

탈락 유치 내 치수 세포의
보관 용액과 기간에 따른 생존

연세대학교 대학원

치 의 학 과

박 지 원

탈락 유치 내 치수 세포의
보관 용액과 기간에 따른 생존

지도교수 손흥규

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2013년 6월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

박 지 원

박지원의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2013년 6월 일

감사의 글

논문이 완성되기까지 아낌없는 격려와 조언을 아끼지 않으시고 지도해주신 손흥규 지도 교수님께 깊은 감사와 존경을 드립니다. 실험의 설계에서 완성까지 모든 과정을 열과 성으로 지도해주신 송제선 교수님, 명민한 지적과 조언으로 부족한 부분들을 보완할 수 있게 해주신 이제호 교수님, 늘 변함없는 관심을 보여주시고 힘이 되어 주시는 김성오, 정한성 교수님, 세심한 배려로 이끌어주신 최병재, 최형준, 이효설 교수님의 은혜에 감사드립니다.

또한 실험의 진행에 있어 꼭 필요한 조언들과 도움을 주신 전미정 연구원께 감사를 드리며, 바쁜 생활 속에서도 많은 도움을 준 수련 동기 효선이, 보람이, 해인이, 영문 초록 작성 도와주고 교정해 준 현모와 혜원이, 300명이 넘는 IRB 서류 마무리에 큰 힘이 되어준 수현이, 연옥이, 기훈이와 우리 담임반 학생들, 진료하는 틈틈이 신경쓰고 챙겨준 소아치과 위생사, 직원들 및 소아치과 의국원들에게 감사를 드립니다.

마지막으로, 저를 위하여 한결같은 사랑으로 기도해 주시는 부모님과 오빠에게 한없는 사랑과 감사한 마음을 전하고 싶습니다.

저 자 씬

차 례

그림 차례	II
표 차례	III
약어 목록	IV
국문 요약	V
I. 서론	1
II. 방법 및 대상	
1. 유치의 획득 및 보관	4
2. 유치 치수 조직의 분리 및 일차 배양	5
3. 통계 분석	6
III. 결과	
1. 일차배양	8
IV. 고찰	11
V. 결론	17
참고문헌	18
영문요약	22

그림 차례

Fig. 1. Primary culture from deciduous teeth.

(A) Deciduous tooth from a 10-year-old boy.

(B) Pulpal tissue was taken out with barbed broach.

(C) Pulpal tissue was cut off to several fragments at size of 1mm^3 and placed on a 60mm culture dish

(D) Pulpal tissue was covered with cover glass and incubated with culture medium at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO_2 .

.....6

Fig. 2. Primary culture from deciduous teeth.

(A) Pulpal cell outgrowth from pulp explants of fresh teeth.

(B) Failure of primary culture. Scale bars: 100 μm in A and B.

.....7

Fig. 3. Success of primary culture within pulp tissues of deciduous teeth conserved in cell culture medium (n=30), milk (n=30) and saline (n=30) for 2, 4 and 7 days, respectively. * Fisher's exact test ($p<0.05$).

.....10

표 차례

Table 1. Success rate of primary culture from deciduous pulp tissues
from fresh

teeth, dried teeth and teeth conserved in cell culture medium,
milk and saline for 2, 4 and 7 days, respectively.

.....9

약 어 목 록

α -MEM : α -minimum essential medium

FBS : Fetal Bovine Serum

국문 요약

탈락 유치 내 치수 세포의 보관 용액과 기간에 따른 생존

가정에서 유치가 탈락하였을 경우 쉽게 구할 수 있는 저장 용액에 보관한 후, 보관되었던 유치에서 세포를 배양할 수 있다면 지금보다 더 많은 유치로부터 줄기 세포를 추출할 수 있을 것이다. 본 연구는 유치의 치수 세포가 다양한 보관 용액의 종류와 기간에 영향을 받는지 확인해 보고자 하였다.

330개의 탈락 유치를 신선균, 건조균, 세포배양액 2, 4, 7일 보관균, 우유 2, 4, 7일 보관균, 생리식염수 2, 4, 7일 보관균으로 각각 30개씩 무작위로 나누었다. 각 균 간의 유치 치수 조직 세포의 일차 배양을 시행하여 성공한 개수와 실패한 개수를 계산하여 생존 성공율을 비교하였다.

일차 배양 결과 보관 기간이 늘어날수록 일차 배양 시 세포의 생존 성공율이 낮아지는 것으로 나타났다. 2일 보관균과 4일 보관균까지 세포배양액, 우유, 생리식염수 간의 보관 용액에 따른 성공율의 유의할 만한 차이는 없었다. 그러나 7일 보관균에서는 세포배양액에 비해 우유와

생리식염수에 보관한 유치에서 성공율이 유의하게 떨어지는 것으로 나타났다.

유치 발거 후 우유나 생리식염수 등의 보관용액에 일정 기간 보관 후 그
치수 조직을 세포 배양에 사용하는 것이 가능하지만 보관 기간이 길어질수록
세포 획득 가능성이 줄어든다.

