 이를 위한 탈회와 재광화의 밸런스 조절은 치아우식증 예방의 핵심으로 여겨지고 있다[1,2]. 이를 실현할 수 있는 성분 중 가장 대표적인 물질은 불소이다.

불소가 우식을 예방하는데 중요한 역할을 한다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다. 1943년 최초로 소개된 전문가 불소도포 방법으로 시작된 불소용액 도포는 불소 젤 사용을 지나 현재는 불소바니쉬가 가장 널리 사용되고 있다[3]. 미국에서 1994년도에 FDA 승인을 얻으면서 시판되기 시작한 불소바니쉬는 현재 전문가가 시행할 수 있는 가장 대중적인 예방적 불소치료 방법이 되었다[4,5]. 하지만 현재 시판되고 있는 대부분의 불소바니쉬의 주된 성분은 송진이기 때문에 도포시 치아에 일시적으로 착색이 발생하며 좋지 않은 맛과 질감으로 인하여 일부 어린이들에게 거부감을 주는 문제점을 갖고 있다. 또한 불소바니쉬는 타액에 의해 쉽게 제거되는 단점과 함께 지속적인 불소 유리가 되지 않는다는 문제점이 있다.

이상적인 불소전달 시스템을 생각한다면 일반인들이 쉽게 적용 가능하여 효율적이고 생체안정적이며 비용이 저렴한 부가적인 장점 이외에도 지속적이고 안정적으로 불소를 치질에 계속 공급할 수 있는 것이 중요하다. 이에 본 교실에서는 새로운 불소 전달 시스템의 일환으로, 고분자를 기반으로 한 기저재에 나노 코팅 기술을 이용하여 불소를 결합시킨 NaF-PVA tape을 개발하였다[6].

불소를 함유한 접착필름은 다른 불소제제들과 비교하여 다음과 같은 장점이 있다. 우선 불소함유량이 다른 불소제제들보다 적다. 불소바니쉬와 비교해보면 대략 1/3의 불소만을 함유하고 있다[7]. 이는 불소의 인체 내 위해성의 걱정을 덜어줄 수 있다. 이에 더해 적용이 간단하여 치과의사가 아닌 일반인이 사용하기에도 쉽다[6].

하지만 기존 접착필름형 불소제제의 법랑질 재광화 효과 및 탈회 억제 효과는 기

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

존의 NaF 바니쉬를 능가하지 못한다고 보고되고 있다[7-10]. 그 이유는 접착필름형 불소제제가 치아에 접착시 유지력에 한계가 있어 잘 탈락하는 현상을 보이기 때문으로 알려져 있다[7,11]. 오랜 시간동안 서서히 불소가 유리됨으로써 구내에서 불소 농도를 장기간 유지해주는 것이 가장 큰 목적중 하나이기에 이는 큰 단점으로 지적되었다.

풀루란(pullulan)은 식품의 점착성 및 점도를 증가시키고 물성 및 촉감을 향상시키는 식품 첨가물이다. 풀루란은 필름 형성 능력이 우수하여 가식성 필름에 사용된다[12,13]. 이러한 재료의 특성을 이용하여 기존 접착필름형 불소제제보다 접착 능력이 향상된 플루란을 첨가시킨 이중(double layer) 접착 필름이 제작되었다.

이전 연구에서 불소함유 접착필름은 소 치아를 대상으로 한 법랑질 재광화 in vitro 실험에서 불소바니쉬와 비슷한 효과를 보여주었다[8]. 그리고 법랑질 탈회에 대한 저항 효과와 탈감작 효과에 대한 연구들은 불소함유 접착필름의 불소바니쉬 대체제로서의 가능성을 보여주었다[7,11,14].

이 연구에서 우리는 주된 우식 유발 세균인 S. mutans를 이용한 항세균 실험을 시행하여 불소함유 접착필름의 불소 제제로서의 효능을 입증시키고자 하였다. 그리고 불소함유 접착필름의 과거 연구들은 불소제제로서의 효능에 집중하여 인체 안정성이 입증되지 않았다는 한계점이 있었다. 불소함유 접착필름의 특성상 치은에 접촉할 수 있는 가능성 그리고 치근의 치주인대와 접촉할 수 있는 가능성을 고려하여 human gingval fibroblast (HGF)와 human periodontal ligament (PDL)세포들의 세포독성검사를 시행하였다. 불소함유 접착필름이 적용된 이 세포들의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 시험을 시행하고 세포들의 유전자 분석을 시행하여 인체에 대한 안정성 실험을 수행하였다.

이 연구를 통하여 일반 불소함유 접착필름과 플루란이 첨가된 이중 접착 불소 필름의 항균 효과와 세포독성에 관해 보고하고자 한다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅱ. 연구 재료 및 방법

1. 연구 재료

1) NaF-PVA tape의 제작

전반적인 NaF-PVA tape의 제작은 이전 연구에서와 동일하게 수행하였다[7]. Poly vinyl alcohol 10 g과 polyacrylic acid 5 g을 증류수 85 g에 용해시킨 후 85℃에서 2시간 동안 교반하였다. 이후 polyethylene glycol (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) 3 ml를 가소제(plasticizer)로 사용하고 NaF 0.95 g을 순차적으로 첨가 후 동일한 교반과정을 거친다. 가교화 과정을 마친 용액을 유리판에 표면을 고르게 하여 부은 후 어플리케이터(applicator)를 이용해 두께가 80 μm가 되게 균일하게 만들고 건조시키는 과정을 통하여 필름을 제작하였다(Fig. 1A).

2) 이중 접착 tape의 제작

풀루란 분말(Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) 10wt%에 가소제인 polyethylene glyocol (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) 2wt%를 추가하고 2시간 동안 교반하였다. 이렇게 제조된 풀루란 접착필름 용액을 건조된 40 μm 두께의 PVA 접착 필름 위에 상기 방법으로 일정량 도포한 뒤 어플리케이터를 이용하여 40 μm 두께로 밀어 총 두께가 80 μm가 되게 하였다. 이를 40℃로 24시간 동안 건조하여 필름의 수분을 완전히 제거하였다(Fig. 1B).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3) 실험 재료 군(group)

(1) 대조군 : 불소를 결합시키지 않은 PVA 필름

(2) NaF-PVA tape군: 나노 기술을 이용하여 기저재에 5% 불화나트륨을 PVA에 결합시킨 필름

(3) Pullulan + NaF-PVA tape군 : NaF-PVA 접착필름에 풀루란을 첨가한 이중(double layer) 필름

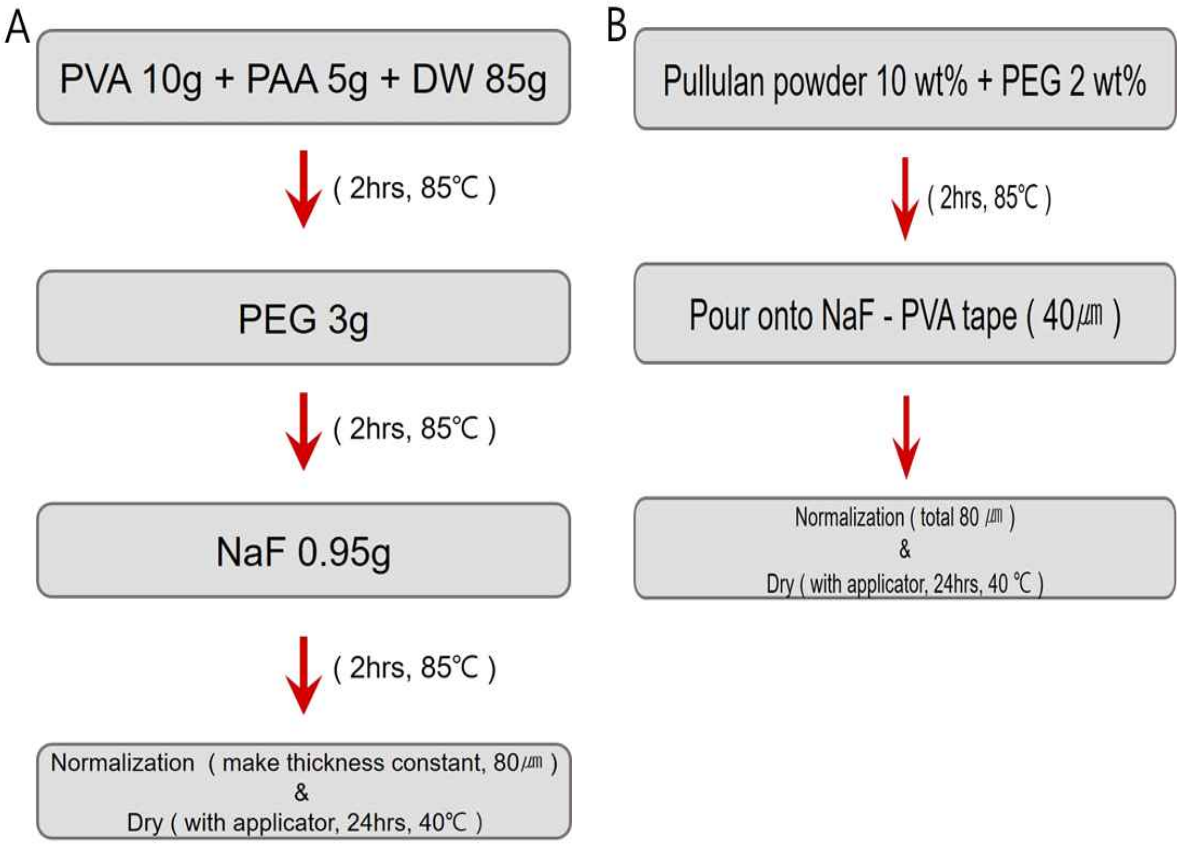


Fig. 1. Illustration of the manufacturing process on polymer adhesive film supplemented NaF. A: NaF-PVA tape, B: Pullulan + NaF-PVA tape (double layer)

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. Bacteria culture and biofilm formation conditions

S. mutans UA159를 37℃ Brain heart infusion (BHI; Difco Labratories, Detroit, MI) 배지에서 배양하였다. Biofilm을 형성하기 위해 시편을 인공 타액 1 ml가 들어 있는 24-well plate (SPL. Daejeon, Korea)에 1시간 동안 놓고 필름을 시편 위에 위치시켰다. 이 후 1% sucrose가 첨가된 1 ml BHI (BHIS)에 필름으로 덮인 시편이 있는 24-well plate에 *S. mutans* (1 x 10^6CFU/ml)를 옮기고 37℃에서 48시간 동안 배양하였다. 배지는 하루에 한번씩 교체해주었다.

3. Agar diffusion test

불소함유 접착필름의 항균 효과를 조사하기 위해 mitis salrivarius agar plate (MS agar: MB cell, Seoul, Korea)를 사용하여 한천 배지 확산 시험을 하였다. *S. mutans* (1 x 10^8CFU/ml)를 MS agar plate에 접종하고 불소함유 접착필름을 plate 위에 놓고 부드럽게 눌러주었다. Plate를 37℃에서 배양하였고 이미지 J를 사용하여 24, 48 및 72시간 이후 생장 저해 구역(zone of inhibition)을 확인하였다.

4. Field emission scanning electron microscope (FE-SEM)

48시간 동안 BHIS의 표본에 형성된 biofilm은 이전의 연구들의 실험방법에서 조금의 변형을 거쳐 수행하였다[15]. 요약하자면, 표본을 2.5% glutaraldehyde / 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)가 첨가된 PBS가 담긴 24-well plate에 위치시킨 후 4℃에서 하룻밤 동안 보관하였다. 표본들을 PBS로 두

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

번 세척 한 후 단계별로 에탄올(25-100%)을 사용하여 탈수하였다. 표본들을 건조하고, 금코팅 하여 field emission scanning electron microscope (FE-SEM, Hitachi, Tokyo, Japan)을 사용하여 관찰하였다.

5. Confocal laser scanning microscopy (CLSM)

시편에 형성된 *S. mutans* biofilm의 변화는 이전 연구의 방법대로 CLSM 이미지를 이용하여 분석하였다[16]. *S. mutans* (1 x 10^6CFU/ml)를 1μM의 Alexa Fluor 647-labeled dextran 접합체(Molecular Probes, Eugene, OR)가 첨가된 BHIS 배지가 있는 24-well plate에서 37℃에서 48시간 동안 배양하였다. 시편의 *S. mutans*를 2.5μM SYTO 9 녹색 형광 핵산 염색(480/500 nm; Molecular Probes)으로 30분 동안 실온에서 처리하였다. LSM 510 META 현미경(Carl Zeiss, Jena, Germany)을 사용하여 biofilm 실험 당 6개의 이미지 스택(512 x 512 pixel tagged image file format)을 얻었다. COMSTAT (www.comstat.dk; Technical University of Denmark, Kongens Lyngby, Denmark)를 사용하여 세균 및 extracellular polymeric substances (EPS)의 bio-volumes을 정량화하였다.

6. MTT assay

구강 세포에 대한 불소함유 접착필름의 세포 독성을 평가하기 위해 이전 연구 방법대로 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 분석을 사용하여 세포 생존력을 관찰하였다[17]. 5 mg/ml의 MTT를 멸균 PBS에 용해시켜 MTT 저장 용액을 준비하였다. 1 ml의 MTT 저장 용액과 9 ml의 멸균 된

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

PBS를 혼합하여 신선한 MTT 용액을 제조하였다. HGF 및 PDL 세포들 ($1x10^4$/well)을 각각 12-well plate에 seeded 하였고 CO_2 배양기에서 48시간 동안 37℃에서 배양하였다. 불소함유 접착필름을 plate에서 제거하고 200 ml MTT 용액을 처리하고 추가로 2시간 동안 배양하였다. 200 ml의 Dimethyl sulfoxide (DMSO, Amresco, solon, OH, USA)를 첨가하였다. 그리고 용액을 96-wall plate로 옮겨 Microtiter 판독기(SPECTROstar Nano, BMG Labtech, Ortenberg, Germany)를 사용하여 540nm에서 관찰하였다.

7. RNA sequencing

구강 세포의 유전자 발현에 대한 불소함유 접착필름의 효과를 조사하기 위해 HGF 및 PDL 세포들의 RNA sequencing을 수행하였다. HGF 및 PDL 세포들 ($1x10^4$/well)을 12-well plate에 seeding 하고 CO_2 배양기에서 48시간 동안 37℃에서 배양하였다. 세포들은 5시간 동안 접착필름들과 접촉하였다. 그 이후 필름들과 배지를 제거하고 Plate를 멸균 PBS로 2회 세척하였다. 제조업체의 지시에 따라 RNeasy Plus Mini kit (QIAGEN, Germany)를 사용하여 RNA를 준비한다음 RNA sequencing을 수행하였다(EBIOGEN, Seoul, Korea).

