

유치의 치수와 치주인대에서 분리한 줄기세포의 특성

송제선^{1†} · 김승혜^{1†} · 김성오¹ · 최병재¹ · 김정희² ·곽성욱³ · 정한성^{3*}

¹연세대학교 치과대학 소아치과학교실 및 구강과학연구소

²경희대학교 치과대학 구강생화학학교실 및 구강생물연구소

³연세대학교 치과대학 구강생물학교실 내 해부발생학 연구실 및 구강악안면 경조직 재생연구소

Characterization of Stem Cells Obtained from the Dental Pulp and Periodontal Ligament of Deciduous Teeth

Je Seon Song^{1†}, Seung-hye Kim^{1†}, Seong-Oh Kim¹, Byung-Jai Choi¹, Jeong-Hee Kim², Sungwook Kwak³, and Han-Sung Jung^{3*}

¹Department of Pediatric Dentistry, Oral Science Research Center, College of Dentistry, Yonsei University, Seoul, 120-752 Korea

²Department of Oral Biochemistry, Institute of Oral Biology, College of Dentistry, Kyung Hee University, Seoul, 130-701 Korea

³Division in Anatomy & Developmental Biology, Department of Oral Biology, Research Center for Orofacial Hard Tissue Regeneration, College of Dentistry, Yonsei University, Seoul, 120-752 Korea

(Received: September 30th, 2010; Accepted: October 25th, 2010)

Abstracts : Many studies have found adult stem cells in human teeth or correlated tissues. However, most of these stem cells were found in the permanent teeth or pulp from exfoliated deciduous teeth. The aim of the present study was to characterize stem cells isolated from the functional dental pulp and periodontal ligament of deciduous teeth. Dental pulp tissue was obtained from deciduous teeth by extirpation during treatment for dental caries, and periodontal tissue was obtained from deciduous teeth that were extracted for orthodontic reasons or space management. We observed cell outgrowth from these tissues in ‘explants culture’, and named these cells as deciduous dental pulp stem cells (DDPSCs) and deciduous periodontal ligament stem cells (DPDLSCs), respectively. These stem cells presented embryonic stem cell markers (Oct-4 and Nanog), an ectomesenchymal stem cell marker (Nestin), and mesenchymal stem cell markers (Stro-1 and CD146). In differentiation media, DDPSCs and DPDLSCs were able to change into cells that produce lipid vacuoles or cells that induce extracellular mineral aggregation, expressing genes correlated with adipogenesis (PPAR γ 2 and LPL) or osteogenesis (ALP and BSP), respectively. This is the first report of the presence of multipotent stem cells in the functional dental pulp and periodontal ligament tissue of deciduous teeth, which can be isolated using an explants culture method. These tissues can be obtained easily during routine dental procedures, and could therefore represent a good source of adult stem cells for use in regenerative medicine.

Key words: deciduous teeth, dental pulp, periodontal ligament, stem cells, explants culture

1. 서 론

최근 다분화 가능 성체 줄기 세포의 추출 및 재생 의학의 응용에 대한 많은 연구가 이루어지고 있는데 치아 및 주변 간엽 조직에서도 다분화 가능 줄기세포들이 존재한다는 것이 보고 되었다.^{1,2} 법랑질을 제외한 치아 및 그 주

변조직들은 발생학적으로 외배엽성 중간엽(ectomesenchyme) 조직에서 유래한 세포들로부터 발생되기 때문에³ 여기에서 나온 성체줄기세포는 골조직^{4,5}, 연골조직^{6,7}, 상아질 조직^{8,9}, 백악질 조직^{10,11}, 근육조직¹², 혈관조직¹³, 지방조직^{5,6}과 같은 중배엽성 조직으로 분화가 가능한 동시에 신경조직¹⁴과 같이 외배엽성 조직으로의 다양한 분화가 가능한 것으로 보고되고 있다.

치아 및 그 주변조직에서 얻을 수 있는 성체줄기세포는 치수조직¹⁵ 내에 존재하는 세포(dental pulp stem cells,

[†]These authors equally contributed to this work
*Tel: +82-2-2228-3064; Fax: +82-2-312-8012
e-mail: hsjung@yuhs.ac (Han-Sung Jung)

DDPSC), 미성숙 영구치 치근단 부위^{16,17}에서 얻을 수 있는 세포(stem cells from apical pulp, SCAP), 맹출 중인 치낭¹⁸에서 얻을 수 있는 세포(dental follicular precursor cells, DFPC), 그리고 치주인대¹⁰ 세포(periodontal ligament stem cells, PDLSC)등이 알려져 왔다. 유치의 경우에는 흡수 탈락되고 있는 유치의 치수^{19,20} 혹은 발거된 선천치 치수²¹에서 얻을 수 있는 세포(stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHED)가 보고되었다.

특히 자연적으로 탈락하는 유치의 경우 골수나 지방조직과는 달리 비침습적인 방법으로 얻을 수 있다는 장점뿐만 아니라 세포증식율이 높기 때문에 줄기세포의 원천으로서 주목을 받고 있다.^{19,22-24} 탈락 유치 줄기세포(SHED)는 유전자 발현 양상이나 증식 및 분화 양상에서 영구치 치수 줄기세포와 다른 점이 보고되고 있는데²² 탈락 유치 치수 줄기세포는 영구치 치수 줄기세포와 달리 상아질-치수 복합체를 잘 형성하지 못하며 골형성을 유도하는 역할을 할 수 있는 것으로 보고되었다.^{1,19} 한편 현재까지 유치의 치주인대에서 성체줄기세포 치주인대에서의 다분화 가능 줄기세포는 보고된 바가 없었다. 하지만 영구치의 치주인대에서 줄기세포(PDLSC)가 보고되었기 때문에 유치의 치주인대에서도 유사하지만 약간은 다른 특성을 가진 줄기세포가 존재할 것이라고 추정할 수 있을 것으로 보인다. 이러한 유치의 치주인대조직은 탈락 유치에서는 쉽게 얻을 수 없지만 치과 진료 과정 중 공간관리 및 교정적 목적으로 발거된 유치로부터 쉽게 얻을 수 있다.