핵심되는 말 : 유치 보관 용액, 치수 조직, 세포 생존, 우유, 생리식염수

탈락 유치 내 치수 세포의 보관 용액과 기간에 따른 생존

<지도교수 손 홍 규>

연세대학교 대학원 치의학과

박 지 원

I. 서론

성체 줄기 세포를 얻을 수 있는 치아 및 치아 주변 조직으로는 치수조직(Gronthos et al., 2000), 미성숙 영구치 치근단 부위(Abe et al., 2008; Kerkis et al., 2006) 맹출 중인 치낭(Yao et al., 2008), 그리고 치주인대(Seo et al., 2004) 등이 있다고 밝혀졌고, 유치의 경우 흡수 탈락된 유치의 치수조직(Miura et al., 2003), 발거된 선천치의 치수(Karaoz et al., 2010) 및 유치의 치주인대(Song et al., 2010)에서 줄기세포를 얻을 수 있다고 보고되었다.

영구치와 유치의 치수 조직에서 얻은 줄기 세포는 섬유모세포 형태로 나타나며, 이는 골모세포 (Ma et al., 2009; Sonoyama et al., 2008),

연골세포(Kerkis et al., 2006), 치아모세포(Couple et al., 2000; Seo et al., 2004), 근육세포(Kerkis et al., 2008), 혈관세포(Iohara et al., 2008), 지방세포(Sonoyama et al., 2008) 계열로 분화 가능하다고 알려졌다.

탈락된 유치에서 얻은 줄기세포는 골수나 지방조직과는 달리 비침습적으로 얻을 수 있으며, 영구치의 치수에서 얻은 줄기 세포와 비교하였을 때 흡수 탈락된 유치의 치수에서 얻은 줄기 세포에서 더 높은 증식률, 분화능을 보였다는 보고(Wang et al., 2012)가 있었다. 다분화능(pluripotency)과 관련된 유전자(OCT4, SOX2, NANOG, REX-1)의 발현이 높게 나타났고(Govindasamy et al., 2010) 세포 증식과 세포 외 바탕질(extracellular matrix) 관련 유전자, 특히 교원질(collagen; Col I, III, VII 및 XIII) 및 단백당(proteoglycan; glypican and versican) 관련 유전자의 높은 발현(Nakamura et al., 2009)을 보이는 것으로 보고되었다. 이러한 유치의 장점 때문에 최근 유치에서 얻은 조직을 간엽성 줄기 세포의 원천으로 사용하는 연구가 활발하게 이루어지고 있다(Arora et al., 2009; Kerkis and Caplan, 2012; Miura et al., 2003; Song et al., 2012).

치아를 용액에 보관하는 것에 대한 연구는 영구치의 이식이나 재식을 위한 치아 주변 인대 세포의 생존(Alacam et al., 1996; de Souza et al., 2012; Huang et al., 1996; Lin et al., 2000; Souza et al., 2010)과 관련된 연구가 선행되었으며, 유치의 경우에는 재식이나 이식하는 경우가 없어 현재까지 탈락 유치의 보관 용액 및 조건에 따른 추출 세포의 생존율이나 특성에 대한 보고는 없는 상태이다. 그러나 유치 줄기 세포에 대한 관심이

증가하면서 치과 및 집에서 발견된 유치 추출 세포의 생존율을 높이는 방법에 대한 연구가 필요하다고 판단되고, 가정에서 유치가 탈락하였을 경우 주변에서 쉽게 구할 수 있는 저장 용액에 유치를 보관한 후 줄기세포를 추출할 수 있다면 지금보다 더 많은 유치를 줄기 세포 연구와 줄기 세포를 이용한 치료에 이용할 수 있을 것이라고 예상된다.

본 연구에서는 탈락 후 다양한 보관 매체 내에서 일정 기간동안 보관 용액에 보관한 유치의 치수에서 세포를 배양하여, 유치 치수의 세포가 보관 용액의 종류와 기간에 영향을 받는지에 대하여 연구하였다.

II. 방법 및 대상

1. 유치의 획득 및 보관

이번 연구는 2012년 1월부터 2012년 12월까지 연세대학교 치과대학 기관윤리위원회로부터 승인(2-2011-0060)과 환아 및 보호자의 동의를 받고서 이루어졌으며 만 4세에서 14세 이하의 건강한 남자 어린이 171명과 여자 어린이 159명(총 330명)으로부터 한 환아 당 한 개의 유치를 얻어, 총 330개의 유치를 실험에 이용하였다.

실험은 연세대학교 치과대학병원 소아치과에 내원한 환자의 진료 중에 얻게 된 유치 중에서 자연탈락이 가까운 치근 1/3 이하 잔존한 유전치와 유구치, 공간 관리 교정의 목적으로 발거한 유치를 대상으로 하였고 심한 치아 우식증으로 인한 치수감염의 가능성이 있는 치아, 치주염이 있는 치아, 치근의 비정상적인 치근흡수나 내흡수가 존재하는 치아, 세포 대사에 영향을 줄 수 있는 특이한 전신질환이 있는 어린이에게서 발거한 유치는 제외시켰다.

유치를 발거한 후 11개 군에 각각 30개씩 무작위로 배정하였는데, 양성 대조군으로 발치 직후 실험한 신선군, 음성 대조군으로 2일간 상온에서 건조시킨 후 실험한 건조군, 생리식염수(중외제약, 서울, 대한민국), 우유(연세우유, 아산, 대한민국), 세포배양액에 각각 2일, 4일, 7일동안 4°C에서 보관한 후 실험한 실험군(세포배양액, 우유, 생리식염수 각각 2, 4, 7일군)으로 구분하였다.