HGF 및 PDL 세포들에서 추출된 mRNA의 퀄리티(quality)를 ND-2000 Spectrophotometer (Thermo Inc., DE, USA)를 이용하여 검사한 후에 QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit (Lexogen, Inc., Austria)로 cDNA를 합성하여 클로닝 과정을 거쳐 라이브러리를 만들었다. 이 후 Nextseq500 (Illumina, Inc., USA)을 사용하여 대용량 sequencing을 진행하여 read라고 불리우는 sequencing 데이터를 생성하였다. 트리밍 과정을 거쳐서 인간유전자 서열을 레퍼런스로 삼아 read를 레퍼런스 서열에 붙이는 mapping 과정을 거쳤다. 실험에 따라서 mapping 과정에서

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

만들어진 read가 다를 수 있고 유전자들마다 길이가 달라 mapping 되는 정도가 다르기 때문에 EdgeR를 사용하여 보정과정인 noramalization을 거쳐 결과 값을 도출하였다.

8. Differential gene expression analysis

mRNA-Seq read는 Bowtie2 (Langmead and Salzberg,2012)를 사용하여 정렬하였다[18]. Bowtie2 지수를 게놈 조립 서열 또는 대표 전사 서열에서 생성하였다. 유전자의 차등 발현 여부를 감지하기 위해서 정렬된 파일(alignment file)을 사용하였다. Differentially expressed gene(DEG)s을 Bedtools (Quinlan AR,2010)을 이용하여 추출하였다[19]. 유전자 분류는 DAVID (http://david.abcc.ncifcrf.gov/)와 Medline databases (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)에 의한 검색을 기반으로 하였다.

(1) Gene ontology analysis

HGF와 PDL 세포들을 Gene ontology (GO) 형태로 분석하였다. 대조군 대비 불소함유 접착제제들에서 유전자의 발현이 2배 이상 증가되거나 감소하고 Normalized Data (log2)값이 4 이상이며 p-value 값이 0.05 이하인 유전자들을 필터링하였다.

(2) Gene set enrichment analysis (GSEA)

Gene set enrichment analysis (GSEA)는 온라인 GSEA 4.0.0. 프로그램 (http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp)을 사용하여 Hallmark key pathway를 찾았다[20]. Hallmark gene sets 중 false discovery rate (FDR)

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

q-value 값이 0.05 미만값을 기준으로 하였다[21].

HGF와 PDL 세포들의 3개의 군(control, pullulan + NaF-PVA tape, NaF-PVA tape)의 DEGs를 비교하였다. 공통으로 발현이 증가 또는 감소한 유전자들과 반대되는 결과를 보여주는 유전자들을 찾아 GSEA를 시행하였다.

9. Statistical analysis

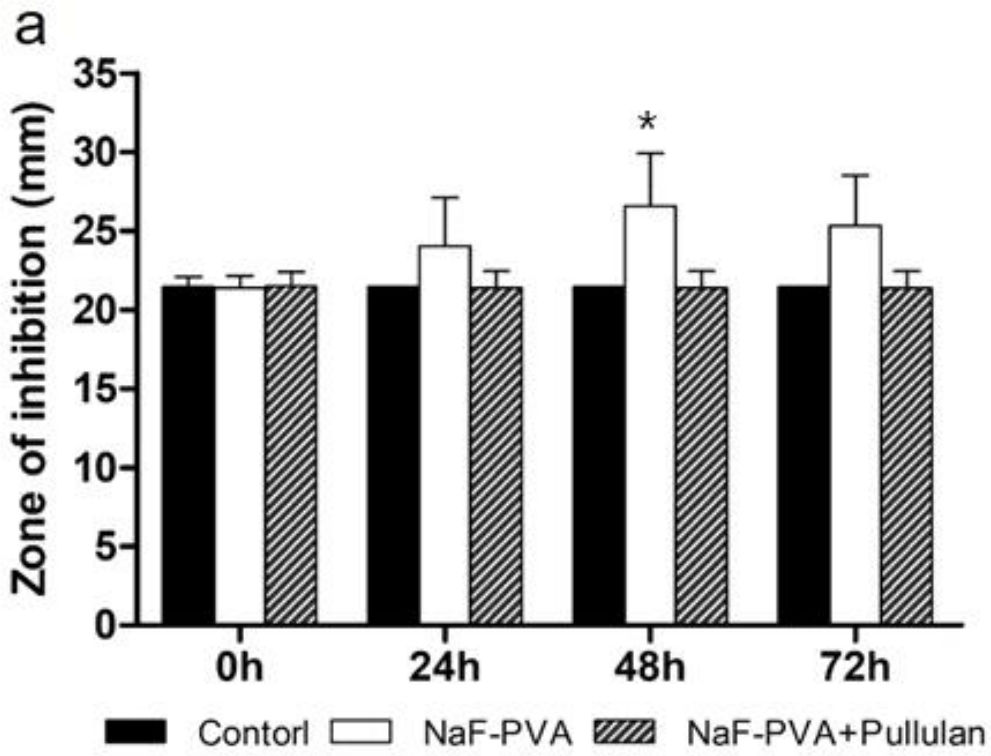
통계분석은 SPSS 소프트웨어(Version 20.0; SPSS Inc, Chicago, IL)를 이용하였다. DEGs analysis를 제외한 모든 변수에 관한 자료는 One-way analysis of variance(ANOVA)에 이어 Tukey's test를 사용하여 분석되었다. p값이 0.05 미만인 것을 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

III. 연구 결과

1. Agar diffusion test

한천 확산 분석을 수행하여 pullulan + NaF-PVA tape군 또는 NaF-PVA tape군의 *S. mutans*에 대한 항균 활성을 조사하였다. 대조군은 *S. mutans*에 대한 억제 활성을 나타내지 않았으며 24시간 이후 부터는 세균으로 덮였다. Pullulan + NaF-PVA tape군이 72시간까지 생장 저해 구역이 없었던 반면 NaF-PVA tape군은 48시간 후 가장 높은 생장 저해 구역을 보였고 72시간에 감소하였다. NaF-PVA tape은 생장 저해 구역의 직경이 pullulan + NaF-PVA tape에 비해 *S. mutans*에 대해서 더 높은 항균 효과를 보여주었다($p<0.05$).



조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

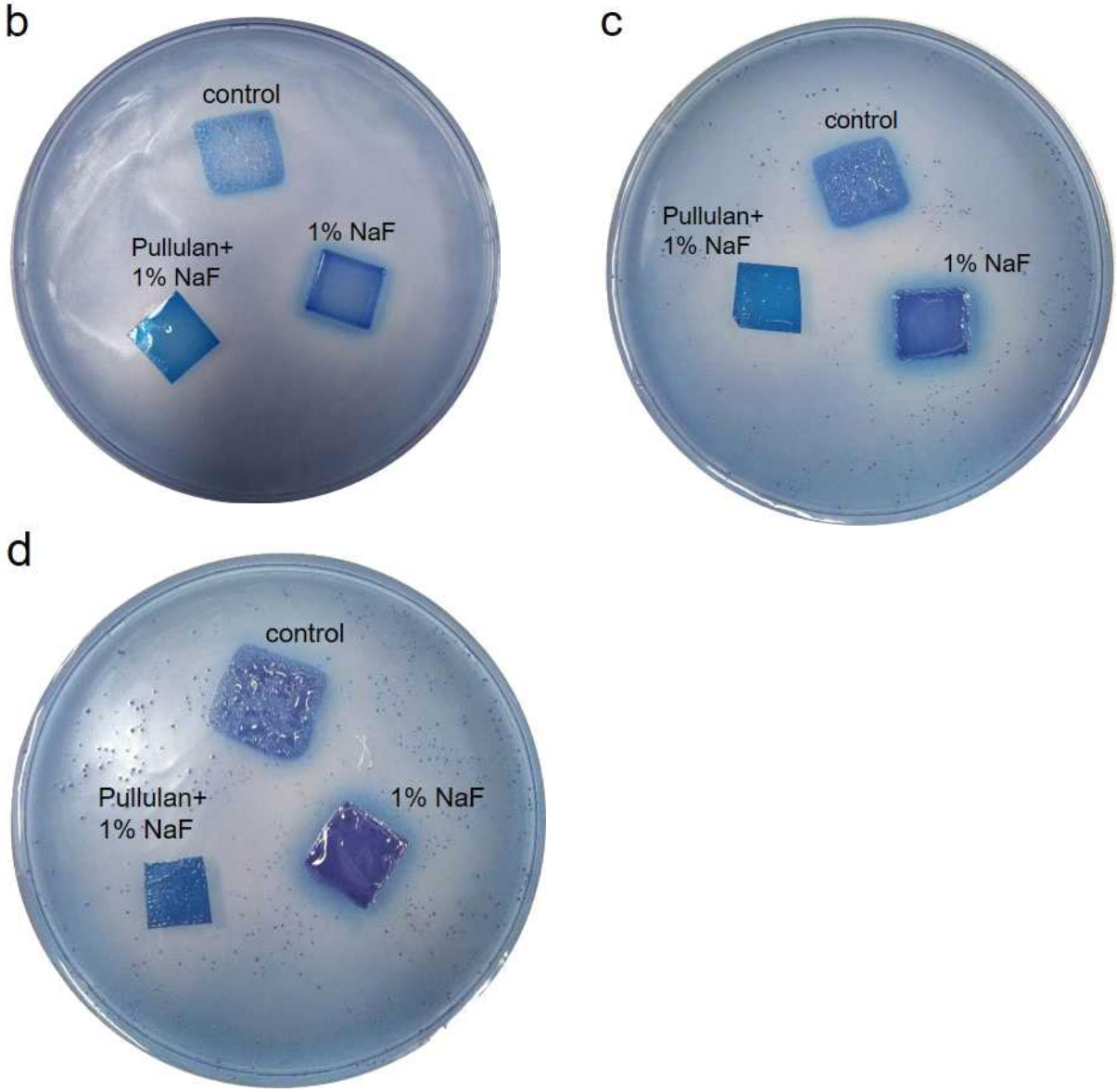
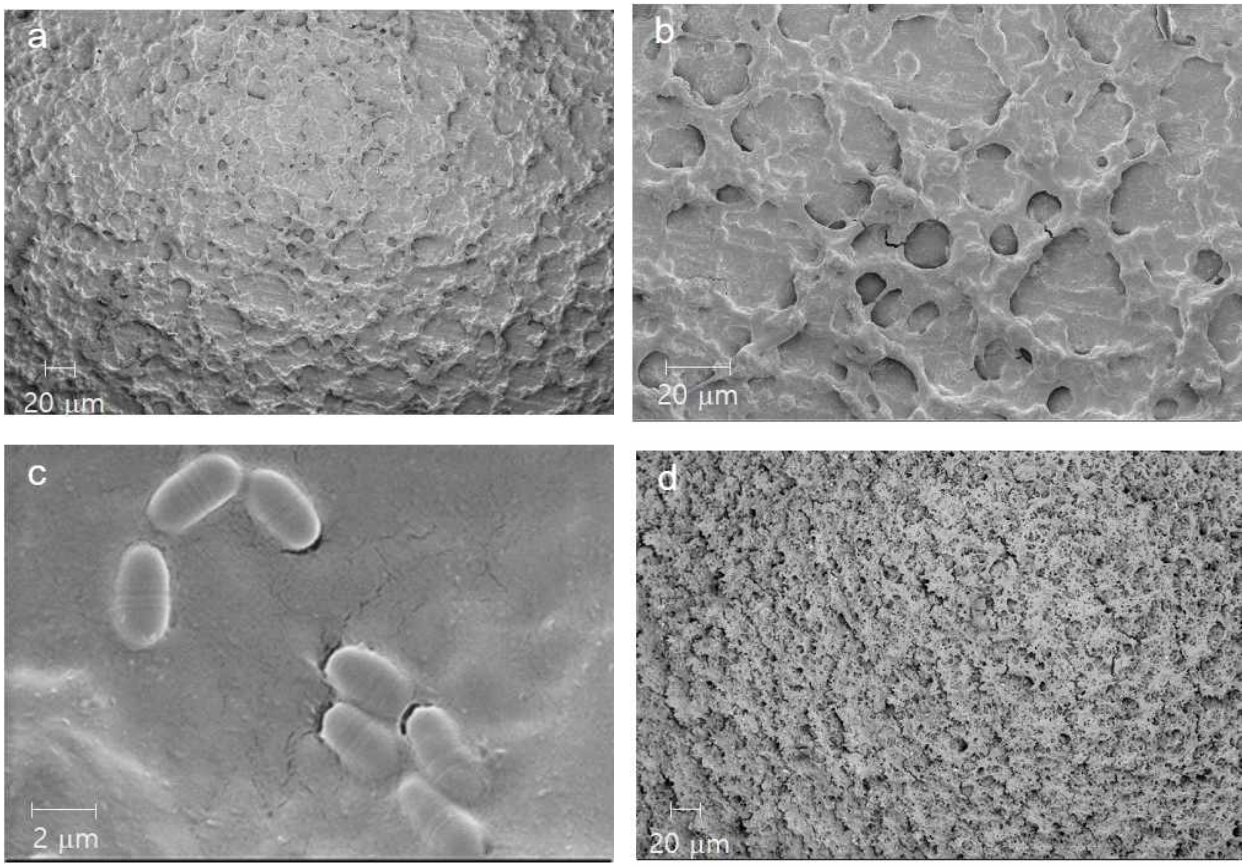


Fig. 2. a. Bar graph and b. 24 h, c. 48 h, and d, 72 h of an agar plate showing zone of inhibition. The antibacterial effect of pullulan + NAF-PVA tape and NaF-PVA tape against *S. mutans* was determined using agar diffusion assay. Data represent the mean and standard deviation of 3 independent experiments. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test (*: $p<0.05$).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. FE-SEM analysis

불소함유 접착필름이 *S. mutans* biofilm을 억제하는 효과를 FE-SEM으로 분석하였다. 그림 3에서 볼 수 있듯이 대조군의 접착필름으로 덮인 시편에 형성된 biofilm은 pullulan + NaF-PVA tape군 및 NaF-PVA tape군에 비해 더 촘촘하고 두꺼운 모습을 보여주었다. *S. mutans*는 NaF-PVA tape군에서 더 많은 다공성과 느슨한 biofilm을 형성하였다. NaF-PVA tape군에서 자란 박테리아는 pullulan + NaF-PVA tape군에서 자란 박테리아보다 biofilm에 덜 묻혔다.