한편 영구치의 치수에서 줄기세포를 얻는 경우는 주로 발거된 제3대구치²⁵나 혹은 외상에 의해 노출된 치수⁷에서 얻었다. 유치 치수의 경우에는 발거된 유치에서 얻었다.^{19,20} 그러나 아직까지 정상적으로 기능하고 있는 유치의 치수에서 얻을 수 있는지는 연구된 바가 없었다. 유치의 경우 치아우식증 치료 과정 중 기계적 치수 노출이 있는 경우에 치수를 제거하게 되는데 이 때에도 탈락 유치의 치수에서 얻을 수 있는 줄기 세포와 유사한 세포를 얻을 수 있을 것으로 추정된다.

소아 연령에서 얻은 세포는 특히 세포 활성도가 높으며 특히 소아치과 진료 과정 중 자연스럽게 얻을 수 있는 유치의 치수와 치주인대 조직으로부터 줄기 세포를 얻어 보관 및 사용할 수 있다면 재생의학적 관점에서 보다 유리하다고 할 수 있을 것으로 보인다. 따라서 본 연구는 유치의 치료 과정 중 얻을 수 있는 치수 및 치주인대에서 다분화가능 성체줄기세포를 분리하고 그 특성을 분석해 보고자 한다.

2. 방 법

2.1 유치로부터 일차배양(Primary Culture from Deciduous Teeth)

유치로부터 줄기세포의 일차배양은 연세대학교 치과대학 기관관리위원회로부터 승인(2-2010-0019)과 환자 및 보호자의 동의를 받고서 이루어졌으며 만 2-14세의 건강한 남녀 8명(남자4 명, 여자 4명)으로부터 조직을 얻었다. 유치 치주인대 조직은 영구치 이소 맹출로 인한 교정적 목적으로 발거된 유전치에서 얻었으며($n=4$) 치수 조직은 충치 치료 중 기계적 노출에 의해 치수치료를 진행해야 하는 유전치와 제1유구치에서 얻었다($n=4$). 조직으로부터의 일차배양은 explants culture법을 이용하였다. 치주 인대 조직의 경우 치은접합부위(gingival attachment)와 치근단에서 최소 2 mm 떨어진 부위에서 #15 blade를 이용하여 조직을 조심스럽게 분리하였으며 치수 조직은 barbed broach로 치수 조직 전체를 분리하였다. 얻어진 조직은 1 mm³의 크기로 잘게 자른 후 60 mm culture dishes (BD Falcon, Lincoln Park, NJ, USA)위에 올려 놓고 counting chamber cover glass (Superior, Germany)를 덮어 세포가 자라나오도록 하였다. 배양에 사용된 배지는 α -minimum essential medium (α -MEM; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL), 100 U/ml of penicillin and 100 μ g/ml of streptomycin (Gibco BRL), 2 mM L-glutamine (Gibco BRL), 10 mM L-ascorbic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 사용하였으며 37°C, 5% CO₂의 습윤환경에서 배양하였다. 유치의 치수 및 치주조직으로부터 자라나온 세포는 각각 deciduous dental pulp stem cells (DDPSCs), deciduous periodontal ligament stem cells (DPDLSCs)로 명명하고 10일 후 계대 배양하였으며 각각 4개의 세포주를 2계대에서 동일한 수로 섞어서 실험을 진행하였다. 각 실험은 최소 2번 반복하여 결과의 유의성을 확인하였다.

2.2 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)을 통한 줄기 세포 관련 유전자 발현 확인

배양된 줄기 세포에서 배아줄기세포(embryonic stem cells, ES cells)의 표지자인 Oct-4 및 Nanog 및 외배엽성 간엽줄기세포(ectomesenchymal stem cells, EMSCs)의 표지자인 Nestin의 mRNA의 발현을 RT-PCR을 통해 확인하였다. 세 번 계대 배양한 세포로부터 total RNA를 추출하였는데, 세포로부터 total RNA의 분리는 RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) 을 사용하였다. 이후 Nanodrop ND-1000[®] (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) 분광광도계를 사용하여 280 nm 및 260 nm에서의 흡광도를 측정 후 정량하였다. 각각의 total RNA 1 μ g을 oligo (dT)₁₅ primer를 함유한 Maxime RT premix kit (Intron biotechnology, Seoul, Korea)에 넣고 멸균된 증류수를 섞어 총 20 μ l가 되도록 한 후 45°C에서 1시간,

95°C에서 5분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)은 Maxime PCR PreMix Kit (*i-StarTaq*) (Intron biotechnology)를 사용하여 시행하였다. 합성된 cDNA 1 µl, 10 pmol/µl의 forward 및 reverse primer를 각각 1 µl를 넣고 최종 부피가 20 µl이 되도록 멸균된 증류수로 희석하였다. 초기 denaturation으로서 95°C에서 2분간 시행한 다음 denaturation을 94°C에서 20초, annealing은 60°C에서 10초, extension은 72°C에서 20초간 적절한 cycle로 진행하고 final extension은 72°C에서 5분간 시행하였다(Swift™ MaxPro Thermal Cyclers; ESCO, Singapore). 실험에 사용된 primer의 종류와 반응조건은 Table 1에 표기하였다. Housekeeping 유전자인 human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 PCR 양성 반응의 확인을 위하여 같이 시행하였다. PCR반응 완료 후, 반응 생성물들은 6× LoadingStar (DyneBio, Sunnam, Korea)와 섞어 2% agarose gel에 전기 영동하였으며 UV light 하에 ChemiDoc XRS (BIO-RAD Lab, Richmond, CA, USA)로 영상을 촬영하였다.