세포배양액은 α - minimum essential medium (α - MEM; Invitrogen,

Carlsbad, CA, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen), 200 U/ml penicillin (Invitrogen), 300 µg/ml streptomycin (Invitrogen), 2mM L-glutamine (Invitrogen), 10 mM L-ascorbic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA), 2.5 µg/ml amphotericin B (Bristol-Myers Squibb, New York, USA)가 첨가된 용액을 사용하였다.

2. 유치 치수 조직의 분리 및 일차 배양(Primary culture)

세포의 1차 배양은 outgrowth method를 사용하였다. 발거된 유치의 치수 조직은 barbed broach (Mani, Inc, Utsunomiya Toshi-ken, Japan)를 이용하여서 치수 조직 전체를 분리해냈다(Figure 1A, 1B). 이렇게 얻어진 치수 조직은 1mm³ 내외의 크기로 잘게 자른 후 60mm culture dishes (BD Falcon, Lincoln Park, NJ, USA)위에 올려 놓고(Figure 1C) cover glass (Superior, Lauda-Königshofen, Germany)를 덮은 후 세포배양액을 첨가하였다(Figure 1D).

상기 배양 배지를 37°C의 온도, 5% CO₂의 습윤환경에서 배양하여 일주일 이 지난 후 관찰하였을 때 치수 조직으로부터 자라서 나오는 세포가 관찰되면 배양 성공으로 간주하였다. 유치 치수 조직의 일차 배양 성공 시에는 일주일 내에 전형적인 방추형의 섬유모세포 형태의 세포가 자라나오는 것이 관찰되었으며(Figure 2A), 배양 실패 시에는 일주일 이 지난 후에도 치수 조직으로부터 자라서 나오는 세포가 관찰되지 않았다(Figure 2B).

3. 통계 분석(Statistical analysis)

결과 분석은 SPSS (19.0, IBM, Chicago, IL, USA) 프로그램을 사용하였고 치수 세포 일차 배양 성공율은 fisher' s exact test ($p < 0.05$)를 시행하였다.

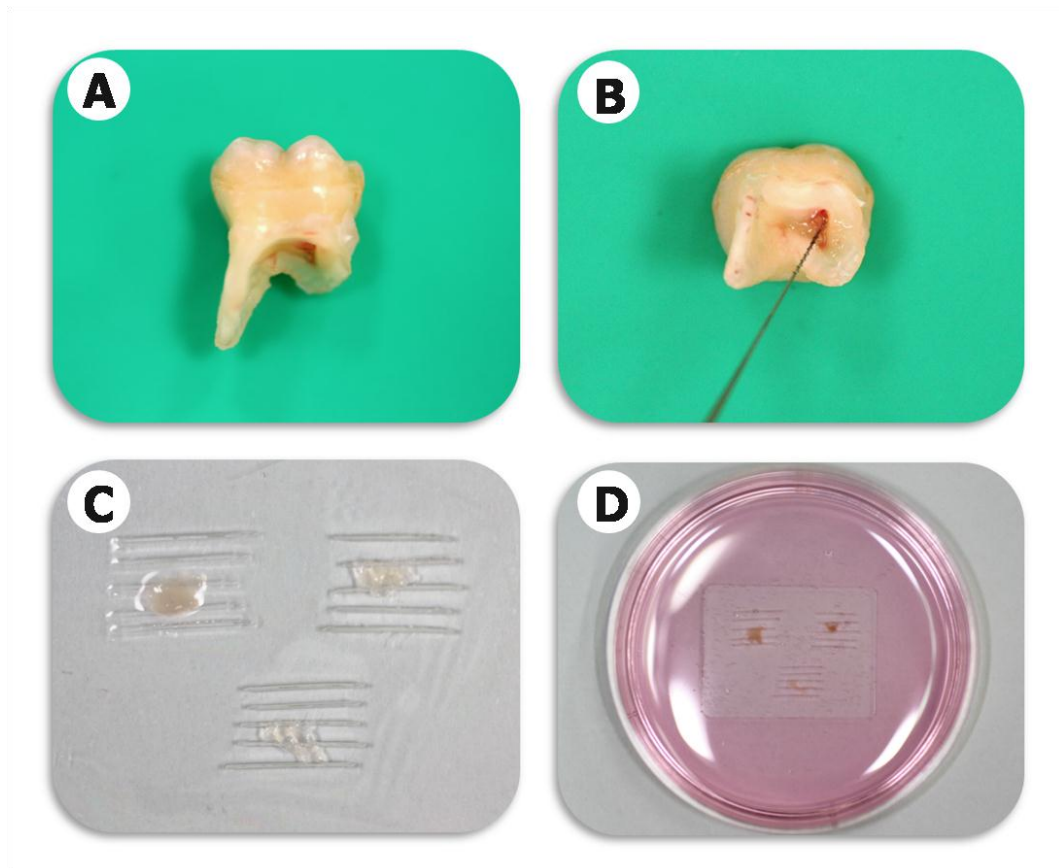


Fig. 1. Primary culture from deciduous teeth. (A) Deciduous tooth from a 10-year-old boy. (B) Pulpal tissue was taken out with barbed broach. (C) Pulpal tissue was cut off to several fragments at size of 1mm^3 and placed on a 60mm culture dish (D) Pulpal tissue was covered with cover glass and incubated with culture medium at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO_2 .