조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

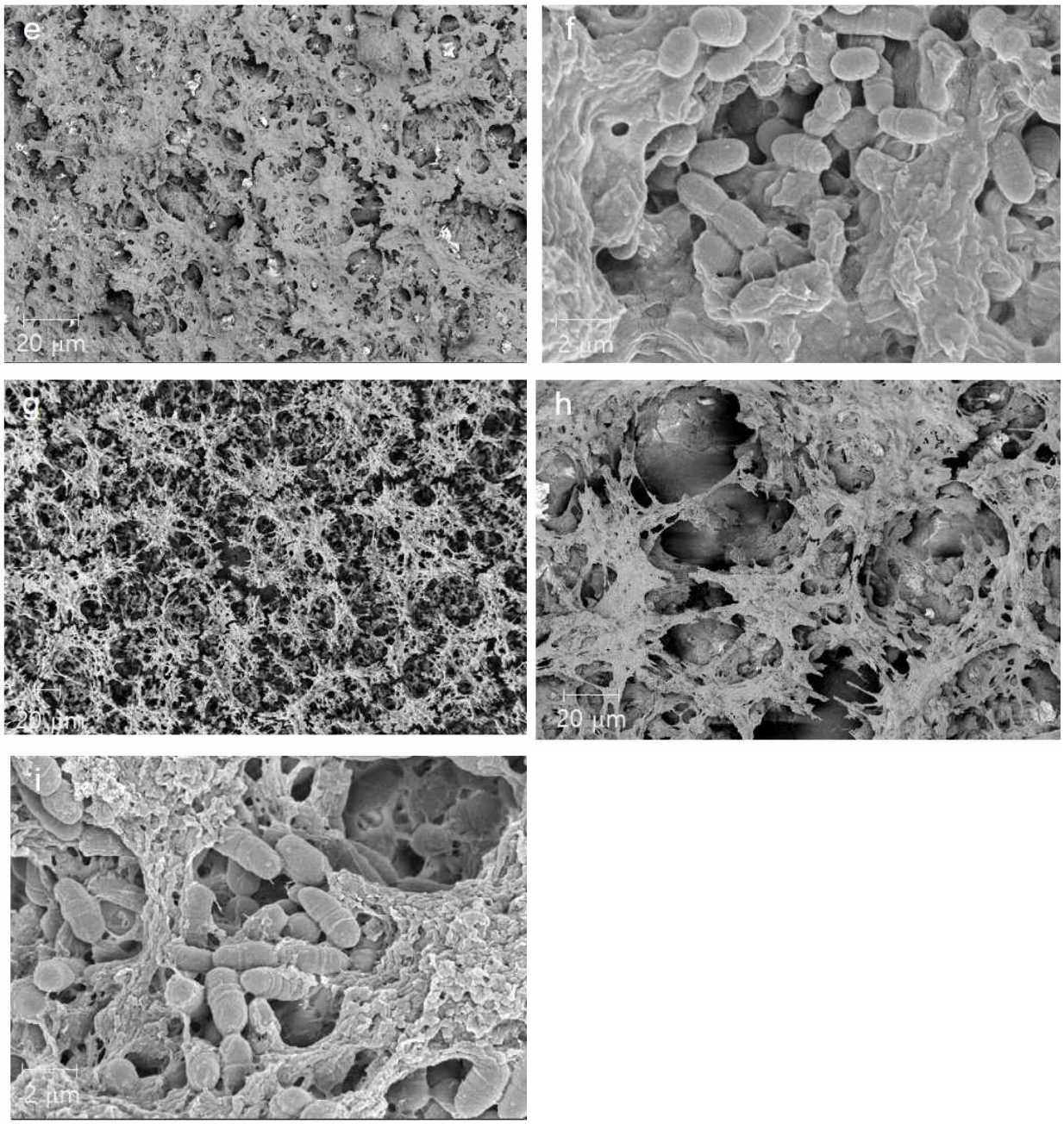


Fig. 3. SEM images of *S. mutans* biofilm.

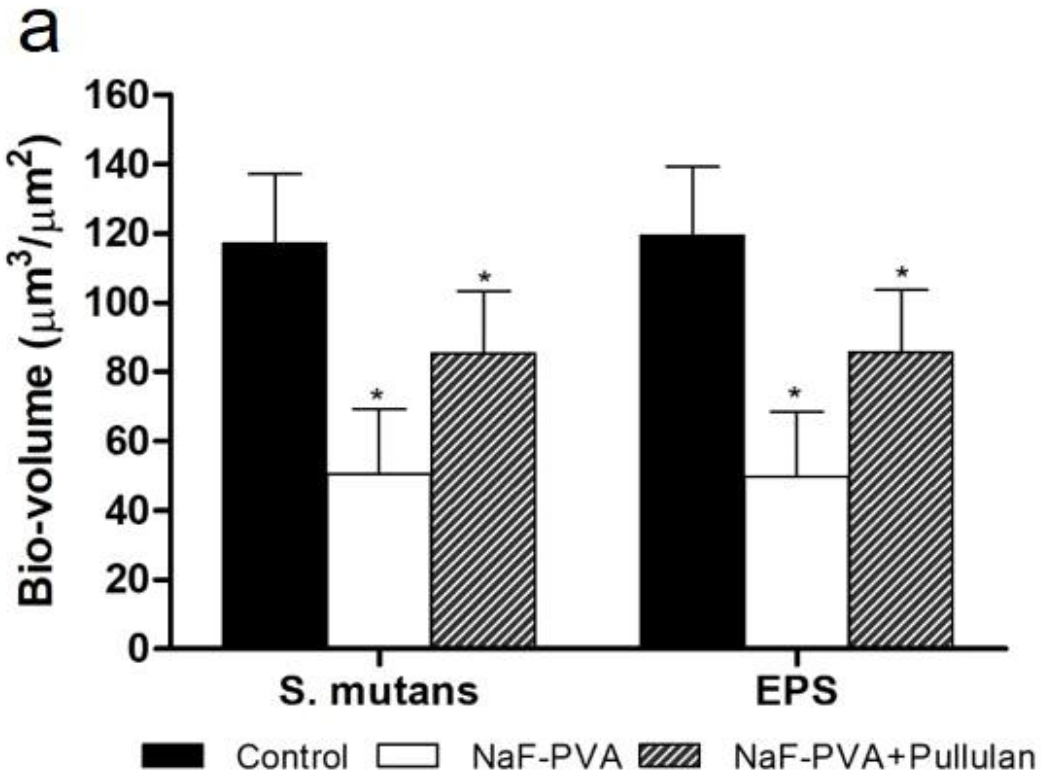
S. mutans biofilm were formed on the specimens covered with tapes containing no NaF(control-a, b, and c), Pullulan + NaF-PVA(d, e, and f), and NaF-PVA(g, h, and i) for 48 h in BHIS media.

The magnification of the images was 300 X (a, d, and g), 1.00 K X (b, e, and h), and 50.00 K X (c, f, and i).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3. CLSM image analysis

CLSM의 이미지는 COMSTAT를 사용하여 분석되었다. 그 결과 pullulan + NaF-PVA tape군은 대조군에 비해 박테리아와 EPS의 생체 부피가 현저히 작다는 것을 보여주었다(p <0.01). NaF-PVA tape군은 pulluan + NaF-PVA taep군보다도 *S. mutans*에 유의하게 더 높은 항균 효과를 보여주었다(p <0.05).



조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

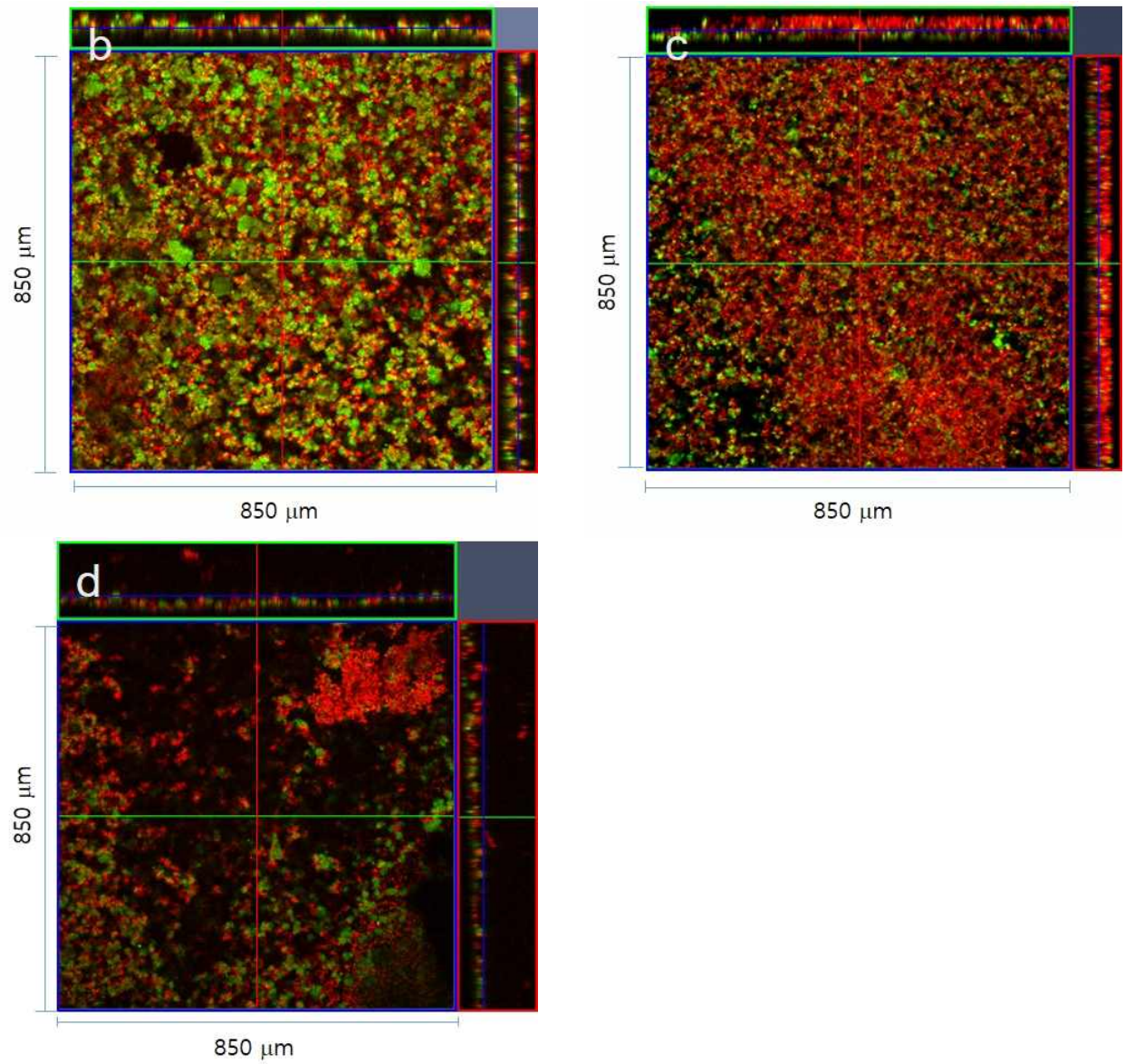


Fig. 4. CLSM images of *S. mutans* biofilm.

a. Bio-volume of bacteria and EPS and confocal images of *S. mutans*biofilms formed on b. Control, c. Pullulan + NaF-PVA, and d. NaF-PVA tapes. Bacteria bio-volume was analyzed using COMSAT software.

Data represent the mean and standard deviation of 3 independent experiments. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test (*: $p<0.05$).

EPS: extracellular polymeric substances.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

4. MTT assay

Pullulan + NaF-PVA tape군 및 NaF-PVA tape군이 구강 세포 라인들 중 HGF 및 PDL 세포들에 미치는 영향을 MTT assay를 사용하여 분석하였다. Pullulan + NaF-PVA tape군은 각각 PDL 세포에서 70%, HGF 세포에서 64% 대조군보다 세포 독성이 더 높았다. 흥미롭게도 pullulan + NaF-PVA tape군은 NaF-PVA군보다 *S. mutans*에서 더 낮은 항균 능력을 보였음에도 불구하고 더 높은 세포 독성(PDL cell: 37% HGF cell: 40%)을 보여주었다.

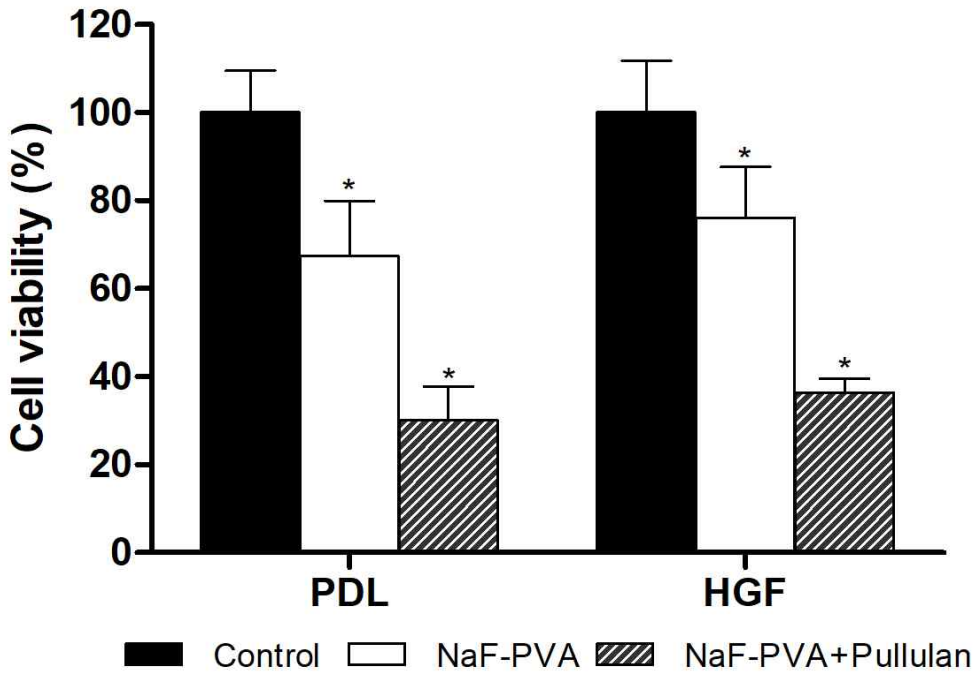


Fig. 5. Cell viability evaluated by MTT assay.

Cytotoxicity of control, NaF-PVA tape, pullulan + NaF-PVA tape was investigated in human PDL and HGF cell lines. Data represent the mean and standard deviation of 3 independent experiments.

One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test (*: $p<0.05$)

PDL: periodontal ligament, HGF: human gingival fibroblast.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

5. Differential gene expression analysis

(1) Gene ontology analysis

① Human gingval fibroblast (HGF) cells

HGF 세포들의 유전자 분석에서 pullulan + NaF-PVA tape군과 NaF-PVA tape군 모두에서 Aging, Apoptotic process, Cell death, Cell migration, DNA repair, Immune response, Neurogenesis, Secretion GO의 유전자 발현 변화가 관찰되었다(Fig. 6).