2.3 유세포 분석(Flow Cytometry Analysis)을 통한 간엽성 줄기세포 표지자 확인

유치 줄기세포에서 간엽성 줄기세포(mesenchymal stem cells, MSCs) 관련 표지자인 Stro-1과 CD146의 발현양상을 유세포 분석법을 이용하여 확인하였다. 세 번 계대 배양된 세포들을 인산염 완충 식염수(phosphate buffered saline, PBS, pH=7.2)로 두 차례 세척한 후 trypsin이 들어있지 않은 cell

dissociation buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 세포를 떼어내었다. 500 g의 원심력으로 5분 동안 세포를 침전시킨 후 다시 1×10⁶ cells/ml의 농도로 flow cytometry staining buffer (eBioscience, San Diego, CA, USA)에 부유시켰다. 1차 항체로서 monoclonal anti-human Stro-1 (IgM; R&D system, Minneapolis, MN, USA)를 5 µg/10⁶ cells 농도로 넣었으며 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. flow cytometry staining buffer로 두 번 세척 후 2차 항체로서 R-phycoerythrin (R-PE)이 결합된 goat anti-mouse IgM (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA)를 0.1 µg/1×10⁶cells 농도로 4°C에서 30분 동안 반응시켰다. CD146의 경우에는 fluorescein isothiocyanate-(FITC)가 미리 결합된 anti-human CD146 (eBioscience)를 20 µl/10⁶ cells 농도로 넣고 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 대조군은 1차 항체를 생략하고 진행하였다. 염색된 세포들은 FACSCalibur™ Flow Cytometer (BD Biosciences)로 형광량을 측정하였으며 FCSExpress V3 software (De Novo Software, Thornhill, ON, Canada)로 발현양상을 분석하였다.

2.4 면역조직염색(Immunohistochemistry)을 통한 조직 내 간엽성 줄기세포 확인

Stro-1의 조직 내 발현양상을 면역조직염색을 통해 확인하였다. 교정적 목적으로 발거 된 유견치를 24시간 동안 10% natural-buffered formalin (Sigma)에 담가 고정된 후 2주간 10% EDTA (pH=7.4)로 탈회시켰다. 이후 파라핀에 매몰하여 5 µm 두께로 자른 후 슬라이드를 제작하였다. 항원성 부

Table 1. RT-PCR and quantitative RT-PCR primers used in this study

Genes	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)	Cycles	Reference
Oct-4	F: CGACCATCTGCCGCTTTGAG R: CCCCTGTCCCCATTCCTA	573	29	39
Nanog	F: TGCAAATGTCTTCTGCTGAGAT R: GTTCAGGATGTTGGAGAGITC	287	29	39
Nestin	F: GCCCTGACCACTCCAGTTTA R: GGAGTCCTGGATTCCTTCC	200	31	40
GAPDH	F: AGGTGAAGGTCGGAGTCAACG R: GCTCCTGGAAGATGGTGATGG	231	25	41
PPAR γ2	F: ACAGCAAACCCCTATTCATGCTGT R: TCCCAAAGTTGGTGGGCCAGAA	159	45*	This study
LPL	F: TGGACTGGCTGTCACGGGCT R: GCCAGCAGCATGGGCTCCAA	167	45*	This study
ALP	F: GGACCATTCACACGCTTCAC R: CCTGTAGCCAGGCCATTG	137	45*	39
BSP	F: CTGGCACAGGGTATACAGGGTTAG R: ACTGGTGGCCGTTTATGCCTTG	182	45*	42
GAPDH	F: TCCTGCACCACCAACTGCTT R: TGGCAGTGTGGCATGGAC	100	45*	42

* quantitative RT-PCR

활을 위해 sodium citrate buffer (10 mM, pH6.0)하에 10분간 열처리한 후 내인성 peroxidase 활성을 억제하기 위해 상온에서 3% H₂O₂를 10분간 처리하였다. 비특이적인 반응을 억제하기 위하여 5% bovine serum albumin (Sigma)을 30분 동안 처리한 후 1차 항체로서 anti-human Stro-1를 1:400으로 희석하여 실온에서 1시간 및 4°C에서 밤샘 처리하였다. 2차 항체로서 biotin이 표지된 goat anti-mouse IgM (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA)을 1:100으로 희석하여 30분간 실온에서 처리하였다. 이후 발색은 LSAB™ Kits (Dako Co., Carpinteria, CA, USA)을 사용하였다. Streptavidin-HRP을 10분간 실온에서 처리한 후 DAB (Diaminobenzidine)을 1분간 처리하여 발색시켰다. 대조염색으로서 Gill's hematoxylin (Sigma)을 1분간 처리한 후 탈수 및 봉입과정을 거쳐 광학현미경으로 관찰하였다. 대조군의 경우 1차 항체를 생략하고 진행하였다.

2.5 지방세포 및 경조직 형성 세포로의 분화유도 (Adipogenic and Osteogenic Differentiation)

유치로부터 얻은 줄기 세포의 지방세포로의 분화 능력과 경조직 생성 세포로의 분화능력을 확인하기 위하여 3-6계대의 세포를 12 well 배양용기에 1×10⁴ cells/cm² 농도로 분양한 다음 세포가 거의 차게 될 때 분화 배지로 교환하였다. 대조군은 일반 배양 배지를 같은 일정으로 처리하였으며 3일에 한 번씩 배지를 교환하였다.