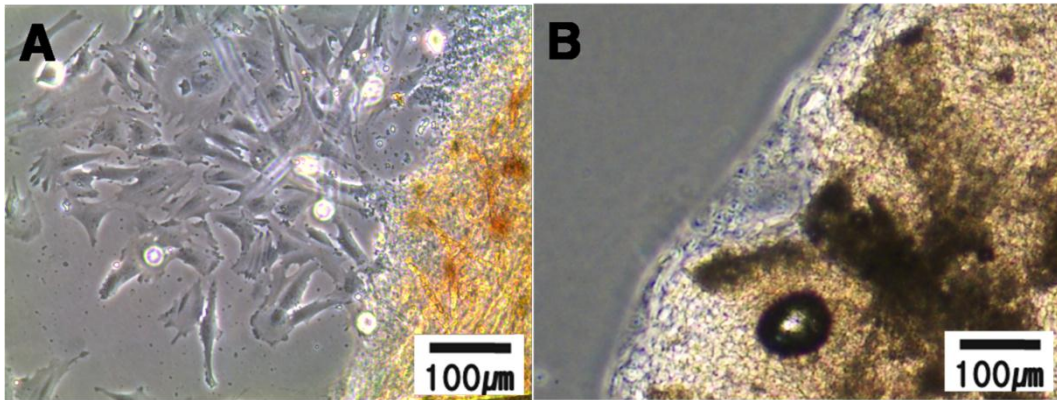


Fig. 2. Primary culture from deciduous teeth. (A) Pulpal cell outgrowth from pulp explants of fresh teeth. (B) Failure of primary culture. Scale bars: 100 μm in A and B.

Ⅲ. 결 과

1. 일차 배양(Primary culture)

신선균, 실험균(세포배양액, 우유, 생리식염수 각각 2, 4, 7일균)의 1차 배양 결과를 광학 현미경 하에서 관찰하였을 때 일차 배양 성공 시 치수 조직으로부터 자라 나온 세포의 형태는 모두 방추형이거나 섬유모세포와 유사한 형태를 보였으며, 각각의 균 사이에 차이가 없었다.

양성 대조균인 신선균은 30개 모두 일차 배양에 성공하였고, 음성 대조균인 건조균은 모두 일차 배양에 실패했다. 세포배양액, 우유, 생리식염수 실험군 중 2일 보관균은 모두 90% 이상의 일차 배양 성공율을 보였고, 4일 보관균도 세포배양액과 우유에서 90%, 생리식염수에서 86.7%의 높은 성공율을 보였다. 2, 4일동안 보관한 실험군 간에 통계적으로 유의할 만한 차이는 없었다. 7일 보관균은 세포배양액에서의 90% 성공율과 비교하였을 때 우유와 생리식염수에서 급격한 성공율의 감소가 관찰되었고, 통계적으로 유의한 차이를 나타냈다(Table1). 7일 보관균에서 우유와 생리식염수 간에는 유의할 만한 차이가 없었다(Figure 3).

Table 1. Success rate of primary culture from deciduous pulp tissues from fresh teeth, dried teeth and teeth conserved in cell culture medium, milk and saline for 2, 4 and 7 days, respectively.

Days	Fresh	Dry	Cell culture medium			Milk			Saline		
	0	2	2	4	7	2	4	7	2	4	7
Success	30	0	30	29	27	29	28	16	28	26	14
Failure	0	30	0	1	3	1	2	14	2	4	16
Total	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
Success rate (%)	100	0	100	96.7	90	96.7	93.3	53.3	93.3	86.7	46.7