Cell death GO에서 pullulan + NaF-PVA tape군은 총 893개의 연관 유전자 중에서 GADD45A, GADD45B, PPP1R15A(=GADD34) 이렇게 3개의 유전자에서 발현이 유의하게 증가하였다($p<0.05$)(Fig. 7).

NaF-PVA tape군은 pullulan + NaF-PVA tape군보다 발현이 유의하게 감소한 유전자들이 더 많았다(Fig. 6). 같은 기준으로 처리한 결과 총 893개의 유전자에서 발현이 유의하게 증가된 유전자는 MLKL, NSG1 이었고, 감소된 유전자가 4개(DFFB, CASP9, CASP8, MYD88) 검출되었다.

HGF 세포들의 3개의 그룹의 DEGs를 비교한 결과 공통으로 발현이 증가한 유전자의 수는 10개 였고, 발현이 감소한 유전자의 수는 12개로 총 22개의 유전자들의 발현 변화가 관찰되었다. 대조군과 비교한 불소함유 접착필름들간의 발현이 서로 반대되는 유전자는 없었다(Fig. 8).

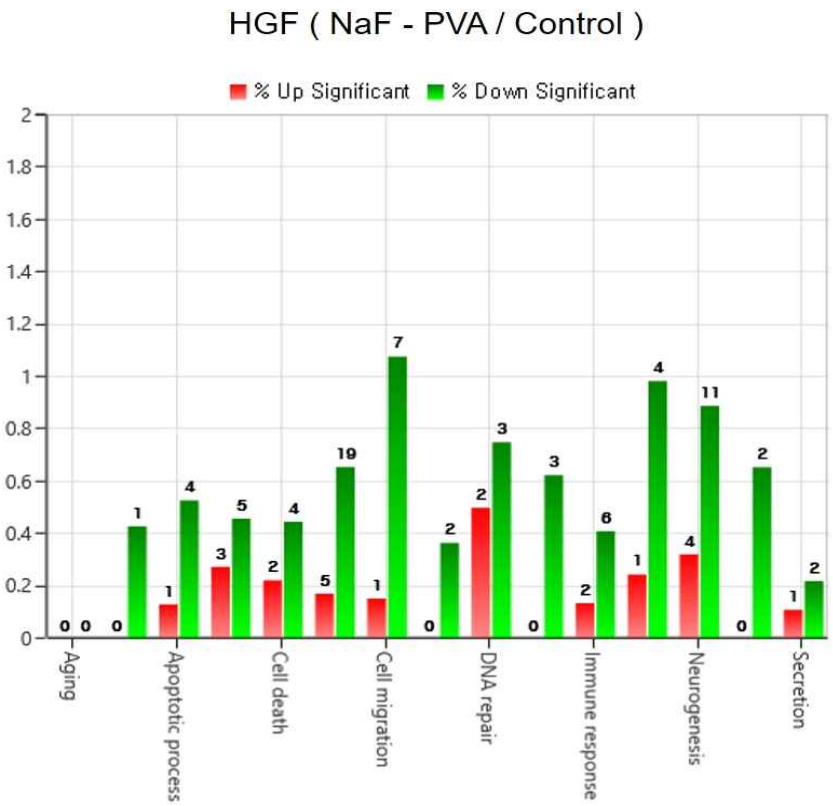
② Human periodontal ligament (PDL) cells

HGF 세포들과 같은 방법으로 PDL 세포들의 분석을 시행하였다. PDL 세포에서 pullulan + NaF-PVA tape을 DEGs 분석한 결과 이전 HGF 세포보다 더 많은 숫자의 유전자들에의 발현의 변화가 관찰되었다. GO에서의 유전자의 변화를 살펴보면 cell death GO와 연관된 총 893개의 유전자 중에서 과발현된 유전자가 34개, 저

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

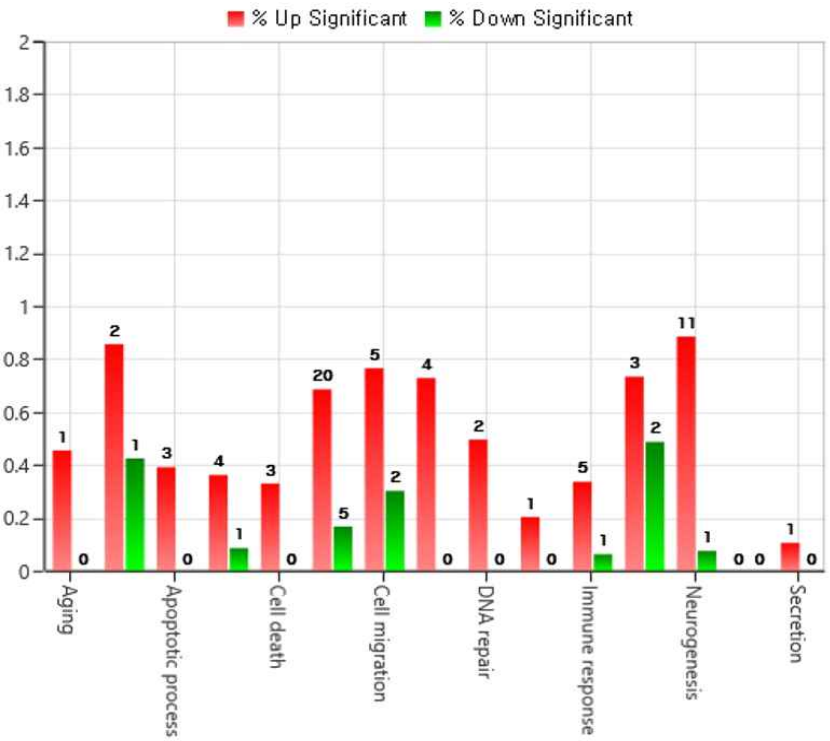
발현된 유전자가 27개였다. NaF-PVA tape을 DEG 분석한 결과 또한 과발현된 유전자가 33개, 저발현된 유전자가 15개로 이전 HGF 세포들보다 더 많은 유전자들에서 변이가 발생하였다. 하지만 pullulan + NaF-PVA tape에 비해서는 더 작은 숫자의 유전자들이 변이된 것으로 나타났다(Fig. 6,7).

PDL 세포들의 3개의 그룹의 DEGs를 비교한 결과 공통으로 발현이 증가한 유전자의 수는 177개 였고, 발현이 감소한 유전자의 수는 140개로 총 317개의 유전자들이 같은 양상의 발현 변화를 보여주었다. HGF 세포들과 달리 대조군과 비교한 불소함유 접착필름들간의 발현이 서로 반대되는 유전자가 33개 존재하였다(Fig. 8).

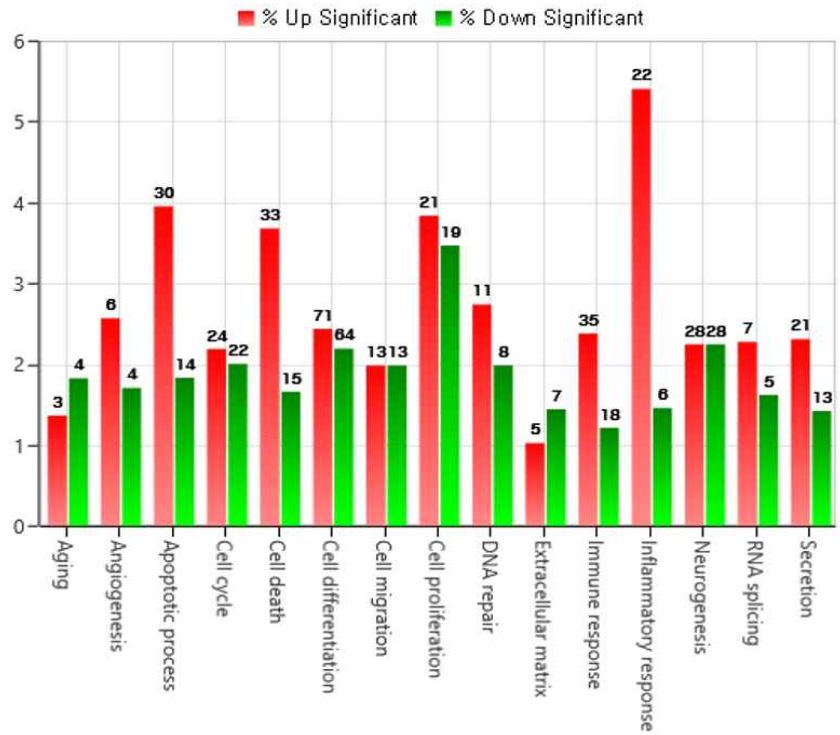


조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

HGF (pullulan + NaF - PVA / Control)



PDL (NaF - PVA / Control)



조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

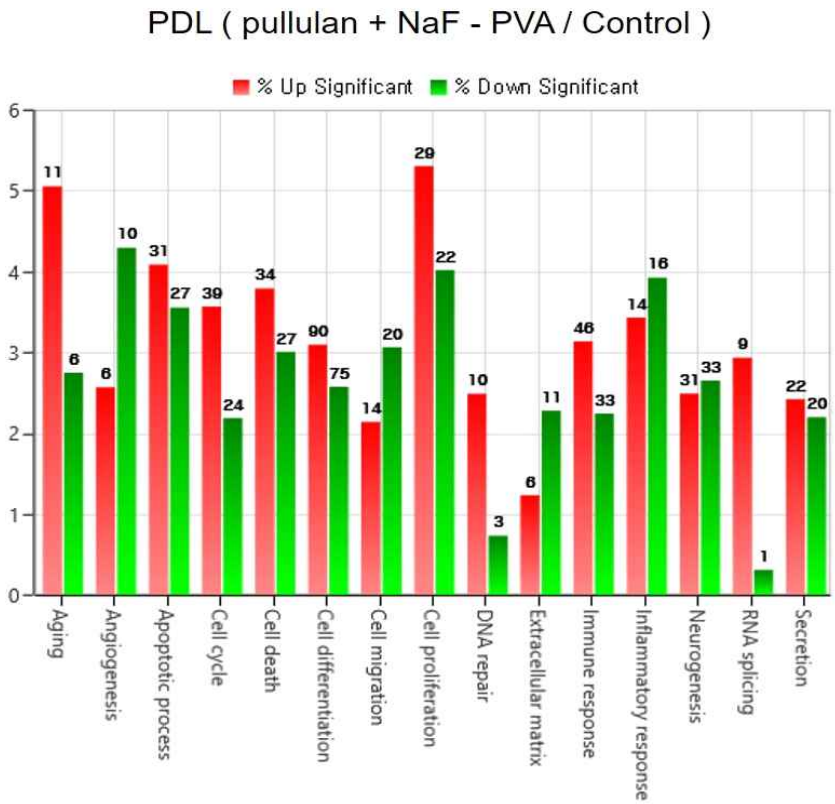
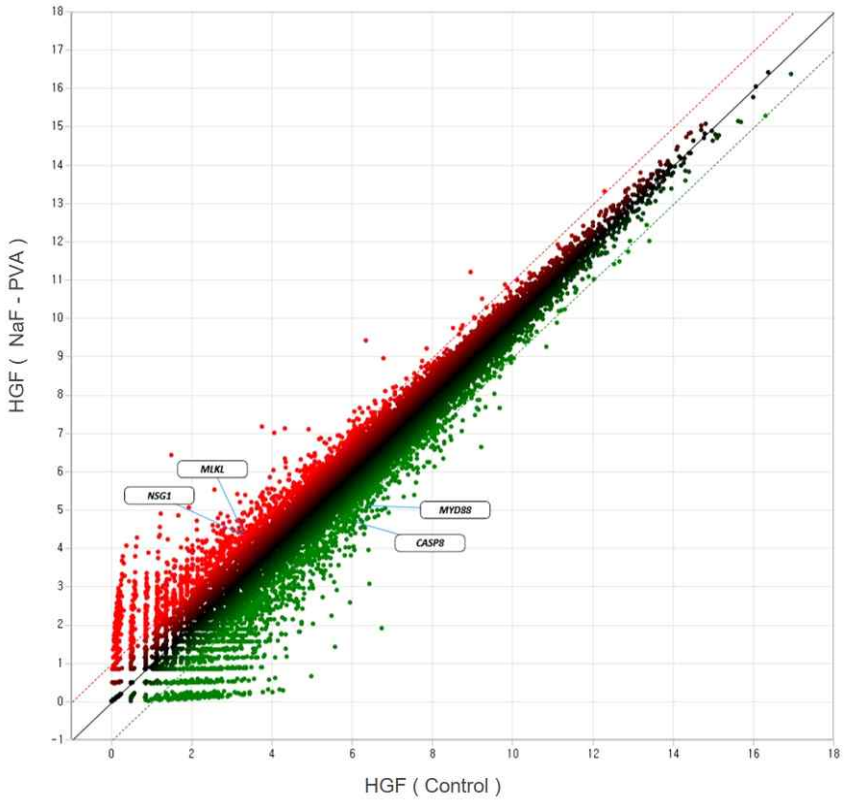


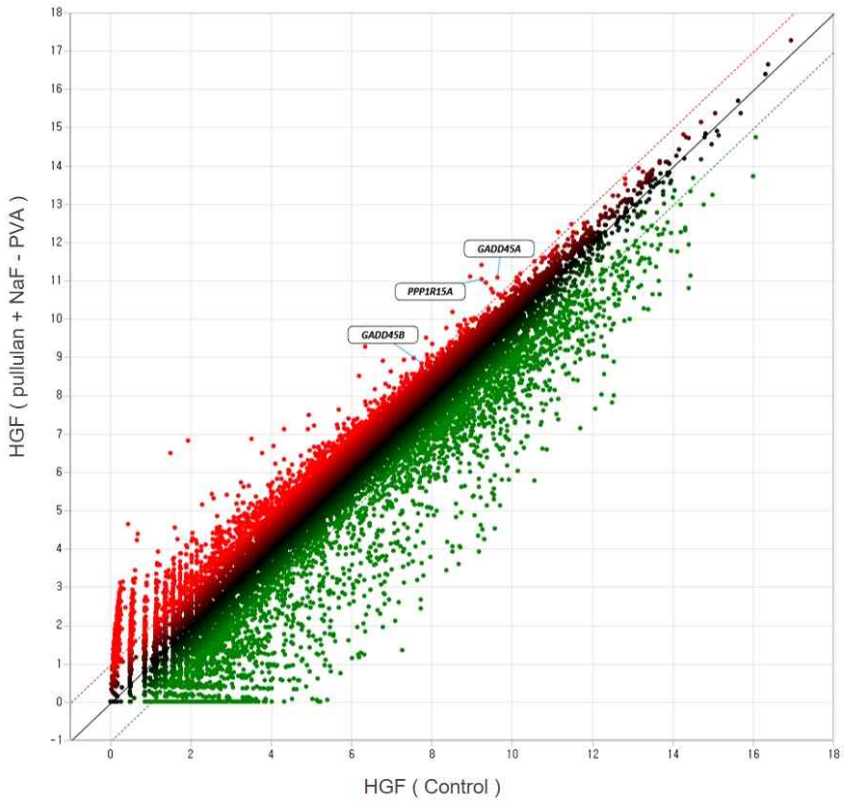
Fig. 6. Gene caregory chart of human gingival fibroblast (HGF) and periodontal ligament (PDL) cells. Overview of differentially expressed genes(DEGs) at pullulan + NaF-PVA tape and NaF-PVA tape as compared to the control.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