지방세포로의 분화는 분화 유도 배지[α-MEM 배지에 10% FBS, 1% antibiotics, 1 μM dexamethasone (Sigma), 10 μg/ml human insulin (Sigma), 100 μM indomethacin (Sigma), 500 μM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX; Sigma)를 첨가]를 10일 간 처리한 후 분화 유지 배지(α-MEM 배지에 10% FBS 및 1% antibiotics, 10 μg/ml human insulin을 첨가)를 10일간 추가로 처리하였다. 분화를 확인하는 방법으로서 Oil Red O 염색을 시행하였다. Oil Red O 염색은 세포를 10% natural-buffered formalin 에 4°C에서 30분간 고정한 후 0.2% Oil Red O (Sigma) 용액을 상온에서 10분간 적용시킨 다음 증류수로 세척한 후에 광학현미경으로 관찰하였다.

경조직 형성 세포로의 분화는 분화 배지 [α-MEM 배지에 10% FBS 및 1% antibiotics, 0.1 μM dexamethasone, 2 mM β-glycerolphosphate (Sigma) 및 50 μM ascorbic acid 2-phosphate (Sigma)를 첨가]를 5주간 처리하였다. 분화를 확인하는 방법으로서 석회화 결정을 Alizarin Red S 염색을 통해 확인하였다. Alizarin Red S 염색은 세포를 10% natural-buffered formalin로 고정한 후 2% Alizarin Red S (pH=4.2; Sigma) 용액을 5분간 적용시킨 다음 광학현미경으로 관찰하였다.

2.6 분화와 관련된 유전자의 정량적 역전사 중합효소 연쇄반응(Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR)

지방세포로의 분화와 관련된 유전자인 peroxisome proliferator-activated receptor γ2 (PPARγ2)와 lipoprotein lipase (LPL) 및 경조직 형성 세포로의 분화와 관련된 유전자인 alkaline phosphatase (ALP)와 bone sialoprotein (BSP)의 mRNA 발현양상을 정량적 역전사 중합효소 연쇄반응으로 분석하였다. Total RNA추출 및 cDNA제조는 상기에 기술된 RT-PCR방법과 동일하게 진행하였다. 반응액은 멸균 증류수 7 μl, forward 및 reverse primer (10 pmol/μl) 각각 1 μl, 합성된 cDNA 1 μl 및 2x SYBR Premix Ex Taq™ (Takara Bio, Otsu, Japan) 10 μl를 넣어 총 20 μl를 만들었으며 Thermal Cycler Dice™ real time system (Takara Bio)으로 증폭 및 형광을 검출하였다. 증폭과정은 초기 denaturation으로서 95°C에서 10초간 시행한 다음 denaturation을 94°C에서 5초, annealing은 60°C에서 15초, extension은 72°C에서 10초간 45회 진행하고 이후 60°C에서 95°C까지 dissociation 과정을 시행하였다. 사용한 primer의 조건은 Table 1와 같다. 최종 PCR 산물은 전기영동을 시행하여 다른 특이한 band가 나타나지 않는 것을 확인하였고 dissociation curve상에 특이한 peak가 없음을 확인하였다. 분화 전후의 각 mRNA의 상대적 발현량의 비교는 GAPDH를 기준으로 하여 2^{-ΔΔCt}법²⁶을 이용하였다. 결과는 평균값과 표준편차로 나타내었으며 분화 전후의 상대적인 발현량의 차이를 SPSS (version 17.0; Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 Wilcoxon signed rank test (p<0.05)로 통계 분석하였다.

3. 결 과

3.1 유치로부터 일차배양(Primary Culture from Deciduous Teeth)

배양 접시에 고정된 유치의 치수와 치주인대 조직에서부터 3-4일이 지나면 세포가 자라나오기 시작하였으며, 자

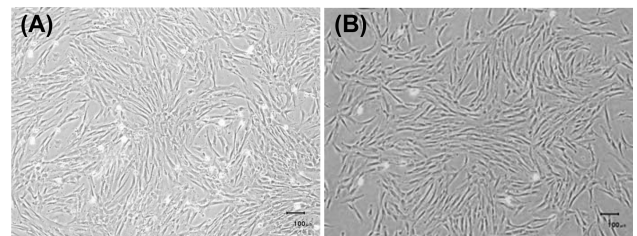


Figure 1. Morphology of stem cells obtained from deciduous teeth: (A) deciduous dental pulp stem cells (DDPSCs) and (B) deciduous periodontal ligament stem cells (DPDLSCs). Original magnification: ×40.

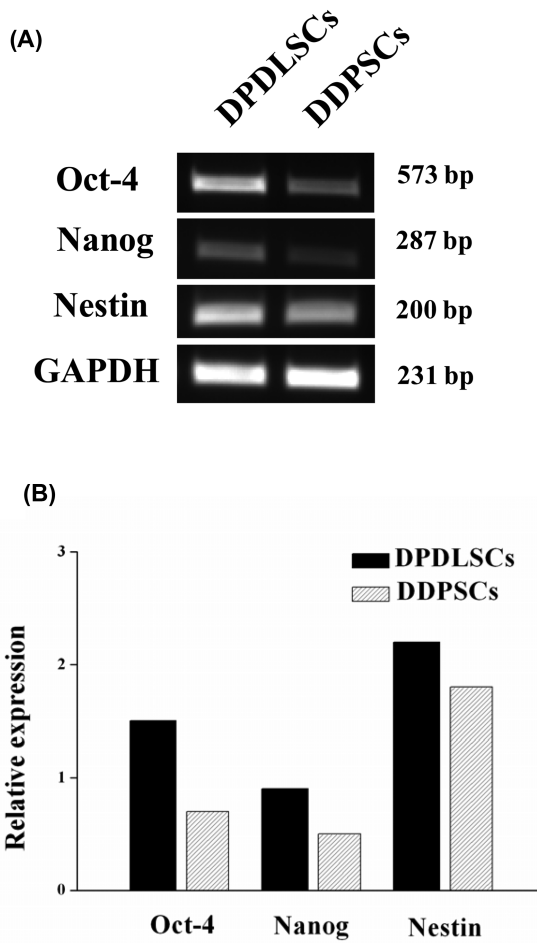


Figure 2. Expression of genes associated with embryonic stem cells (Oct-4 and Nanog) and ectomesenchymal stem cells (Nestin) in DDPSCs and DPDLSCs. (A) RT-PCR gels (B) Relative expression.