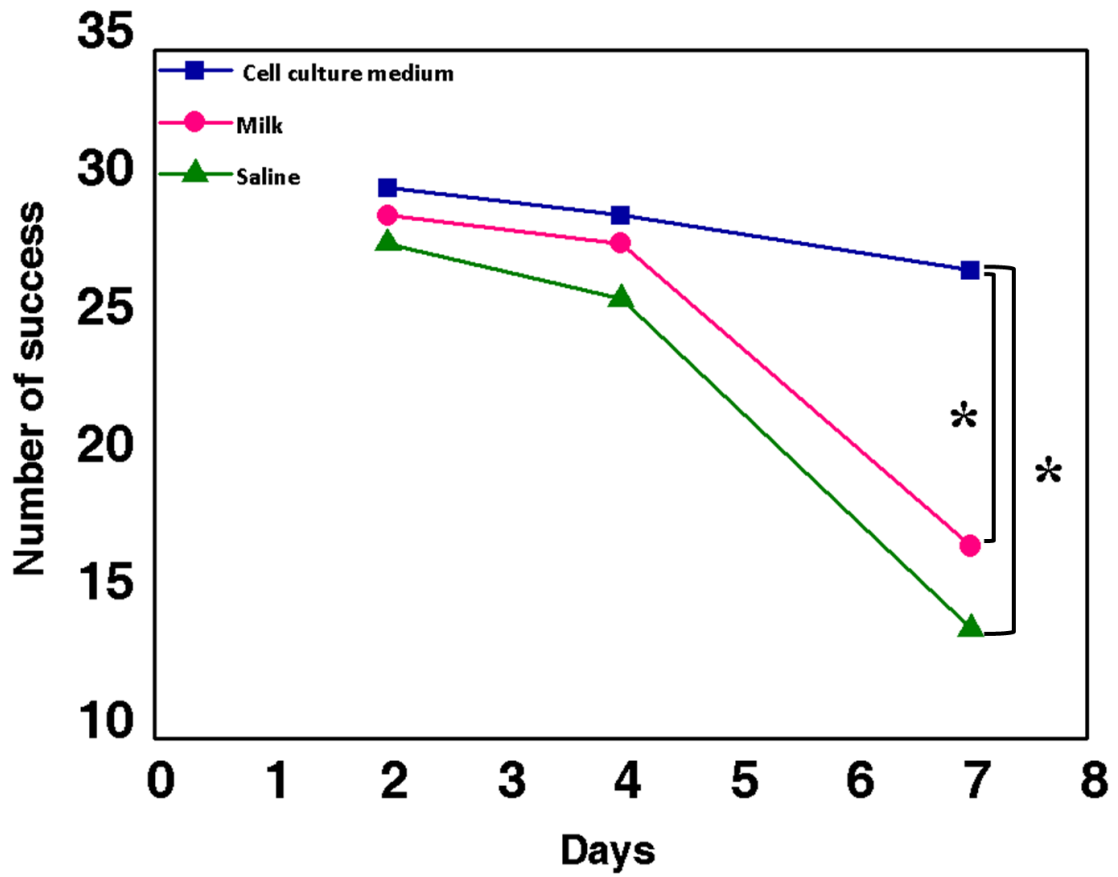


Fig. 3. Success of primary culture within pulp tissues of deciduous teeth conserved in cell culture medium (n=30), milk (n=30) and saline (n=30) for 2, 4 and 7 days, respectively. * Fisher's exact test (p<0.05).

IV. 고찰

본 연구에서 자연 탈락 시기가 가까워져 발거한 유치를 세포배양액, 우유, 생리식염수에서 각각 2, 4, 7일동안 냉장 보관한 후에 얻은 치수 조직과, 발치 직후에 바로 얻은 치수 조직, 보관 용액에 넣지 않고 건조시킨 유치의 치수 조직의 세포 생존과 차이가 있는지 비교하였다.

최근에 조직공학적 조직재생에 대한 요구가 증가하면서 성체줄기세포 중 간엽성 줄기세포에 대한 관심이 증가하고 있다. 줄기세포란 분화되지 않은 단일세포로서 자가재생 능력, 성숙된 전구세포 생산 능력 및 최종 목적세포로의 분화 능력을 가진 세포이다. 줄기세포는 기원에 따라서 배아줄기세포, 태아줄기세포, 성체줄기세포로 나눌 수 있다(Wagers and Weissman, 2004). 성체줄기세포는 분화되어 조직이나 기관을 이루고 있는 세포들 사이에 존재하는 미분화 세포로 자가 증식할 수 있으며, 특수한 기능을 갖는 세포로 분화할 수 있다. 성체줄기세포 중 간엽성 줄기세포는 골수 조직, 지방조직, 근육조직, 혈액조직, 피부조직 및 치아조직 등에서 추출 가능하며(Liu et al., 2009), 최소한 다음과 같은 세 가지 특징을 가지는데, 첫 번째 특징은 일반적인 배양조건에서 배양판 바닥에 붙어서 배양되며, 두 번째 특징은 CD105, CD73, CD90 과 같은 세포표면표시자(cell surface marker, CD marker)를 발현하고 CD45, CD11b, CD34, CD14, CD79a, CD19, HLA-DR 와 같은 표지자는 발현하지 않으며, 세 번째 특징은 특정

분화조건을 가진 배지상에서 골모세포, 지방세포, 연골모세포로 분화가 가능한 점이다(Dominici et al., 2006).

현재까지 치아조직유래 줄기세포는 치수(Gronthos et al., 2000), 치낭(Yao et al., 2008), 치근첨부의 치유두(Abe et al., 2008), 그리고 치주인대(Seo et al., 2004) 조직에서 추출되었다. 치수조직은 발생학적으로 신경능(neural crest) 기원이지만, 배양된 치수 세포가 자가 재생 능력, 다양한 조직으로의 분화 능력 및 자가 복제 능력을 가져 골수유래 간엽성 줄기세포와 유사한 특성을 가진다(Gronthos et al., 2002). 본 연구와 같은 방법인 outgrowth method 로 배양하여 얻은 세포에서 배아줄기세포의 표지자인 Oct-4 와 Nanog, 외배엽성 중간엽 줄기세포 표지자인 Nestin, 혈관주위 세포나 신경다발주위 세포에서 발견되는 초기 간엽성 줄기세포 표지자인 Stro-1 (Shi and Gronthos, 2003) 및 간엽성 줄기세포 표지자로 알려진 CD146 (Zannettino et al., 2008)이 발현되었고 지방조직과 경조직으로의 분화 가능성을 확인하였다(Song et al., 2010). 본 연구에서 배양한 세포 역시 줄기 세포의 특징을 갖는지 확인하기 위한 추가적인 실험이 필요할 것으로 보인다.