HGF (NaF - PVA / Control)

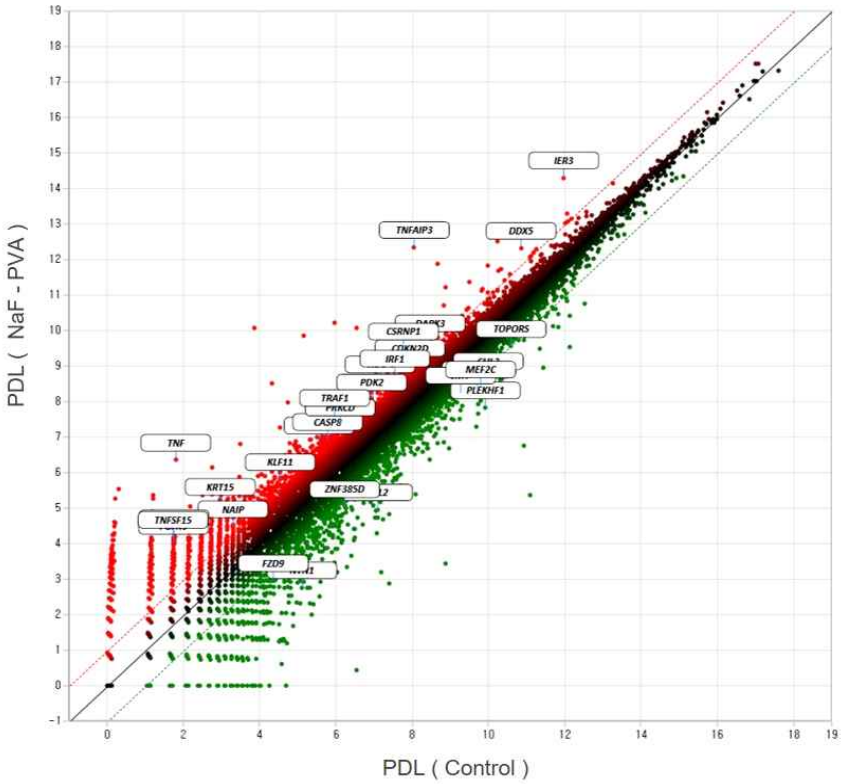


HGF (pullulan + NaF - PVA / Control)

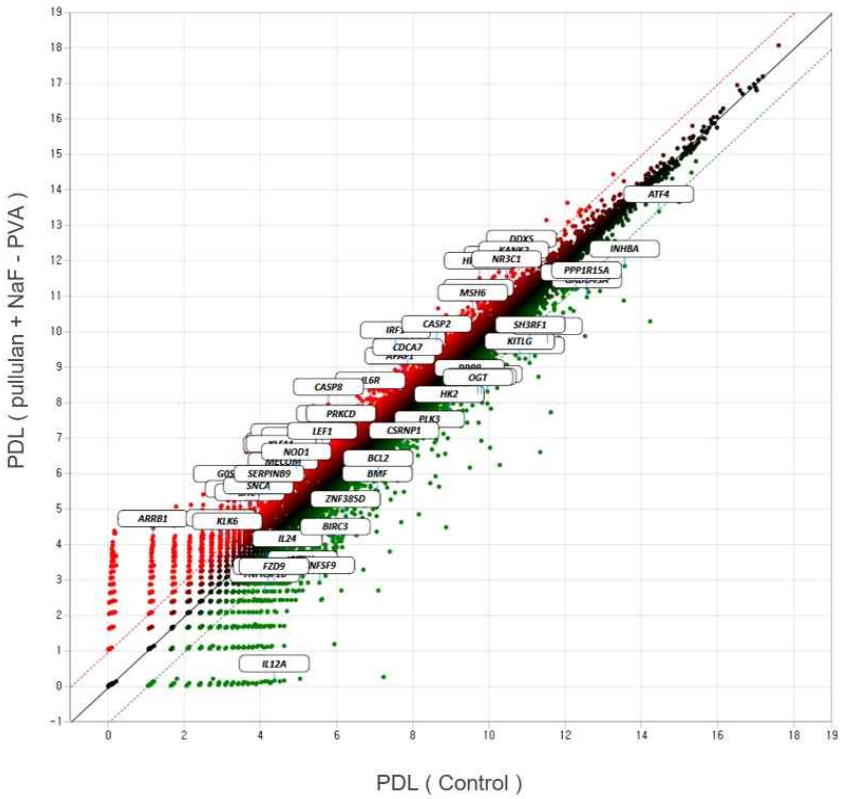


조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

PDL (NaF - PVA / Control)



PDL (pullulan + NaF - PVA / Control)



조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Fig. 7. Scatter plots of gene expression. In each plot, the central line passing through indicates no difference in expression between the cells (groups). Genes that are named in the squar box are gene associated with cell death gene ontology (GO). A red plot presents upregulated gene and a green plot presents down regulated gene.

X-axis : normalized data (log2) of control group, y-axis : normalized data (log2) of experimental group.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

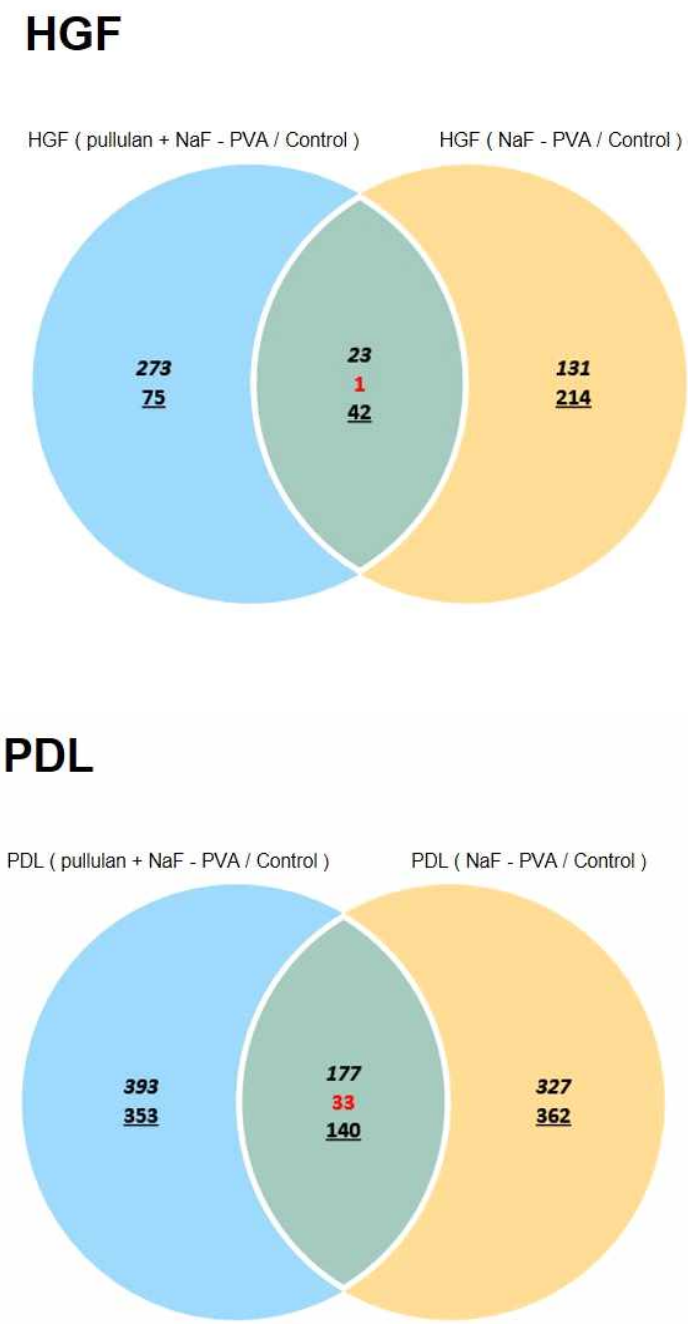


Fig. 8. Gene set enrichment analysis, Venn diagram. A: HGF cells, B: PDL cells. Slanted numbers: number of up-regulated genes, red numbers: number of contra-regulated genes, underlined numbers: number of down-regulated genes.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(2) Gene set enrichment analysis (GSEA)

① Human gingval fibroblast (HGF) cells

Pullulan + NaF-PVA tape 그룹에서는 Hallmark pathway 방법에서 TNFA_SIGNALING_VIA_NFκB라는 단 하나의 key pathway가 도출되었다(Table 1). 그림 9에서는 hallmark key pathway에 영향을 미친 유전자들을 보여준다.

NaF-PVA tape 그룹에서는 GSEA에서 Hallmark key pathway가 나타나지 않았다. Key pathway가 없기 때문에 이에 영향을 미치는 유전자들도 도출되지 않았다. 유전자 분석에서 pullulan + NaF-PVA tape군과 NaF-PVA tape군 모두에서 발현의 변이가 나타난 22개의 유전자들을 GSEA한 결과 역시 Hallmark key pathway가 나타나지 않았다.

이 결과들로 HGF 세포들은 불소함유 접착필름에 풀루란을 첨가하였을 때 더 많은 숫자의 유전자들이 발현의 변화가 나타나는 것을 관찰할 수 있었고 전통적인 불소함유 접착필름은 크게 유전자의 변이가 발생하지 않은 것을 확인하였다.

② Human periodontal ligament (PDL) cells

Hallmark pathway방법을 사용하여 PDL 세포에서의 유전자 발현변이에 대한 key pathway는 표 2,3,4에 기술하였다. Pullulan + NaF-PVA tape군과 NaF-PVA tape군 그리고 두 그룹 모두에서 발현의 변이가 나타난 유전자들을 GSEA한 결과는 모두 5개 이상의 key pathway가 도출되었고 가장 유의성이 높은 5개의 key pathway만 기술하였다. HGF 세포에서와 마찬가지로 가장 유의성이 높은 key pathway는 모두 TNFA_SIGNALING_VIA_NFκB로 나타났다.

Hallmark key pathway에 영향을 준 유전자들의 수는 각각 표 2,3,4에 기술되었으며 각 유전자들의 이름 또한 도식화하였다(Fig. 10). Key pathway에 영향을 준 유전자들 중에서 각각 15개만 그림 10에 표시되었다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 1. Gene set enrichment analysis (GSEA) of differentially expressed genes(DEGs) on human gingival fibroblast (HGF) cells in pullulan + NaF-PVA tape

Gene set name	Description	Genes in overlap	*p*-value	FDR q-value
HALLMARK_TNFA_SIGNALIN_VIA_NFKB	Genes regulated by NF-κB in response to TNF	15	2.06 e^{-17}	1.03 e^{-15}

Only gene sets with p-value <0.05 were included.

FDR=false discovery rate

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 2. Gene set enrichment analysis (GSEA) of differentially expressed genes(DEGs) on human periodontal ligament (PDL) cells in pullulan + NaF-PVA tape

Gene set name	Description	Genes in overlap	*p*-value	FDR q-value
HALLMARK_TNFA_SIGNALING _VIA_NFKB	Genes regulated by NF-κB in response to TNF	15	2.67 e^{-37}	1.34 e^{-35}
HALLMARK_INTERFERON_ GAMMA_RESPONSE	Genes up-regulated in response to IFNG	26	3.22 e^{-11}	8.05 e^{-10}
HALLMARK_INFLAMMATORY_ RESPONSE	Genes defining inflammatory response	23	4,89 e^{-9}	8.15 e^{-8}
HALLMARK_P53_PATHWAY	Genes involved in p53 pathways and networks	22	2.37 e^{-8}	2.97 e^{-7}
HALLMARK_APOPTOSIS	Genes mediating programmed cell death by activation of caspases	18	3.43 e^{-7}	3.43 e^{-6}

Only five key pathways with low *p*-value were included.

FDR=false discovery rate

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 3. Gene set enrichment analysis (GSEA) of differentially expressed genes(DEGs) on human periodontal ligament (PDL) cells in NaF-PVA tape

Gene set name	Description	Genes in overlap	*p*-value	FDR q-value
HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB	Genes regulated by NF-κB in response to TNF	47	$4.78\ e^{-32}$	$2.39\ e^{-30}$
HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE	Genes defining inflammatory response	23	$1.24\ e^{-9}$	$3.11\ e^{-8}$
HALLMARK_HYPOXIA	Genes up-regulated in response to low oxygen levels (hypoxia)	21	$3.24\ e^{-8}$	$5.4\ e^{-7}$
HALLMARK_P53_PATHWAY	Genes involved in p53 pathways and networks	19	$6.68\ e^{-7}$	$8.57\ e^{-6}$
HALLMARK_IL6_JAK_STAT3_SIGNALING	Genes up-regulated by IL6 via STAT3	12	$1.62\ e^{-6}$	$1.62\ e^{-5}$

Only five key pathways with low *p*-value were included.

FDR=false discovery rate

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 4. Gene set enrichment analysis (GSEA) of differentially expressed genes(DEGs) on human periodontal ligament (PDL) cells in pullulan + NaF-PVA tape and NaF-PVA tape

Gene set name	Description	Genes in overlap	*p*-value	FDR q-value
HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB	Genes regulated by NF-κB in response to TNF	10	6.4 e^{-16}	3.2 e^{-14}
HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE	Genes defining inflammatory response	6	1.42 e^{-8}	3.55 e^{-7}
HALLMARK_P53_PATHWAY	Genes involved in p53 pathways and networks	5	6.24 e^{-7}	1.01 e^{-5}
HALLMARK_IL6_JAK_STAT3_SIGNALING	Genes up-regulated by IL6 via STAT3	4	8.08 e^{-7}	1.01 e^{-5}
HALLMARK_APOPTOSIS	Genes mediating programmed cell death by activation of caspases	4	9.38 e^{-6}	9.38 e^{-5}

Only five key pathways with low *p*-value were included.