라나온 세포는 광학현미경 상에서 방추형이거나 혹은 섬유모세포와 유사한 형태를 보였는데(Fig 1), 치주인대에서 유래한 세포가 좀 더 방향성을 가지고 증식하는 양상이 관찰되었다.

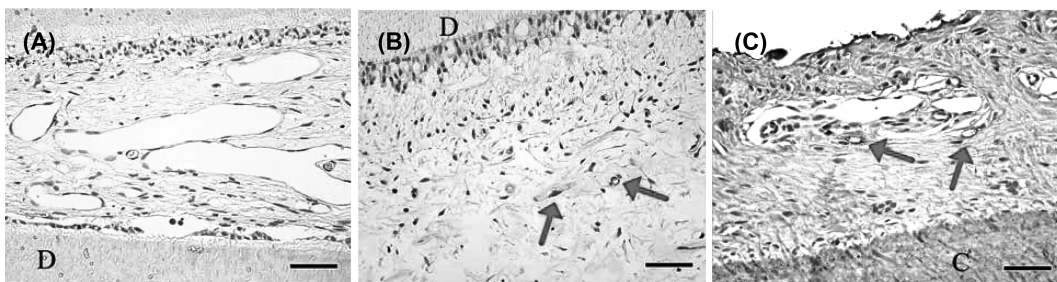


Figure 4. Immunohistochemical staining of Stro-1 marker (arrows) in the deciduous teeth. (A) Negative control; (B) dental pulp; (C) periodontal ligament (scale bars: 100 um). D, dentin; C, cementum.

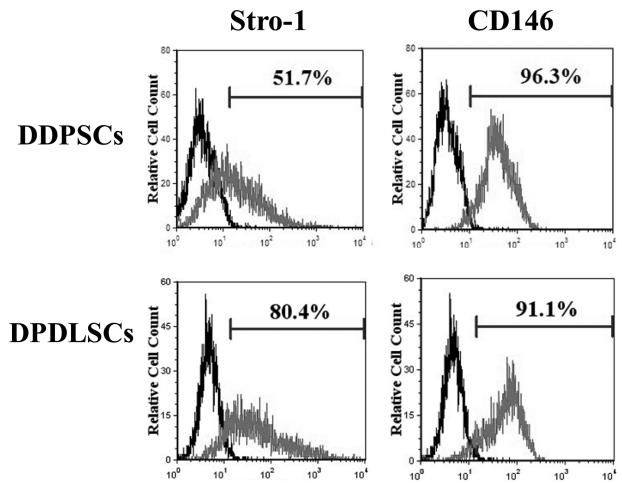


Figure 3. Flow cytometry analysis of mesenchymal stem cell markers (Stro-1 and CD146) in DDPSCs and DPDLSCs.

3.2 RT-PCR

분리 배양된 유치 줄기세포에서 발현되고 있는 mRNA를 RT-PCR로 분석한 결과 ES cell 표지자인 Oct-4 및 Nanog가 모두 발현되었으며 또한 EMSCs 표지자인 Nestin이 두 세포군에서 모두 발현되었다(Fig 2).

3.3 유세포 분석(Flow Cytometry Analysis)

유치 줄기세포에서 Stro-1과 CD146의 발현양상을 유세포 분석법을 이용하여 확인하였다. 두 세포군에서 Stro-1과 CD146 모두 발현이 되고 있었으며 Stro-1 보다는 CD146의 발현양이 더 많았다. 두 세포군 간에 전반적인 발현 형태는 비교적 유사하게 나타났다(Fig 3).

3.4 면역조직염색(Immunohistochemistry)

Stro-1의 조직 내 발현양상을 면역조직염색을 통해 확인하였다. Stro-1 표지자는 백악모세포(cementoblast)층이나 상아모세포(odontoblast)층과는 떨어져서 존재하였으며 혈관 주위에서 관찰되거나 세포밀집대(cell-rich zone)에서 관찰되

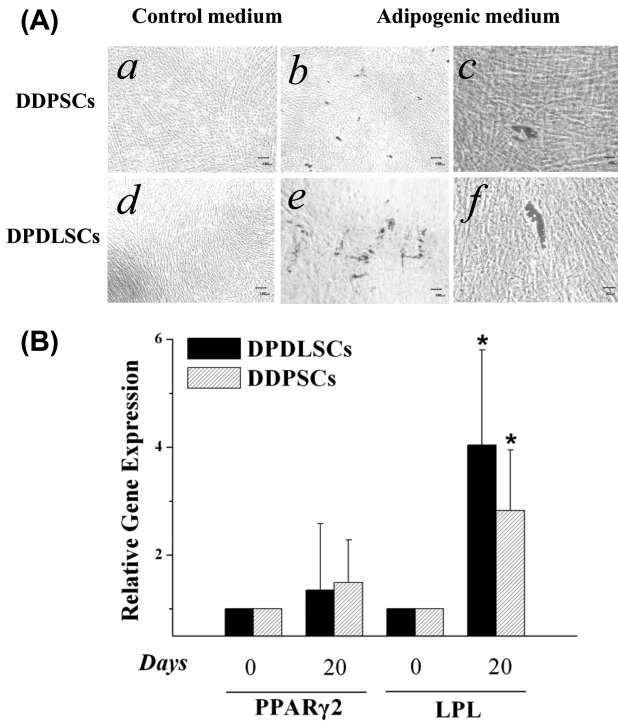


Figure 5. Adipogenic differentiation of DDPSCs and DPDLSCs. (A) Oil red O staining after 20 days of culture in adipogenic differentiation medium (b, c, e, and f) or control medium (a and d). Original magnifications: a and d, $\times 100$; b and e, $\times 50$; c and f: $\times 200$. (B) Changes in the expressions of peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma 2$ (PPAR $\gamma 2$) and lipoprotein lipase (LPL) after adipogenic differentiation. * $p < 0.05$, Wilcoxon signed rank test.