조직으로부터 세포를 일차 배양하는 방법에는 enzyme digestion, mechanical disaggregation, 그리고 outgrowth method (explants culture 법) 등이 있다(Freshney, 2005). 본 연구에서는 일차 배양을 위해 outgrowth method 를 사용하였다. Outgrowth method 는 조직을 잘게 자른 다음 배양접시에 고정시킨 후 세포가 자라나오도록 하는 방법이다. 이 방법의 경우 세포가 자라 나오기까지 시간은 많이 걸리나 균일한 세포군을 얻을 수 있고

조직이 작은 경우에 유리하며 비용을 줄일 수 있는 점이 장점이 될 수 있다(Huang et al., 2006). 대부분의 유치 세포의 배양은 enzyme digestion 을 이용하였으며 (Eslaminejad et al., 2010; Govindasamy et al., 2010; Miura et al., 2003; Nakamura et al., 2009), outgrowth method (Spath et al., 2010)를 이용한 연구는 일부 보고되었다. 또한 최근 outgrowth method 를 이용하여 분리, 배양한 치수 세포가 근육세포로의 분화에 있어 다른 방법에 비하여 유리하고, 증식률이 높다는 보고가 있었다(Spath et al., 2010). 유치의 치근 흡수가 이미 진행되어 거의 자연탈락 시기에 이른 유치 치수 조직의 경우 얻을 수 있는 조직의 양이 적을 수 밖에 없기 때문에 이 방법에 의한 세포의 분리가 보다 유리할 것으로 여겨진다(Song et al., 2010).

지금까지 발견된 유치를 저장용액에 보관하는 것에 대한 연구는 거의 없었기 때문에 영구치의 이식이나 재식을 위한 재식 치아 주변 인대 세포 및 치주인대세포에서 얻은 섬유모세포의 생존과 관련된 연구를 살펴보면, 세포의 생존에 영향을 미치는 요인으로는 온도, 필수 영양소 함유, 세균과 독소의 유무, 건조 상태, 삼투압, pH 등이 있다(Lekic et al., 1998; Lin et al., 2000).

본 연구에서 발견된 유치는 4° C의 저장 용액에 보관했는데 이유는 비교적 장기간의 보관이 필요한 실험의 목적 상 보관 온도가 높을수록 보관 용액이 부패하고 세균이 번식할 가능성이 높기 때문이다. Souza 등의 연구에 따르면 치주인대조직을 배양하여 얻은 세포를 5° C 와 20° C 우유에서 보관한 결과, 120시간부터 5° C에 보관한 치주인대세포의 생존율이 유의하게 더 높게

나타났다고 보고하였다(de Souza et al., 2012). 또한 Jo 등에 따르면 치주인대조직을 배양하여 얻은 세포에서 4° C, 25° C, 37° C 등 저장 용액의 온도에 따른 생존율을 관찰하였을 때 온도가 낮을수록 치주인대세포의 생존율은 유의하게 증가하였으며, 이는 온도가 낮을수록 세포의 부종이 감소하고 세포의 생존력이 상승하며 상처를 치유하는 능력이 증진되어 회복력을 상승시키기 때문이라고 하였다(Jo et al., 2007).

본 실험에서 세포배양액, 우유, 생리식염수가 보관용액으로 사용되었다. 세포배양액에는 세포의 생존에 필요한 영양소가 포함되어 있고, 세균 및 진균의 증식을 항생제 및 항진균제가 포함되어 세포 생존에 있어 유리한 환경을 제공하였다. 우유는 인체와 유사한 생리적 삼투압, pH buffering system 등을 가지고 있으며 생리식염수에 비하여 Ca^{2+} , Mg^{2+} 와 같은 대사용 필수 이온, glucose 이외의 필수 영양소, platelet derived growth factor(PDGF)와 포함하고 있어서 세포보호 효과를 갖는다고 하였다(Alacam et al., 1996). 생리식염수는 280mOsm/kg의 삼투압을 가지고 있어 보관용액으로 사용된다. Blomlof 등은 3시간동안 우유와 생리식염수에 보관된 치주인대세포는 비슷한 양의 세포 용해(lysis)를 보였다고 보고(Blomlof et al., 1981)하였으며, Huang 등은 치주인대조직을 배양하여 얻은 세포의 생존을 관찰한 결과 생리식염수는 3시간까지, 우유에서 72시간까지 세포의 생존력 유지가 가능하였다고 보고(Huang et al., 1996)했다. 또 Souza 등에 따르면 치주인대조직을 배양하여 얻은 섬유모세포를 3, 6, 24, 48, 72시간동안 37° C와 20° C에서 sterile Hank' s balanced salt solution

(sHBSS), non-sterile HBSS (nHBSS), skimmed milk, Save-A-Tooth, Minimum Essential Medium (MEM)에 보관한 후 생존을 관찰한 연구에서 37° C에서 24시간까지, 20° C에서 48시간까지 skimmed milk가 가장 좋은 결과를 나타냈고, 37° C에서 48시간 이후부터는 MEM에서 보관한 세포의 생존율이 가장 높았다(Souza et al., 2010). 따라서 치주인대조직을 배양하여 얻은 세포를 장기간 보관한 실험에서는 MEM > 우유 > 생리식염수의 결과를 보이고 있음을 알 수 있다. 치주인대조직을 배양하여 얻은 세포를 대상으로 한 연구방법에는 차이가 있지만 본 실험에서도 MEM > 우유 > 생리식염수의 유사한 결과를 나타냈다. 그러나 본 실험에서는 세포 생존에 필요한 영양분이나 필수 이온을 포함하고 있지 않은 생리식염수에 2일 보관 후 93.3%, 4일 보관 후 86.7%의 높은 세포 배양 성공율을 나타냈고 7일 보관 후에도 46.7%에서 세포가 자라나오는 것을 관찰할 수 있다는 점은 흥미로운 결과이다.