FDR=false discovery rate

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

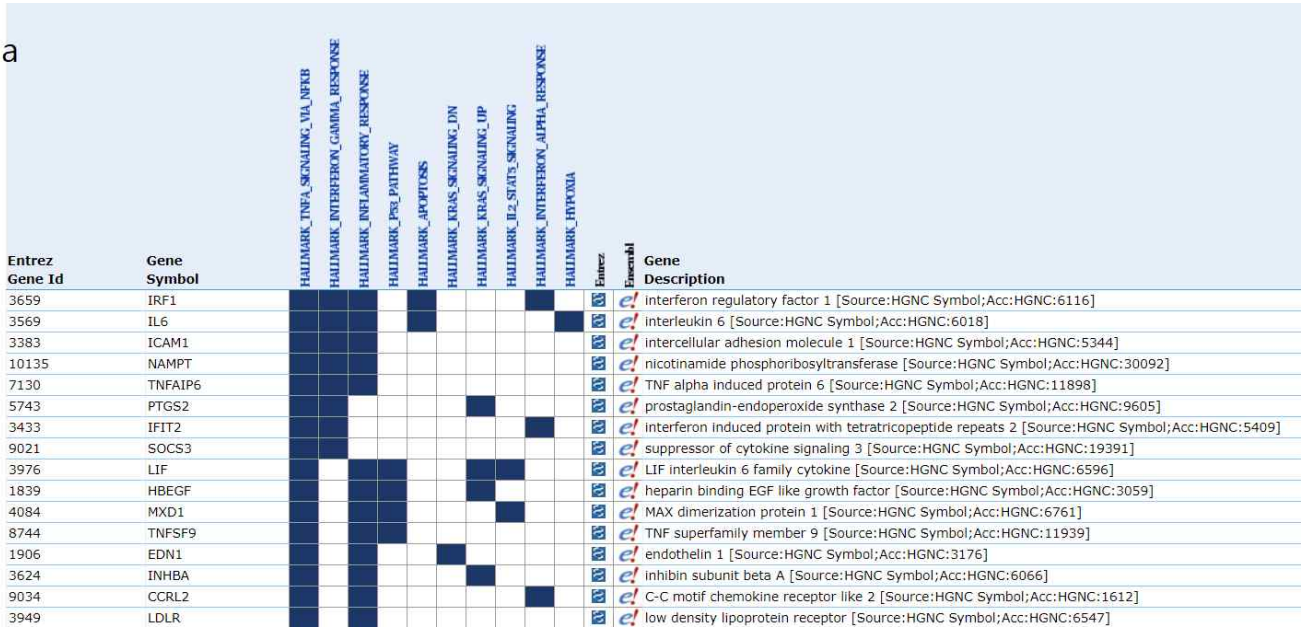
Entrez Gene Id	Gene Symbol	HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB	Entrez	Ensembl	Gene Description
3949	LDLR				low density lipoprotein receptor [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6547]
2354	FOSB				FosB proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3797]
2920	CXCL2				C-X-C motif chemokine ligand 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4603]
4616	GADD45B				growth arrest and DNA damage inducible beta [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4096]
1647	GADD45A				growth arrest and DNA damage inducible alpha [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4095]
5743	PTGS2				prostaglandin-endoperoxide synthase 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9605]
6347	CCL2				C-C motif chemokine ligand 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10618]
6446	SGK1				serum/glucocorticoid regulated kinase 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10810]
23645	PPP1R15A				protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:14375]
79693	YRDC				yrdC N6-threonylcarbamoyltransferase domain containing [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:28905]
2921	CXCL3				C-X-C motif chemokine ligand 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4604]
1827	RCAN1				regulator of calcineurin 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3040]
1958	EGR1				early growth response 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3238]
23529	CLCF1				cardiotrophin like cytokine factor 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17412]
8013	NR4A3				nuclear receptor subfamily 4 group A member 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7982]
5999	RGS4				regulator of G protein signaling 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10000]
29970	SCHIP1				schwannomin interacting protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:15678]
8817	FGF18				fibroblast growth factor 18 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3674]
5833	PCYT2				phosphate cytidylyltransferase 2, ethanolamine [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:8756]
8651	SOCS1				suppressor of cytokine signaling 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19383]

Fig. 9. Gene set overlap matrix prepared be gene set enrichiment analysis (GSEA) at human gingival fibroblast (HGF) cells. GSEA was performed to identify the functional profiles of over-expressed genes in a large set and to identify the association between genes in the set. Hallmark gene set overlaps of cells were derived only from pullulan + NaF-PVA tape.

Genes unmatched with hallmark gene sets are hidden.

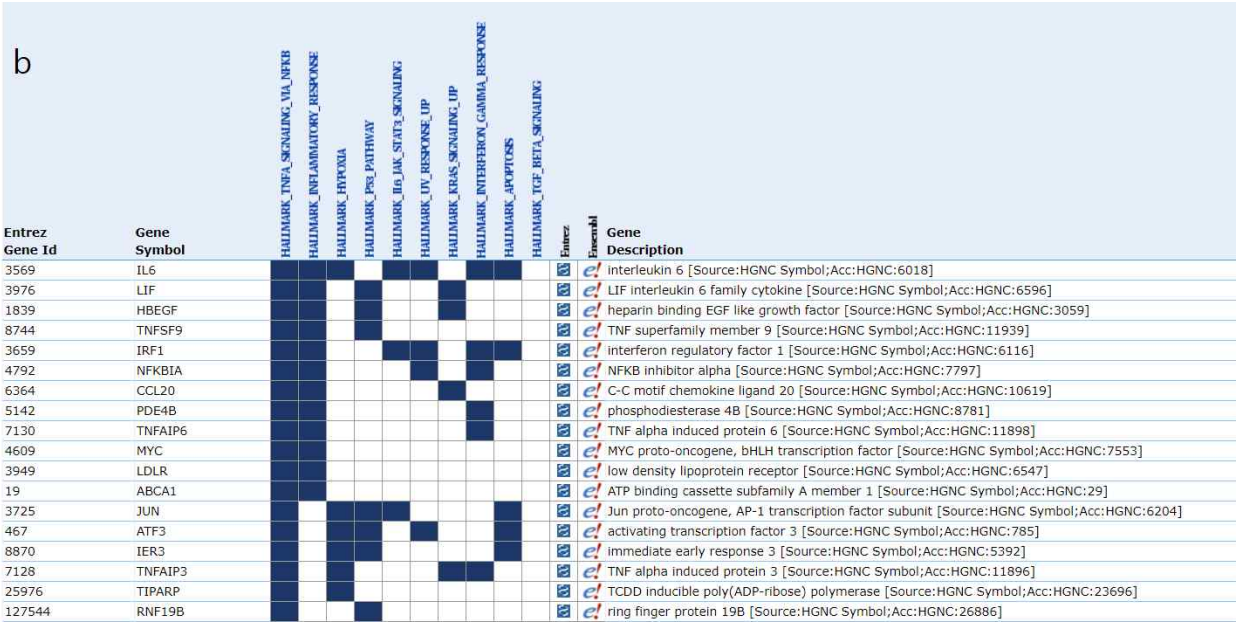
조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

a



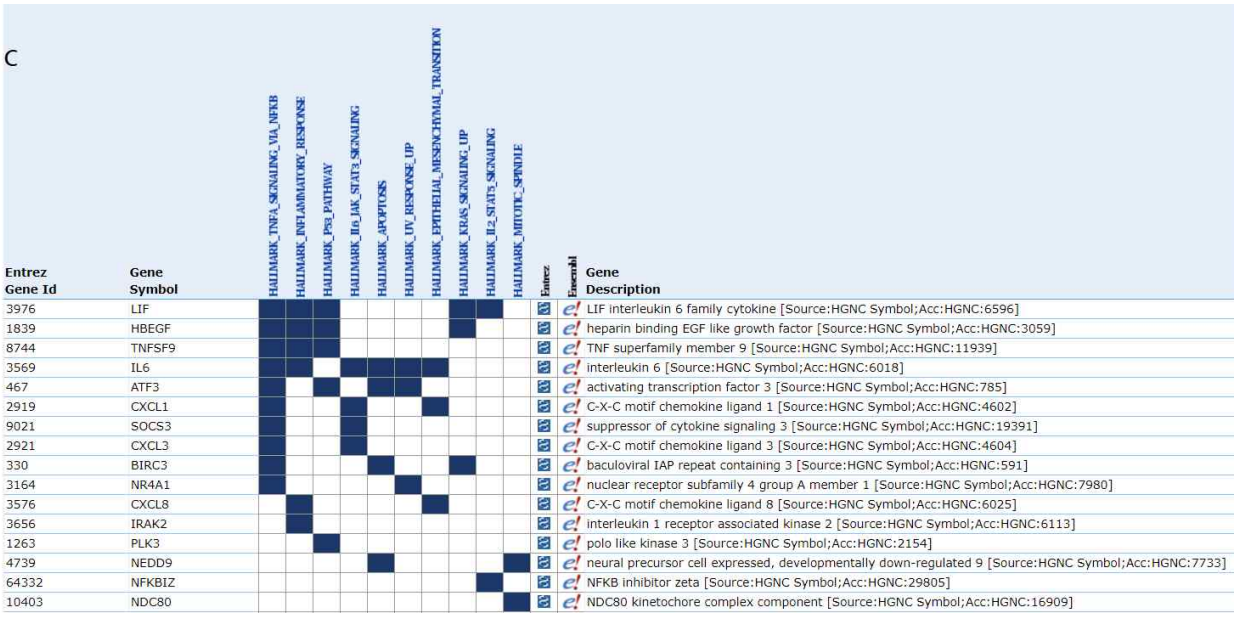
Entrez Gene Id	Gene Symbol	Gene Description
3659	IRF1	interferon regulatory factor 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6116]
3569	IL6	interleukin 6 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6018]
3383	ICAM1	intercellular adhesion molecule 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5344]
10135	NAMPT	nicotinamide phosphoribosyltransferase [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:30092]
7130	TNFAIP6	TNF alpha induced protein 6 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11898]
5743	PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9605]
3433	IFIT2	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5409]
9021	SOCS3	suppressor of cytokine signaling 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19391]
3976	LIF	LIF interleukin 6 family cytokine [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6596]
1839	HBEGF	heparin binding EGF like growth factor [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3059]
4084	MXD1	MAX dimerization protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6761]
8744	TNFSF9	TNF superfamily member 9 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11939]
1906	EDN1	endothelin 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3176]
3624	INHBA	inhibin subunit beta A [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6066]
9034	CCRL2	C-C motif chemokine receptor like 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1612]
3949	LDLR	low density lipoprotein receptor [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6547]

b



Entrez Gene Id	Gene Symbol	Gene Description
3569	IL6	interleukin 6 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6018]
3976	LIF	LIF interleukin 6 family cytokine [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6596]
1839	HBEGF	heparin binding EGF like growth factor [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3059]
8744	TNFSF9	TNF superfamily member 9 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11939]
3659	IRF1	interferon regulatory factor 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6116]
4792	NFKBIA	NFKB inhibitor alpha [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7797]
6364	CCL20	C-C motif chemokine ligand 20 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10619]
5142	PDE4B	phosphodiesterase 4B [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:8781]
7130	TNFAIP6	TNF alpha induced protein 6 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11898]
4609	MYC	MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7553]
3949	LDLR	low density lipoprotein receptor [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6547]
19	ABCA1	ATP binding cassette subfamily A member 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:29]
3725	JUN	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6204]
467	ATF3	activating transcription factor 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:785]
8870	IER3	immediate early response 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5392]
7128	TNFAIP3	TNF alpha induced protein 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11896]
25976	TIPARP	TCDD inducible poly(ADP-ribose) polymerase [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:23696]
127544	RNF19B	ring finger protein 19B [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:26886]

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY



C

Entrez Gene Id	Gene Symbol	HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB	HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE	HALLMARK_P53_PATHWAY	HALLMARK_IL6_JAK_STAT3_SIGNALING	HALLMARK_APOPTOSIS	HALLMARK_UV_RESPONSE_UP	HALLMARK_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION	HALLMARK_KRAS_SIGNALING_UP	HALLMARK_IL2_STAT5_SIGNALING	HALLMARK_MITOTIC_SPINDLE	Entrez	Ensembl	Gene Description
3976	LIF	■	■	■					■	■				LIF interleukin 6 family cytokine [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6596]
1839	HBEGF	■	■	■					■					heparin binding EGF like growth factor [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3059]
8744	TNFSF9	■	■	■										TNF superfamily member 9 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11939]
3569	IL6	■	■		■	■	■	■						interleukin 6 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6018]
467	ATF3	■		■		■	■							activating transcription factor 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:785]
2919	CXCL1	■			■			■						C-X-C motif chemokine ligand 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4602]
9021	SOCS3	■			■									suppressor of cytokine signaling 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19391]
2921	CXCL3	■			■									C-X-C motif chemokine ligand 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4604]
330	BIRC3	■				■			■					baculoviral IAP repeat containing 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:591]
3164	NR4A1	■					■							nuclear receptor subfamily 4 group A member 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7980]
3576	CXCL8		■					■						C-X-C motif chemokine ligand 8 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6025]
3656	IRAK2		■											interleukin 1 receptor associated kinase 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6113]
1263	PLK3			■										polo like kinase 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2154]
4739	NEDD9					■					■			neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7733]
64332	NFKBIZ									■				NFKB inhibitor zeta [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:29805]
10403	NDC80										■			NDC80 kinetochore complex component [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16909]

Fig. 10. Gene set overlap matrix prepared be gene set enrichiment analysis (GSEA) at human pediodonatal ligament (PDL) cells. GSEA was performed to identify the functional profiles of over-expressed genes in a large set and to identify the association between genes in the set. Hallmark gene set overlaps of cells in pullulan + NaF-PVA tape(a), NaF-PVA tape(b), both tapes(c).

Only 15 genes were designated.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

IV. 총괄 및 고찰

불소함유 접착필름은 점막 점착성(mucoadhesion)의 개념으로 제작된 제제이다. 많은 의학분야에서 약물이 목표 장기에 도달하여 확산되는 속도를 조절하는 제어, 방출 기술들에 대한 연구들이 이루어지고 있다[22,23]. 약물의 체류시간을 증가시키기 위해 여러 가지 형태의 점막 점착성 제제들이 개발되었고 비슷한 개념으로 치아에 접착되어 불소가 방출되는 속도를 조절하는 것을 목적으로 불소함유 접착필름이 고안되었다.