었다(Fig 4).

3.5 지방세포 및 경조직 형성 세포로의 분화유도 (Adipogenic and Osteogenic Differentiation)

유치 줄기세포의 지방세포 및 경조직 형성 세포로의 분화를 세포화학적 염색법과 정량적 RT-PCR로 확인하였다. Oil red O 염색 결과 지방세포로의 분화가 관찰되었으나 그 수는 비교적 적었다. 정량적 RT-PCR 분석 결과 분화를 시키지 않은 군에 비하여 분화를 시킨 군에서 PPAR $\gamma 2$ 와 LPL의 발현이 증가한 것이 관찰되었다(Fig 5).

경조직 생성 세포로의 분화는 Alizarin red S 염색을 통해 볼 때 지방세포로의 분화보다 더 잘 일어나는 것이 관찰되었다. 정량적 RT-PCR 분석 상 분화를 시키지 않은 군에 비하여 분화를 시킨 군에서 ALP 및 BSP의 발현이 점차 증가하는 것이 관찰되었다(Fig 6).

4. 고 찰

사람의 치아는 유치와 영구치라는 두 가지 종류를 가지

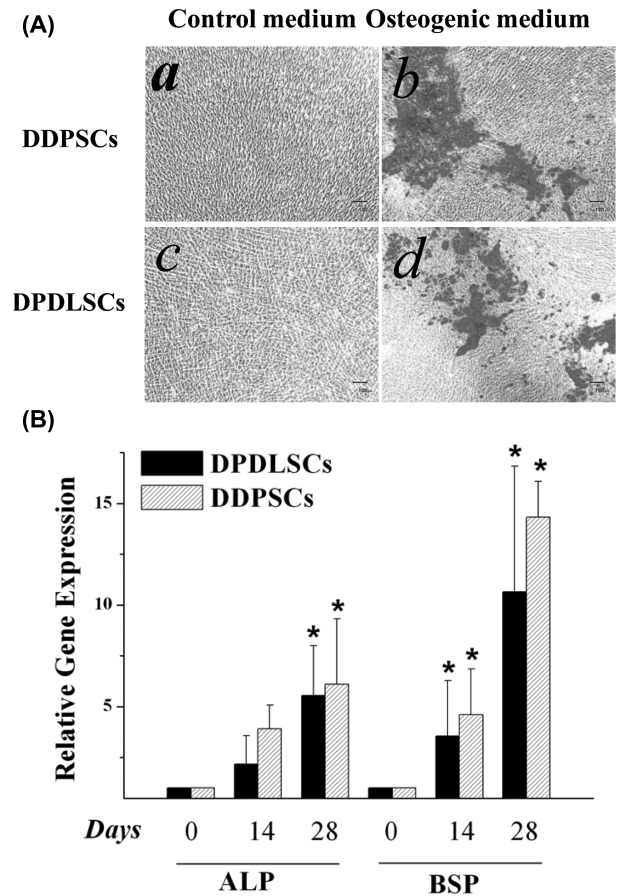


Figure 6. Osteogenic differentiation of DDPSCs and DPDLSCs. (A) Alizarin red S staining after 5 weeks of culture in osteogenic differentiation medium (b and d) or control medium (a and c). Original magnification: $\times 100$. (B) Changes in the expressions of alkaline phosphatase (ALP) and bone sialoprotein (BSP) during osteogenic differentiation. * $p < 0.05$, Wilcoxon signed rank test.

고 있다. 유치는 영구치와는 비슷하지만 조금은 다른 형태학적 조직학적 특징을 가지고 있으며 여기에서 유래한 줄기세포 또한 세포성장률의 차이나 유전자의 발현의 차이를 보이는 것이 밝혀졌다.^{19,22} 유치와 영구치에서 얻은 줄기세포 간에 어떠한 차이점이 더 존재하는지는 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료되나 무엇보다 유치에서 얻은 줄기세포는 세포증식률이 높고 비침습적으로 얻을 수 있다는 점에서 향후 줄기세포의 채취 및 보관에 있어 줄기세포의 주요한 공급원이 될 가능성이 높아 보인다.

본 연구에서 유치의 치수와 치주인대에 유래한 세포들은 배아줄기세포의 표지자인 Oct-4와 Nanog의 발현뿐만 아니라 외배엽성 중간엽 줄기세포 표지자인 Nestin의 발현도 관찰되었다. 또한 골수조직이나 지방조직 등 간엽조직 내에서 혈관주위(perivascular niche)나 혹은 신경다발주위 세

포에서 주로 발견되는 초기 간엽성 줄기세포 표지자로 알려진 Stro-1^{27,28}과 역시 주로 혈관주위에 분포하는 세포에서 관찰되며 간엽성 줄기세포 표지자로 알려진 CD146²⁷⁻²⁹의 존재도 확인되었다. 이는 유치도 영구치와 같이 치수와 치주인대 조직이 외배엽성 중간엽(ectomesenchyme)에서 유래한 세포들로부터 발생되기 때문에 그 특성을 가지고 있는 것으로 여겨진다.³