세포 생존력을 유지할 수 있는 보관기간에 대해서는 3시간(Blomlof and Otteskog, 1980), 6시간(Lindskog et al., 1983), 24시간(Ashkenazi et al., 1999), 48시간(Souza et al., 2010), 72시간(Huang et al., 1996) 등 여러 가지 실험 결과들이 보고되었다. Souza 등은 5° C, 20° C의 우유와 37° C의 MEM 용액(양성대조군)에 24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 120시간 보관 시 치주인대조직을 배양하여 얻은 세포의 생존을 비교하였는데, 48시간부터 양성대조군의 생존율이 유의하게 높게 나타났고, 48시간부터 96시간까지 생존율의 큰 변화가 없었으며, 120시간이 되자 우유 실험군의 생존율은 양성대조군의 절반 정도로 떨어지는 결과가 관찰되었다(de Souza et al.,

2012). 치주인대조직을 배양하여 얻은 세포를 대상으로 한 연구방법과는 차이가 있지만 본 실험에서도 유사한 결과를 보였는데 4° C 의 세포배양액, 우유 및 생리식염수에서 2일, 4일간 보관한 실험군 간의 세포 배양 성공율에 유의한 차이가 없었고, 7일군에서 절반 정도의 성공율을 나타냈다. 본 실험에서 4일과 7일 사이의 세포의 생존율이 급격히 떨어지는 지점에 대한 연구가 더 필요하다고 생각된다.

이러한 연구 결과는 가정에서 발견된 유치를 주변에서 쉽게 구할 수 있는 우유나 생리식염수 등의 저장 용액에 보관한 후 줄기세포의 공급원으로 사용할 수 있어 지금보다 더 많은 유치를 줄기 세포 연구와 줄기 세포를 이용한 치료에 이용할 수 있는 가능성을 보여준다는 데서 그 의의를 찾을 수 있다.

V. 결 론

4° C 냉장보관 시 세포배양액, 우유 그리고 생리식염수에서 보관 시 4일까지 높은 세포 배양 성공율을 보이며 세 가지 저장 용액의 종류에 따른 유의한 차이가 없다. 유치 발거 후 우유나 생리식염수 등의 보관용액에 일정 기간 보관 후 그 치수 조직을 세포 배양에 사용하는 것이 가능하지만 보관 기간이 길어질수록 세포 획득 가능성이 줄어든다.

참고문헌

- Abe S, Yamaguchi S, Watanabe A, Hamada K, Amagasa T. 2008. "Hard tissue regeneration capacity of apical pulp derived cells (APDCs) from human tooth with immature apex." *Biochem Biophys Res Commun.* 371(1):90-93.
- Alacam T, Gorgul G, Omurlu H, Can M. 1996. "Lactate dehydrogenase activity in periodontal ligament cells stored in different transport media." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 82(3):321-323.
- Arora V, Arora P, Munshi AK. 2009. "Banking stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): saving for the future." *J Clin Pediatr Dent.* 33(4):289-294.
- Ashkenazi M, Sarnat H, Keila S. 1999. "In vitro viability, mitogenicity and clonogenic capacity of periodontal ligament cells after storage in six different media." *Endod Dent Traumatol.* 15(4):149-156.
- Blomlof L, Otteskog P. 1980. "Viability of human periodontal ligament cells after storage in milk or saliva." *Scand J Dent Res.* 88(5):436-440.
- Blomlof L, Otteskog P, Hammarstrom L. 1981. "Effect of storage in media with different ion strengths and osmolalities on human periodontal ligament cells." *Scand J Dent Res.* 89(2):180-187.
- Couple ML, Farges JC, Bleicher F, Perrat-Mabillon B, Boudeulle M, Magloire H. 2000. "Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures." *Calcif Tissue Int.* 66(2):129-138.
- de Souza BD, Luckemeyer DD, Felipe WT, Alves AM, Simoes CM, Felipe MC. 2012. "Effect of milk renewal on human periodontal ligament fibroblast viability in vitro." *Dent Traumatol.* 28(3):214-216.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. 2006. "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." *Cytotherapy.* 8(4):315-317.

- Eslaminejad MB, Vahabi S, Shariati M, Nazarian H. 2010. "In vitro Growth and Characterization of Stem Cells from Human Dental Pulp of Deciduous Versus Permanent Teeth." *J Dent (Tehran)*. 7(4):185-195.
- Freshney R. 2005. Culture of animal cells : a manual of basic technique. 5th ed. ed.
- Govindasamy V, Abdullah AN, Ronald VS, Musa S, Ab Aziz ZA, Zain RB, et al. 2010. "Inherent differential propensity of dental pulp stem cells derived from human deciduous and permanent teeth." *J Endod*. 36(9):1504-1515.
- Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. 2002. "Stem cell properties of human dental pulp stem cells." *J Dent Res*. 81(8):531-535.
- Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. 2000. "Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(25):13625-13630.
- Huang GT, Sonoyama W, Chen J, Park SH. 2006. "In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments." *Cell Tissue Res*. 324(2):225-236.
- Huang SC, Remeikis NA, Daniel JC. 1996. "Effects of long-term exposure of human periodontal ligament cells to milk and other solutions." *J Endod*. 22(1):30-33.
- Iohara K, Zheng L, Wake H, Ito M, Nabekura J, Wakita H, et al. 2008. "A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: subfraction of side population cells from dental pulp." *Stem Cells*. 26(9):2408-2418.
- Jo JH, Kim SO, Choi HJ, Lee JH, Son HK, Choi BJ. 2007. "A comparative study of preserving ability of human periodontal ligament cells stored in different temperature storage media." *J Korean Acad Pediatr Dent* 34(1):36-42.
- Karaoz E, Dogan BN, Aksoy A, Gacar G, Akyuz S, Ayhan S, et al. 2010. "Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth." *Histochem Cell Biol*. 133(1):95-112.
- Kerkis I, Ambrosio CE, Kerkis A, Martins DS, Zucconi E, Fonseca SA, et al. 2008. "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.
- Kerkis I, Caplan AI. 2012. "Stem cells in dental pulp of deciduous teeth." *Tissue Eng*

Part B Rev. 18(2):129-138.

- Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, et al. 2006. "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(3-4):105-116.
- Lekic PC, Kenny DJ, Barrett EJ. 1998. "The influence of storage conditions on the clonogenic capacity of periodontal ligament cells: implications for tooth replantation." *Int Endod J.* 31(2):137-140.
- Lin DG, Kenny DJ, Barrett EJ, Lekic P, McCulloch CA. 2000. "Storage conditions of avulsed teeth affect the phenotype of cultured human periodontal ligament cells." *J Periodontal Res.* 35(1):42-50.
- Lindskog S, Blomlof L, Hammarstrom L. 1983. "Mitoses and microorganisms in the periodontal membrane after storage in milk or saliva." *Scand J Dent Res.* 91(6):465-472.
- Liu ZJ, Zhuge Y, Velazquez OC. 2009. "Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells." *J Cell Biochem.* 106(6):984-991.
- Ma D, Ma Z, Zhang X, Wang W, Yang Z, Zhang M, et al. 2009. "Effect of age and extrinsic microenvironment on the proliferation and osteogenic differentiation of rat dental pulp stem cells in vitro." *J Endod.* 35(11):1546-1553.
- Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. 2003. "SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(10):5807-5812.
- Nakamura S, Yamada Y, Katagiri W, Sugito T, Ito K, Ueda M. 2009. "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(11):1536-1542.
- Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, et al. 2004. "Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament." *Lancet.* 364(9429):149-155.
- Shi S, Gronthos S. 2003. "Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp." *J Bone Miner Res.* 18(4):696-704.

- Song JS, Kim S-O, Kim S-H, Choi H-J, Son H-K, Jung H-S, et al. 2012. "In Vitro and In Vivo Characteristics of Stem Cells Derived from the Periodontal Ligament of Human Deciduous and Permanent Teeth." *TISSUE ENGINEERING: Part A*. Volume 18, Numbers 19 and 20.
- Song JS, Kim Sh, Kim SO, Choi BJ, Kim JH, Kwak Sw, et al. 2010. "Characterization of Stem Cells Obtained from the Dental Pulp and Periodontal Ligament of Deciduous Teeth." *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 7.
- Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. 2008. "Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study." *J Endod*. 34(2):166-171.
- Souza BD, Luckemeyer DD, Felipe WT, Simoes CM, Felipe MC. 2010. "Effect of temperature and storage media on human periodontal ligament fibroblast viability." *Dent Traumatol*. 26(3):271-275.
- Spath L, Rotilio V, Alessandrini M, Gambaro G, De Angelis L, Mancini M, et al. 2010. "Explant-derived human dental pulp stem cells enhance differentiation and proliferation potentials." *J Cell Mol Med*. 14(6B):1635-1644.
- Wagers AJ, Weissman IL. 2004. "Plasticity of adult stem cells." *Cell*. 116(5):639-648.
- Wang X, Sha XJ, Li GH, Yang FS, Ji K, Wen LY, et al. 2012. "Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells." *Arch Oral Biol*. 57(9):1231-1240.
- Yao S, Pan F, Prpic V, Wise GE. 2008. "Differentiation of stem cells in the dental follicle." *J Dent Res*. 87(8):767-771.
- Zannettino AC, Paton S, Arthur A, Khor F, Itescu S, Gimble JM, et al. 2008. "Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo." *J Cell Physiol*. 214(2):413-421.

Abstract

Effect of storage media and duration on pulpal cell viability in exfoliated deciduous teeth

Ji-won Park, D,D,S. ,

Department of Dental Science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Heung-kyu Son)

If it is possible to preserve and culture cells from exfoliated deciduous teeth in a readily available storage medium within each family, more stem cells would be obtained. This research is about the effect of storage media and time on pulpal cell viability of exfoliated deciduous teeth.

330 exfoliated deciduous teeth were randomly divided into 11 groups; fresh group, dry group, groups stored in cell culture medium (2, 4, 7 days each), in milk (2, 4, 7 days each), and in saline (2, 4, 7 days each). Primary culture of pulpal cells was conducted in each group and

the success rates were compared by calculating the number of teeth with viable cells.

The result of primary culture shows that the success rate decreases as the time of storage gets longer. There was no statistical difference between groups stored in the cell culture medium, milk, and saline for 2 and 4 days. However, the groups stored in milk and saline for 7 days showed dramatic decrease in success rate compared to the group stored in the cell culture medium.

In conclusion, exfoliated or extracted deciduous teeth can be used to culture pulpal cells when they are stored in milk and saline for a certain period of time; however obtaining viable pulpal cells becomes harder as the storage time gets longer.

Key words : Storage medium for deciduous teeth, Pulpal tissue, Cell viability,

Milk, Saline