Sun L은[24] 원자나 분자 단위의 극미세 물질을 인위적으로 조작함으로써 새로운 성질과 기능을 가진 물질이나 장치를 만드는 기술인 나노(nano) 테크놀로지를 이용하여 불소를 적용한 효과를 보고하였다. 나노 타입의 불소가 마크로(macro) 타입의 불소보다 더 많은 반응을 보이는 이유는 용해도(solubility)가 더 뛰어나기 때문이라고 하였다. 불소함유 접착필름도 sodium fluoride (NaF)를 나노섬유를 분사하는 과정을 통해 첨가하였다. 이를 통해 매개체로서의 효율을 증진시킬 뿐 아니라 박막의 점성, 탄성도, 강도, 접착력, 표면장력 등을 필요에 따라 조절해 주고자 하였다. 이러한 불소함유 접착필름의 성분 변화가 용이하다는 장점을 이용하여 풀루란을 첨가한 불소함유 접착필름을 고안하였고 이 두 필름들의 세균에 대한 효능과 생체안정성 검사를 시행하게 되었다.

불소함유 접착필름의 Agar dilusion test는 구강 내 세균들 중 치아 우식의 주 원인균으로 여겨지는 mutans streptoccoci를 대상으로 시행하였다[25-27]. 20ppm이하의 불소농도로는 산형성 세균의 항균 효과가 거의 없다는 보고도 있었지만 이는 *Lactobacillus*가 포함된 연구였다[28,29]. 본 연구에서는 NaF-PVA tape 군에서 명확한 항균 효과를 보여주었다. 본 연구에서와 같이 Jang은[30] *S. mutans* 실험에서 불소유리의 시간에 따른 생장 저해 구역의 길이가 48, 72시간에 24시간 후보다 유

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

의하게 큰 것을 보고하였다. Pullulan + NaF-PVA tape의 경우 72시간동안 S. mutans에 항균효과를 보여주지 못하였지만 NaF-PVA tape은 48시간에 대조군과 비교하여 유의한 항균효과를 보여주었다.

불소함유 접착테잎이 Biofilm의 표면과 S.mutans의 군집형성 그리고 대사과정에 미치는 영향을 확인하기 위해 field emission scanning electron microscope (FE-SEM) 및 Confocal laser scanning microscopy (CLSM)를 촬영하였다. Scanning electron microscope (SEM)는 10,000배 이상에서는 선명하게 관찰되지 않으며 시편이 오염되는 문제점이 있어 FE-SEM을 사용하였다[31,32]

FE-SEM과 CLSM 이미지 모두 불소함유 접착필름들에서 *S.mutans*에 대한 유의한 항균 효과를 보여주었으며 NaF-PVA tape군에서 pullulan +NaF-PVA군보다 더 좋은 항균 능력을 보여주었다. CLSM 이미지로 *S. mutans*와 extracellular polymeric substances (EPS)의 bio-volume을 측정하였다. EPS는 주로 polysaccharide와 단백질 그리고 extracellular DNA (eDNA)로 구성되어있는 biofilm을 감싸는 biofilm의 기본구성요소로서 EPS에 내장된 세포는 다른 세포들과 비교하여 항균에 저항력이 높아 불소함유 접착필름의 항균효과에 대한 확실한 증거가 되었다[33-35].

불소함유 접착필름의 항균능력을 평가할 수 있는 3가지의 실험(agar diffusion test, FE-SEM, CLSM)에서 모두 동일한 결과가 도출되었다. 전통적인 불소함유 접착필름이 풀루란을 첨가한 이중 접착필름보다 유의하게 높은 항균 효과를 보여주었다.

풀루란을 첨가한 불소필름의 항균력 저하는 첫째로 풀루란을 첨가한 불소함입 접착필름의 형태적 문제로 인해 발생할 수 있다. 접착력을 증진시켜 불소방출량이 증진되는 것을 기대하였으나 오히려 풀루란 표면이 불소의 세균과의 접촉을 방해할 수 있으며 풀루란을 제외할 경우 기존의 불소함유 접착필름의 절반의 두께는 불소방출량에 있어서 차이가 있을 수 있다. 두 번째 이유는 풀루란 자체의 성분이 항균

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

효과를 저해시킬 수 있다. 따라서 풀루란의 두께를 달리하여 항균효과를 측정하고 풀루란으로만 제작한 필름을 실험해보는 과정을 통해 이를 확인해야 할 것이다.

불소함유 접착필름의 생체안정성을 검증하기 위해 human gingival fibroblast (HGF)와 periodontal ligament (PDL) 세포들을 이용하여 MTT assay를 시행하였다. 불소함유 접착필름은 상악 및 하악 악궁 단위로 치아에 적용하기 때문에 치질뿐 아니라 치은에 접촉하며 치주인대에도 접촉할 가능성이 있어 HGF와 PDL 세포들이 선택되었다[7].

모든 불소함유 접착필름은 대조군에 비해 HGF와 PDL 세포 모두에서 유의하게 낮은 세포 생존능력을 보여주었다. 특히 Pullulan + NaF-PVA tape군은 전통적인 NaF-PVA tape군에 비해 절반 이하의 세포 생존능력을 보여주었다. 흥미롭게도 Pullulan + NaF-PVA tape군의 낮은 항균능력 결과로 인해 불소가 세포에 미치는 영향력이 떨어질 것으로 추정되었음에도 불구하고 풀루란을 첨가한 불소필름이 더 높은 세포 독성을 보여주었다.

풀루란은 α-(1->6) 연결의 규칙적인 독특한 연결 패턴으로 구조적 유연성을 갖기 때문에 다른 다당류에서는 나타나지 않는 뚜렷한 필름 및 섬유 형성 특성을 나타내어 약물 전달, 유전자 전달, 혈장 확장기, 조직 공학, 상처 치유 및 구강 관리 제품에 널리 사용되고 있다[13,36]. 약물의 전달 응용을 위해 가교된 풀루란 나노 입자를 이용한 연구는 풀루란 나노 입자가 세포에 무독성이며 세포에 명확한 해를 끼치지 않는다고 보고하였으며 풀루란 자체의 비면역원성(non-immunogenic), 무독성 그리고 돌연변이가 없는(non-mutagenic) 특성 때문에 풀루란은 표적화 약물에 사용 될 수 있다고 하였다[37,38]. 이 표적 효과로 인하여 항암제의 정상 세포에 대한 독성까지도 감소시킬 수 있다고 밝혀졌다[39,40].

더하여 풀루란은 유익한 박테리아의 성장을 촉진하는 프리바이오틱(prebiotic)의 역할을 하며[13] 치아에 직접적으로 실험을 시행한 치수재생술에서 scaffold 역할로 풀루란을 첨가한 연구에서도 human dental pulp stem cells (hDPSC)을 사용한 세

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

포 배양에서 세포 부착, 증식, 확산 모두에서 scaffold로서 긍정적인 효과를 보여주었다[41].

풀루란 자체의 성분과 특성만을 보았을 때, 풀루란 층(layer)이 세포에 독성을 일으켰다고 추정하기는 어렵다. 불소함유 접착필름과 풀루란 각각의 분석으로는 낮은 세포 생존능력을 확인하기 어려울 것으로 생각되며 이에 영향을 미치는 원인을 알기 위해 풀루란과 불소함유 접착필름간의 상호작용에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

MTT assay는 간편하면서 비교적 정확하게 세포 증식 및 사멸도 변화를 평가할 수 있으며 대량을 동시에 측정할 수 있다는 장점이 있다[42]. 하지만 비수용성인 formazan 용해를 위해 유기용매를 사용하여 녹이는 과정이 필요하다. 또한 media를 제거하는 과정에서 세포가 손실될 위험이 있으며 한 세포의 생리적 상태나 세포의 종에 따라서 활성 차이가 나타날 수 있다[43]. MTT asssay의 가장 큰 문제점은 세포의 생존력에 대한 평가에서 세포의 생존과 괴사라는 이분법적인 판단만이 가능하다는 점이다. 이러한 단점을 보완하고자 유전자 분석을 수행하였고 유전자 분석을 통하여 세포의 괴사에 영향을 미치는 원인들과 불소함유 접착필름에 접촉한 세포들의 상태를 다각화하여 관찰하고자 하였다.

불소함유 접착필름에 적용된 human gingival fibroblast (HGF)와 periodontal ligament (PDL) 세포들을 RNA sequencing을 수행하여 DEGs를 찾아 분석하였다. 모든 유전자 분석은 일반적으로 행하여지는 이전의 유전자 실험들과 마찬가지로 fold 값을 2로 normalized data log값을 4이상으로 p값은 0.05 이하를 기준으로 하였다[20,44].

RNA sequencing은 수 만개의 유전자를 포함하기 때문에 유전자를 하나씩 분석하기보다 기능별로 그룹을 지어 분석을 하는 것이 용이하다. 이를 위해 많은 연구자들이 gene ontology (GO)를 활용한다[45,46]. GO는 모든 종에 걸쳐 유전자 속성의 표현을 통합하기 위한 주요 생물 정보학 이니셔티브를 말한다. GO는 비슷한 기능

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

의 유전자들을 묶어 놓은 그룹이라고 생각할 수 있다.

Gene caterogy chart를 통하여 어떤 종류의 GO의 유전자들이 상대적으로 많은 발현 변화가 있었는지 확인할 수 있었다(Fig 6.). 여러 가지 GO들 중에서 세포의 기능이 쇠퇴하거나 사멸하는 것과 연관이 있는 GO는 여러 종류가 있을 수 있다. Aging, Apoptotic process, Cell death, Cell migration, DNA repair, Immune response, Neurogenesis, Secretion GO의 유전자 발현 변화가 HGF, PDL 세포에서 NaF-PVA tape군과 pullulan + NaF-PVA tape군 모두에서 관찰되었다. GO들 중에서 세포 독성과 가장 직관적으로 연관성이 높게 여겨지는 cell death GO의 유전자들 중 유의하게 발현이 변화한 유전자들을 분석하였다.

Pullulan + NaF-PVA tape은 HGF 세포에서 GADD45A, GADD45B 그리고 PPP1R15A의 발현이 증가되었다. GADD45 A와 B는 DNA repair 그리고 세포의 정지(arrest)와 자멸사(apoptosis)에 관여한다. PPP1R15A 또한 GADD 그룹으로 세포자멸사에 관여하는 성장 억제 및 DNA 손상 유도 단밸질로 알려져있다[47,48].

NaF-PVA tape군은 HGF 세포에서 발현이 유의하게 증가된 유전자는 MLKL, NSG1 이었고, 감소된 유전자는 DFFB, CASP9, CASP8, MYD88였다. MLKL 유전자는 세포사멸과정인 tumor necrosis factor (TNF) 유발 괴사 (induced necroptosis)에서 중요한 역할을 한다[49]. NSG1 또한 DNA 손상에 대한 반응으로 세포 사멸을 유도한다[50]. 이러한 세포들의 발현이 증가하여 cell death에 관여하였으나 세포 사멸동안 염색질 응축을 유발하는 DFFB 유전자와 역시나 세포사멸에 관여하는 caspase family인 CASP8,9 그리고 MYD88 같은 유전자들의 발현은 감소되었다[51-54]. 이러한 결과는 풀루란이 포함된 불소함유 접착필름과의 차이를 보여주었다.

PDL 세포에서는 HGF에서보다 cell death GO 유전자의 발현의 변화가 훨씬 많았다. Pullulan + NaF-PVA tape에서 발현이 유의하게 변화된 유전자의 수는 61개였다. NaF-PVA tape에서는 48개로 Pullulan + NaF-PVA tape보다 더 작은 변화된

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

유전자의 수를 보여주었다.

이렇게 다양한 유전자들에서 발현의 변화가 관찰된 분석 결과에서 유전자의 숫자만으로 세포 독성에 대해서 명확히 결론지을 수는 없다. 하지만 풀루란을 포함한 불소함유 접착필름에서 기존의 NaF-PVA tape보다 cell death GO와 연관된 많은 유전자의 변이가 일어났으며 이것이 세포의 생존력에 영향을 주는 원인임을 유추할 수 있다. 이것은 MTT assay에서도 증명되었다(fig. 5).

벤다이어그램을 이용한 각 세포들의 3개의 그룹(control, NaF-PVA, pullulan + NaF-PVA)의 DEGs를 비교한 결과 PDL세포들에서만 대조군과 비교한 불소함유 접착필름들간의 발현이 서로 반대되는 유전자들이 존재하였다(n=33). 이를 통해 불소함유 접착필름의 종류에 따라 HGF 세포들보다 PDL 세포들에서 더 다양한 변이가 발생할 수 있다고 해석할 수 있다.

DEGs 분석에서 모든 유전자들의 발현의 증가와 감소의 의미를 찾는 것은 많은 노력을 필요로 하고 뚜렷한 목적(target) 유전자가 있지 않는 이상 그 자체가 오히려 전체 분석에서 오류가 발생할 수 있는 가능성이 있다. 따라서 유전자들의 key pathway를 찾아서 분석하는 것이 더 효율적이다[20,55].

Gene set enrichment analysis (GSEA)는 Microarray 또는 RNA-seq. 자료를 이용하여 대조군, 실험군에서 유의한 유전자 세트를 분석하는 프로그램이다. GSEA는 인간과 쥐의 유전자만 분석 가능하며 molecular signature database (MsigDB)에 있는 유전자 세트를 기반으로 분석한다[56]. Key pathway를 찾는 여러 가지 방법들 중에서 본 연구에서는 Hallmark pathway 방법을 이용하였다[20].

Pullulan + NaF-PVA tape은 HGF 세포의 GSEA에서 key pathway로 TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB를 보여주었다. Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB)는 염증반응과 면역체계를 조절하고 세포괴사, 세포증식, 상피세포의 분화 등에 관여하는 단백질군(protein familly)이다[57]. Tumor necrosis factor (TNF)-α는 몸에 지속적인 염증을 유도하

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

며 류마티스 관절염과 같은 여러 가지 염증성 질환들과 연관되어 있다[58]. 이와 같은 내용으로 치은쪽에 플루란을 첨가한 불소필름이 접촉했을 때 두드러지게 나타날 수 있는 세포학적 반응은 NF-κB를 경로로 따르는 TNF-α의 조절 과정이라고 할 수 있다.

Pullulan + NaF-PVA tape은 HGF 세포에서 NF-κB를 통한 TNF-α에 영향을 미치는 과정을 통해 필름이 치은과 접촉했을 때 염증반응을 일으킬 수 있다는 의심이 가능하였다. 이 key pathway를 통하여 pullulan + NaF-PVA tape세포의 생존률이 낮아진 이유가 필름에 의한 염증반응에 의한 결과임을 추정해 볼 수 있다.