본 연구에서는 유세포 분석 상 유치의 치수 줄기세포(DDPSCs)와 치주인대 줄기세포(DPDLSCs)간에 Stro-1의 발현에 있어서 약간의 차이(51.7% vs. 80.4%)를 관찰할 수 있었는데 치주인대 줄기세포(DPDLSCs)에서 보다 더 관찰되었다. 이는 영구치 치주인대 줄기세포(PDLSC)가 치수 기원 줄기세포(DPSC)보다 세포증식률이 높고^{30,31} 간엽성 줄기세포능의 측정인자 중 하나로 알려져 있으며 Stro-1 및 CD146을 발현하는 세포에서 증가²⁹한다고 알려진 colony forming unit (CFU)이 더 많으며³¹ 골성 분화 시 관련 유전자(Osteocalcin, Runx2³² 및 ALP³³)의 발현이 보다 높다는 보고^{31,33}와 맥을 같이하는 것으로 보인다. 그러나 두 세포군 간에 Stro-1의 발현에 큰 차이가 없으며^{32,33} CD146은 오히려 DPSC에서 더 많이 나타난다는 보고³³도 있었다. 따라서 치수와 치주인대 유래 줄기세포 간에 표지자의 발현양상이나 줄기세포능에 있어서 어떤 차이가 있는지 유치의 경우에는 어떠한지 좀 더 확인해 볼 필요가 있을 것으로 보인다. 한편 Stro-1의 발현되는 세포의 비율이 다른 치아 관련 줄기세포에서 나타나는 비율(SHED: 9.6%, DPSC: 5-10%, SCAP: >18%, PDLSC: 3-27%)^{1,19,34,35}보다 비교적 높게 발현이 되었다. 이는 원래 정상 유치조직에서 나온 줄기세포에서 높은 발현을 보인다고 생각할 수도 있으나 실험조건의 다양성이나 explants culture법을 사용한 것에 의한 영향일 수도 있어 좀 더 연구가 필요할 것으로 여겨진다.

유치의 치수 줄기세포(DDPSCs)와 치주인대 줄기세포(DPDLSCs)는 비록 적은 수이기는 하지만 지방세포로 분화될 수 있었으며 경조직을 생성하는 세포로의 분화도 일어났다. 지방세포로의 분화가 경조직을 생성하는 세포로의 분화보다 잘 일어나지 않게 보이는 것은 그 유래가 원래 상아질이나 백악질 혹은 골과 같은 경조직을 생성하는 세포이기 때문인 것으로 추정할 수 있을 것이며 본 연구의 면역조직화학 검사 결과 Stro-1을 발현하는 세포가 분화된 상아모세포나 백악모세포로부터 떨어져서 분포하며 필요시 치아조직이나 골조직을 생성하는 세포로 분화될 수 있는 세포라는 점에서도 유추해 볼 수 있을 것이다.³

조직으로부터 세포를 일차 배양하는 방법에는 효소처리법(enzymic disaggregation), 물리적 분쇄(mechanical disaggregation), 그리고 explants culture법 등이 있는데³⁶ 본 연구에서는 explants culture법을 사용하였다. explants

culture법은 조직을 잘게 자른 다음 배양접시에 고정시킨 후 세포가 자라나오도록 하는 방법이다. 이 방법의 경우에는 비록 시간은 많이 걸리지만 보다 균일한 세포군을 얻을 수 있고 조직이 적은 경우에 유리하며 비용을 줄일 수 있는 점이 장점이 될 수 있다. 특히 치근이 흡수되고 있는 유치의 치주인대 조직의 경우 그 양이 적을 수 밖에 없기 때문에 이 방법에 의한 줄기세포의 분리가 보다 유리할 것으로 여겨진다. 대부분 치아관련 조직에서 효소처리법에 의해 줄기세포를 얻어 왔으나^{1,23,34,37} 최근 explants culture법으로 분리한 치수 줄기세포가 증식률이 높고 근육세포로의 분화에 보다 유리하다는 보고가 있어³⁸ 세포 분리방법에 따른 줄기세포의 특성이 어떻게 다른지에 대해 좀 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론적으로 본 연구는 정상 유치의 치수와 치주인대로부터 성체줄기세포를 explants방법으로 분리 배양하여 줄기세포 관련 표지자(Oct-4, Nanog, Nestin, Stro-1, CD146)의 발현 및 지방조직과 경조직으로의 분화 가능성을 확인하였다. 또한 치아줄기세포를 보관하고 응용하는 데 있어서 유치의 치료 과정 중 자연스럽게 얻을 수 있는 유치 조직을 활용 가능하다는 점과 특히 유치의 치주인대에서 최초로 분화 가능한 줄기세포를 얻었다는 점이 의의라고 할 수 있을 것이다. 향후 유치에서 얻은 줄기세포의 조직공학에서의 응용가능성 및 영구치 유래 줄기세포와의 차이 등에 관한 좀 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

감사의 글: 본 연구는 연세대학교 치과대학 2009년도 교수연구비에 의하여 이루어졌음(6-2009-0038).

참고문헌

1. GT Huang, S Gronthos, S Shi, Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine, *J Dent Res*, **88**, 792 (2009).
2. C Morsczeck, G Schmalz, TE Reichert, *et al.*, Somatic stem cells for regenerative dentistry, *Clin Oral Investig*, **12**, 113 (2008).
3. A Nanci, AROh Ten Cate, Ten Cate's oral histology : development, structure, and function, 7th ed. / Antonio Nanci. ed, *St. Louis, Mo. ; [London]: Mosby*, (2008).
4. D Ma, Z Ma, X Zhang, *et al.*, Effect of age and extrinsic microenvironment on the proliferation and osteogenic differentiation of rat dental pulp stem cells in vitro, *J Endod*, **35**, 1546 (2009).
5. W Sonoyama, Y Liu, T Yamaza, *et al.*, Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study, *J Endod*, **34**, 166 (2008).
6. SH Lee, YS Sohn, YW Choi, *et al.*, Culture of Mesenchymal Stromal Cells from Dental Pulp: Culture Medium Study for Effective Expansion and Characterization, *Tissue Eng Regen*