앞서 이야기 했듯이 GSEA는 큰 세트에서 과발현 유전자의 기능적 프로파일을 식별하고 세트의 유전자 간의 연관성을 확인하기 위해 수행되었다. 여러 개의 유전자 중에 이 Key pathway와 연관된 유전자를 하나씩 살펴볼 수 있었다. HGF 세포 실험에서 pullulan + NaF-PVAtape 그룹은 총 15개의 유전자가 key pathway에 관여하였다(Fig. 9). 이 유전자들 중 LDLR 유전자의 결핍은 혈장 콜레스테롤을 증가시키고 동맥경화증 가능성을 높인다. LDLR이 높아지면 혈관 염증에 영향을 미친다[59]. CXCL3는 종양 유전자, 대식세포 염증성 단백질-2-β라고 불리는 염증과 연관된 유전자이다[60]. 이러한 15개의 유전자들의 발현의 변화에 의해서 TNF-α의 기능이 증진되었다고 유추할 수 있다.

이와 대조적으로 HGF 세포의 전통적인 불소함유 접착필름과 대조군 그룹간의 GSEA에서는 어떠한 Hall mark key pathway도 나타나지 않았다. 즉 유전자 검사를 통한 GSEA 분석에서도 MTT assay 결과를 뒷받침할 수 있는 값이 도출되었다.

PDL 세포의 GSEA에서는 pullulan + NaF-PVA tape 그룹과 NaF-PVA tape 그룹 뿐 아니라 두 그룹 모두에서 발현의 변이가 나타난 유전자들에서도 5개 이상의 key pathway가 도출되었다. 이 모든 GSEA의 key pathway는 TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB였다. NaF-PVA tape도 이 key pathway와 유의

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

성이 아주 높았지만 pullulan + NaF-PVA tape에서 더 높은 유의성을 보여주었다.

이 연구에서 기존의 불소함유 접착필름의 접착력을 개선하기 위해 서로 다른 용해 특성을 갖는 pullulan과 PVA를 접착시켜 개발된 이중(double layers) 접착필름은 전통적인 불소함유 접착필름보다 더 낮은 항균효과와 높은 세포 독성을 보여주었다. 앞으로 불소함유 접착필름의 효과와 안정성의 개선을 위해서 풀루란의 적용방법을 개선하거나 풀루란을 대체하는 물질에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 DEGs 분석을 통해 HGF 세포들보다 PDL 세포들이 모든 불소함유 접착필름에 있어서 생체 안정성이 더 취약하다고 유추해 볼 수 있었다. 어린아이들에게 불소함유 접착필름을 사용했을 때 치주인대가 직접적으로 불소함유 접착필름에 접촉될 경우는 아주 적을 것으로 생각되지만 비정상적인 저작력에 의해 치근이 노출되거나 교정치료에 의해 치은퇴축이 발생한 경우, 외상으로 인하여 치주인대가 노출된 경우, 또는 전신질환으로 인하여 치조골의 많은 흡수가 있는 아이들에서 불소함유 접착필름을 적용할 때 이러한 점을 고려해야 할 것이다[61,62]. 더하여 치은과의 접촉을 최소화 하기 위해 불소함유 접착필름의 크기에 대한 고려가 필요하며 사용자 개개인에 맞는 커스터마이즈화 한 불소함유 접착필름의 제작은 제품의 안정성을 보완해줄 수 있을 것으로 생각된다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅴ. 결 론

물리적인 특성을 증진시키고 점착성을 높이기 위해 풀루란을 첨가하여 생산한 이중(double layers) 불소함유 접착필름은 기존의 불소함유 접착필름에 비하여 Agar diffusion test와 FE-SEM, CLSM 실험에서 S. mutan에 더 낮은 항균효과를 보여주었다. 또한 풀루란을 첨가한 불소함유 접착필름은 상대적으로 MTT assay와 DEGs 분석에서 높은 세포독성을 보여주었다.

유전자 분석을 통해 불소함유 접착필름이 PDL, HGF 세포들에게 가장 큰 영향을 미치는 것은 NF-κB를 경로로 따르는 TNF-α의 조절 과정을 통한 염증 반응이었다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

References

1. González-Cabezas C, Fernández CE : Recent Advances in Remineralization Therapies for Caries Lesions. *Adv Dent Res*, 29(1):55-59, 2018.
2. Cochrane NJ, Cai F, Huq NL *et al.* : New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *J Dent Res,* 89(11):1187-97, 2010.
3. Knutson JW : Sodium fluoride solutions; technic for application to the teeth. *J Am Dent Assoc*, 36(1):37-39, 1948.
4. Beltrán-Aguilar ED, Goldstein JW, Lockwood SA : Fluoride varnishes. A review of their clinical use, cariostatic mechanism, efficacy and safety. *J Am Dent Assoc*, 131(5):589-596, 2000.
5. American Dental Association Council on Scientific Affairs : Professionally applied topical fluoride: evidence-based clinical recommendations. *J Dent Educ*, 71(3):393-402, 2007.
6. Park DY, Lee NY, Lee SH : Preventive effect of fluoride-containing adhesive film made by nano technology on dental caries. *J Korean Acad Pediatr Dent*, 35(4):662-670, 2008.
7. Kim MJ, Lee SH, Lee NY *et al.* : Evaluation of the effect of PVA tape supplemented with 2.26% fluoride on enamel demineralization using microhardness assessment and scanning electron microscopy: In vitro study. *Arch Oral Biol*, 58:160-166, 2013.
8. Jih MK, Lee SH, Lee NY : Effect of polymer adhesive film supplemented 5% NaF on enamel remineralization. *J Korean Acad Pediatr Dent*, 41:218-224, 2014.
9. Kim SY, Lee SH, Lee NY, Jih MK : Effect of silver diamine fluoride and

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

sodium fluoride varnish on remineralization in artificially induced enamel caries: an in vitro study. *J Korean Acad Pediatr Dent*, 47:266-276, 2020.

10. Kim MR, Lee NY, Jih MK *et al.* : Comparison of the re-mineralization effect of newly-developed fluoride agents according to the depth of early carious lesions. *Oral Biology Research,* 44:1-9, 2020.
11. Lee SH, Lee NY, Lee IH : Clinical evaluation of the efficacy of fluoride adhesive tape (F-PVA) in reducing dentin hypersensitivity. *Am J Dent*, 26:143-148, 2013.
12. Tsujisaka Y, Mitsuhashi M : Industial gums (Third edition): Polysaccharides and their derivatives. *San Diego, CA, USA: Academic Press*, 447-460.
13. Leathers TD : Biotechnological production and applications of pullulan. *Appl Microbiol Biotechnol*, 62: 468-473, 2003.
14. Lee SH, Lee NY, Lee IH : Clinical evaluation of the efficacy of fluoride adhesive tape (F-PVA) in reducing dentin hypersensitivity. *Am J Dent*, 26(3):143-148, 2013.
15. Suginoto S, Okuba K, Miyakawa R, *et al.* : Imaging of bacterial multicellular behaviour in biofilms in liquid by atmospheric scanning electron microscopy. *Sci Rep*, 16;6:25889, 2016.
16. Kim M, Jeon J, Kim J : Streptococcus mutans extracellular DNA levels depend on the number of bacteria in a biofilm. *Sci Rep*, 6;8:13313,2018.
17. Freimoser FM, Jakob CA, Aebi M, *et al.* : The MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. *Applied and environmental microbiology*, 65:3727-3729, 1999.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

18. Langmead B, Salzberg SL : Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nat Methods, 4;9(4):357-9, 2012.

19. Quinlan AR, Hall IM : BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*, 26:841-842, 2010.

20. Nam OH, Oh TJ, Lee JH *et al.* : Differential gene expression profiles of human periodontal ligament cells preserved in Hank's balanced salt solution and milk. *Dent Traumatol*, 36(1):58-68, 2020.

21. Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H *et al.* : The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst*, 23;1(6):417-425, 2015.

22. Patel MP, Patel RR, Patel JK : Chitosan mediated targeted drug delivery system: a reviw. *J Pharm Pharm Sci*, 13(4);536-557, 2010.

23. Boddupalli BM, Mohammed ZN, Nath RA *et al.* : Mucoadhesive drug delivery system : An overview. *J Adv Pharm Technol Res*, 1(4):381-387, 2010.

24. Sun L, Chow LC : Preparation and properties of nano-sized clacium fluoride for dental applications. *Dent Mater*, 24(1):111-116, 2008.

25. Simon-Soro A, Mira A : Solving the etiology of dental caries. *Trends Microbiol,* 23(2):76-82, 2015.

26. Lemos JA, Palmer SR, Zeng L *et al.* : The biology of streptococcus mutans. *Microbiol Spectr*, 7(1):10, 2019.

27. Krzysciak W, Jurczak A, Koscielniak D *et al*, : The virulence of streptococcus mutans and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 33(4):499-515, 2014.

28. Tylastrup A, Fejerskov O : Textbook of clinical cariology. Munksgaard, Copenhagen, 254, 1994.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

29. Lilienthal B : The effect of fluoride on acid formation by salivary sediment. *J Dent Res,* 35:197-204, 1956.

30. Jang KT : A study on the antimicrobial effect of fluoride-releasing removable orthodontic appliances. *J Korean Acad Pediatr Dent,* 26(1):133-138, 1999.

31. Kang DJ, Lee SJ, Na JE *et al.* : Atmospheric scanning electron microscopy and its applications for biological specimens. *Microsc Res Tech*, 82(1):53-60, 2019.

32. Oately CW : The early history of the scanning electron microscope. *J Appl Phys*, 53:1-13, 1982.

33. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U *et al.* : Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*, 11;14(9)563-575, 2016.

34. Lasa I, Penades JR : Bap: a family of surface priteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol*, 157(2):99-107, 2006.

35. Davies D : Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov*, 2(2):114-122, 2003.

36. Singh RS, Kaur N, Kennedy JF : Pullulan and pullulan derivatives as promising biomolecules for drug and gene targeting. *Carbohydr Polym*, 5;123:190-207, 2015.

37. Gupta M, Gupta AK : In vitro cytotoxicity studies of hydrogel pullulan nanoparticles prepared by AOT/N-hexane micellar system. *J Pharm Pharm Sci*. 13;7(1):38-46, 2004.

38. Akiyoshi K, Kobayashi S, Shichibe S *et al.* : Self-assembled hydrogel nanoparticle of cholesterol-bearing pullulan as a carrier of protein drugs: Complexation and stabilization of insulin. *J Control Release*, 14;54(3):313-320, 1998.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

39. Choi Y, Kim SY, Kim SH *et al.* : Long-term delivery of all-trans-retionic acid using biodegradable PLLA/PEG-PLLA blended microspheres. Int J Pharm, 14;215(1-2):67-81, 2001.

40. Soma CE, Dubernet C. Barratt G *et al.* : Ability of doxorubicin-loaded nanoparticles to overcome multidrug resistance of tumor cells after their capture by macrophages. Pharm Res, 16(11):1710-1716, 1999.

41. Moonesi Rad R, Atila D, Akgün EE *et al.* : Evaluation of human dental pulp stem cells behavior on a novel nanobiocomposite scaffold prepared for regenerative endodontics. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl,* 100:928-948, 2019.

42. Gomez Perez M, Fourcade L, Mateescu MA *et al.* : Neutral Red versus MTT assay of cell viability in the presence of copper compounds. *Anal Biochem*, 15;535:43-46, 2017.

43. Angius F, Floris A : Liposomes and MTT cell viability assay: an incompatible affair. *Toxicol In Vitro*, 29(2):314-319, 2015.

44. Rathinam E, Govindarajan S, Rajasekharan S et al. : Transcriptomic profiling of human dental pulp cells treated with tricalcium silicate-based cements by RNA sequencing. *Clin Oral Investig*, doi: 10.1007/s00784-020-03647-0, 2020.

45. Dalmer TRA, Clugston RD : Gene ontology enrichment analysis of congenital diaphragmatic hernia-associated genes. *Pediatr Res*, 85(1):13-19, 2019.

46. Thomas PD : The Gene Ontology and the Meaning of Biological Function. *Methods Mol Biol*, 1446:15-24, 2017.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

47. Salvador JM, Brown-Clay JD, Fornace AJ Jr. : Gadd45 in stress signaling, cell cycle control, and apoptosis. *Adv Exp Med Biol*, 793:1-19, 2013.

48. Song Y, Liu S, Zhao Z *et al.* : Relationship between PPP1R15A gene polymorphism (rs611251) and Epstein-Barr virus-associated tumors. *Acta Virol*, 61(4):445-452, 2017.

49. Dovey CM, Diep J, Clarke BP *et al.* : MLKL Requires the Inositol Phosphate Code to Execute Necroptosis. *Mol Cell*, 7;70(5):936-948.e7, 2018.

50. Yap CC, Digilio L, McMahon L *et al.* : The endosomal neuronal proteins Nsg1/NEEP21 and Nsg2/P19 are itinerant, not resident proteins of dendritic endosomes. *Sci Rep*, 5;7(1):10481, 2017.

51. Han DSC, Ni M, Chan RWY *et al.* : The Biology of Cell-free DNA Fragmentation and the Roles of DNASE1, DNASE1L3, and DFFB. *Am J Hum Genet*. 6;106(2):202-214, 2020.

52. Fritsch M, Günther SD, Schwarzer R *et al.* : Caspase-8 is the molecular switch for apoptosis, necroptosis and pyroptosis. *Nature*, 575(7784):683-687, 2019.

53. Han J, Goldstein LA, Hou W *et al.* : Involvement of CASP9 (caspase 9) in IGF2R/CI-MPR endosomal transport. *Autophagy*, 25:1-17, 2020.

54. Deguine J, Barton GM : MyD88: a central player in innate immune signaling. *F1000Prime Rep*, 4;6:97, 2014.

55. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L et al. : The hallmarks of aging. *Cell*, 6;153(6):1194-217, 2013

56. Tilford CA, Siemers NO : Gene set enrichment analysis. *Methods Mol Biol*, 563:99-121, 2009.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

57. DiDonato JA, Mercurio F, Karin M : NF-κB and the link between inflammation and cancer. *Immunol Rev*, 246(1):379-400, 2012.

58. Idriss HT, Naismith JH : TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech*, 50(3):184-95, 2000.

59. Go GW, Mani A : Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis. *Yale J Biol Med*, 85(1):19-28, 2012.

60. Kusuyama J, Komorizono A, Bandow K *et al.* : CXCL3 positively regulates adipogenic differentiation. *J Lipid Res*, 57(10):1806-1820, 2016.

61. Gebistorf M, Mijuskovic M, Pandis N *et al.* : Gingival recession in orthodontic patients 10 to 15 years posttreatment: A retrospective cohort study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 153(5):645-655, 2018.

62. Bimstein E : Periodontal health and disease in children and adolescent. *Pediatr Clin North Am*, 38(5):1183-207, 1991.