- Med*, **7**, 248 (2010).
7. AH Huang, YK Chen, AW Chan, *et al.*, Isolation and characterization of human dental pulp stem/stromal cells from nonextracted crown-fractured teeth requiring root canal therapy, *J Endod*, **35**, 673 (2009).
 8. ML Couble, JC Farges, F Bleicher, *et al.*, Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures, *Calcif Tissue Int*, **66**, 129 (2000).
 9. K Iohara, L Zheng, M Ito, *et al.*, Side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis, and neurogenesis, *Stem Cells*, **24**, 2493 (2006).
 10. BM Seo, M Miura, S Gronthos, *et al.*, Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament, *Lancet*, **364**, 149 (2004).
 11. BM Seo, M Miura, W Sonoyama, *et al.*, Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament, *J Dent Res*, **84**, 907 (2005).
 12. I Kerkis, CE Ambrosio, A Kerkis, *et al.*, Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic?, *J Transl Med*, **6**, 35 (2008).
 13. K Iohara, L Zheng, H Wake, *et al.*, A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: subfraction of side population cells from dental pulp, *Stem Cells*, **26**, 2408 (2008).
 14. C Morsczech, F Vollner, M Saugspier, *et al.*, Comparison of human dental follicle cells (DFCs) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) after neural differentiation in vitro, *Clin Oral Investig*, (2009).
 15. S Gronthos, M Mankani, J Brahimi, *et al.*, Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13625 (2000).
 16. I Kerkis, A Kerkis, D Dozortsev, *et al.*, Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers, *Cells Tissues Organs*, **184**, 105 (2006).
 17. S Abe, S Yamaguchi, A Watanabe, *et al.*, Hard tissue regeneration capacity of apical pulp derived cells (APDCs) from human tooth with immature apex, *Biochem Biophys Res Commun*, **371**, 90 (2008).
 18. S Yao, F Pan, V Prpic, *et al.*, Differentiation of stem cells in the dental follicle, *J Dent Res*, **87**, 767 (2008).
 19. M Miura, S Gronthos, M Zhao, *et al.*, SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 5807 (2003).
 20. AH Huang, YK Chen, LM Lin, *et al.*, Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth, *J Oral Pathol Med*, **37**, 571 (2008).
 21. E Karaoz, BN Dogan, A Aksoy, *et al.*, Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth, *Histochem Cell Biol*, (2009).
 22. S Nakamura, Y Yamada, W Katagiri, *et al.*, Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp, *J Endod*, **35**, 1536 (2009).
 23. V Arora, P Arora, AK Munshi, Banking stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): saving for the future, *J Clin Pediatr Dent*, **33**, 289 (2009).
 24. N Koyama, Y Okubo, K Nakao, *et al.*, Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells, *J Oral Maxillofac Surg*, **67**, 501 (2009).
 25. S Shi, PG Robey, S Gronthos, Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis, *Bone*, **29**, 532 (2001).
 26. KJ Livak, TD Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods*, **25**, 402 (2001).
 27. S Shi, S Gronthos, Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp, *J Bone Miner Res*, **18**, 696 (2003).
 28. NH Lin, D Menicanin, K Mrozik, *et al.*, Putative stem cells in regenerating human periodontium, *J Periodontol Res*, **43**, 514 (2008).
 29. AC Zannettino, S Paton, A Arthur, *et al.*, Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo, *J Cell Physiol*, **214**, 413 (2008).
 30. SH Chen, T Inoue, M Shimono, An experimental study of osteogenesis in explants of rat dental pulp, periodontal ligament, bone marrow and muscle cells in vitro, *Bull Tokyo Dent Coll*, **30**, 155 (1989).
 31. YY Jo, HJ Lee, SY Kook, *et al.*, Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues, *Tissue Eng*, **13**, 767 (2007).
 32. B Lindroos, K Maenpaa, T Ylikomi, *et al.*, Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts, *Biochem Biophys Res Commun*, **368**, 329 (2008).
 33. LP Wu, X Wei, JQ Ling, *et al.*, The surface antigen expression of periodontal ligament cells and dental pulp cells in vitro, *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, **27**, 20 (2009).
 34. IC Gay, S Chen, M MacDougall, Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells, *Orthod Craniofac Res*, **10**, 149 (2007).
 35. J Xu, W Wang, Y Kapila, *et al.*, Multiple differentiation capacity of STRO-1+/CD146+ PDL mesenchymal progenitor cells, *Stem Cells Dev*, **18**, 487 (2009).
 36. RI Freshney, Culture of animal cells : a manual of basic technique, 5th ed. ed, *Hoboken, N.J.: Wiley-Liss, Chichester : John Wiley [distributor]*, (2005).
 37. CYC Huang, D Pelaez, JD Bendala, *et al.*, Plasticity of stem cells derived from adult periodontal ligament, *Regenerative Medicine*, **4**, 809 (2009).
 38. L Spath, V Rotilio, M Alessandrini, *et al.*, Explant-derived human dental pulp stem cells enhance differentiation and proliferation potentials, *J Cell Mol Med*, **14**, 1635 (2010).
 39. A Tomokiyo, H Maeda, S Fujii, *et al.*, Development of a multipotent clonal human periodontal ligament cell line, *Differentiation*, **76**, 337 (2008).
 40. MJ Honda, F Nakashima, K Satomura, *et al.*, Side population cells expressing ABCG2 in human adult dental pulp tissue, *Int Endod J*, **40**, 949 (2007).
 41. NM Lapsys, AD Kriketos, M Lim-Fraser, *et al.*, Expression of genes involved in lipid metabolism correlate with peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in human skeletal muscle, *J Clin Endocrinol Metab*, **85**, 4293 (2000).
 42. S Fujii, H Maeda, N Wada, *et al.*, Investigating a clonal human periodontal ligament progenitor/stem cell line in vitro and in vivo, *J Cell Physiol*, **215**, 743 (2008).