creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 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

치의학석사 학위논문

인간 치수 줄기세포의 특성과 치아 재생을 위한 분화 유도 시 배양 조건에 관한 고찰

Dental pulp stem cells - Characters and differentiation condition into odontoblasts

2013 년 2 월

서울대학교 대학원

치의학과 전공

이 경 중

인간 치수 줄기세포의 특성과 치아 재생을 위한 분화 유도 시 배양 조건에 관한 고찰

지도교수 류 현 모

이 논문을 치의학석사학위논문으로 제출함
2012 년 10 월

서울대학교 대학원
치의학과 전공
이 경 중

이경중의 석사 학위논문을 인준함
2012 년 12 월

위 원 장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

초 록

치수 줄기세포 (dental pulp stem cell, DPSC)는 중배엽성 유래의 치성 줄기세포의 한 종류로 다른 stem cell 과 마찬가지로 self-renewal 이 가능하고 다양한 종류의 세포로 분화 가능한 특징을 가지고 있다. 이러한 특징을 이용하여 치수 줄기세포를 다양한 종류의 세포로 분화시키려는 노력이 진행되어 왔다. 연구를 통해 치수 줄기세포가 상아모세포, 골모세포, 연골모세포, 지방세포, 신경세포, 내피세포와 같은 세포로 분화 유도할 수 있음이 밝혀졌다.

본 종설에서는 치수 줄기세포 (dental pulp stem cell, DPSC)를 상아모세포 (odontoblast)로 분화 유도하는 실험적 방법에 초점을 맞추어 고찰하였다. 현재까지 DPSC 를 상아모세포로 분화 시켜 치아를 구성하는 상아질을 재생시키고자 하는 연구가 치의학 분야에서 활발히 진행되어 왔다. 하지만 DPSC 를 이용하여 상아모세포로의 분화를 유도하는 분화조건이 연구팀마다 기본적으로는 비슷하나 차이가 존재한다. 또한 DPSC 가 상아모세포로 분화 유도 되었음을 증명하기 위해 행한 실험적 방법도 연구팀마다 차이를 보인다. 따라서 분화 유도를 위해 필요한 실험적 조건과 분화 증명 실험법의 경향성을 알아보기 위해 DPSC 를 이용하여 상아모세포로의 분화를 연구한 22 편의 논문을 분석하였다. 치수로부터 DPSC 를 분리하는

방법과 분리한 DPSC 를 상아모세포로 분화 유도한 조건, 분화가 유도되었음을 증명하는 실험법들을 In vitro 와 in vivo 환경으로 나누어 비교 분석하였다.

치수로부터 DPSC 를 분리하는 방법으로 collagenase 와 같은 효소를 이용한 효소 이용 분리법이 주로 사용되었다. In vitro 환경에서 이용된 DPSC 의 세대 수는 주로 1~4 세대가 많았으나 특정 scaffold 사용이나 유전자 transfection 을 이용한 분화 유도 실험과 같은 특정 환경의 경우 더 높은 세대수의 DPSC 를 이용하였다. 분화 유도 배지에 필수적으로 포함되어야 하는 구성요소로 a-MEM 또는 DMEM, β-glycerolphosphate, ascorbic acid, 항생제, 혈청이 있으며, Dexamethasone, BMP-2 은 현재까지는 분화 유도 배지의 필수 요소라는데 논란이 있는 상황이다. 상아모세포로 분화되었음을 증명하기 위한 실험법들 중 ALP activity test, calcium nodule detection test, odontoblast specific gene transcription test 가 중요하며, 분화 유도 후 각 실험들을 시행하는 시점에 있어서 경향성이 존재함을 알 수 있었다. In vivo 환경에서 DPSC 를 이식하는데 사용되는 숙주는 면역 억제된 쥐가 대부분이었고 이식되는 DPSC 의 수도 경향성이 나타났다. DPSC 를 지지하는 scaffold 는 다양한 물질들이 사용되었는데 각각의 특징이 존재한다. 이식 후 분화 유도 기간은 주로 6~8 주 정도가 필요하고 상아모세포로

분화되었음을 증명하기 위한 실험법으로 조직 절편 검사가 중요하다.

이상을 종합해 볼 때, in vitro 와 in vivo 환경에서 DPSC 를 상아모세포로 분화 유도하기 위한 일반적인 실험 조건을 제시할 수 있었으며 배지 조성에 필수적인지에 대해 논란이 되는 Dexamethasone, BMP-2 에 관해서는 향후 연구가 더 필요할 것으로 보인다. 또한 분화 유도를 증명하기 위해 중요한 실험과 실험 시점도 제시할 수 있다.

주요어 : 치수 줄기세포, 상아모세포 분화 유도 배지, 상아모세포 분화

학 번 : 2009-22698

목 차

제 1 장 서론····· 5

제 2 장 본론····· 8

제 1 절 치수 줄기세포의 특성 ····· 8

제 2 절 치수 줄기세포의 분리, 확인법 ····· 13

제 3 절 치수 줄기세포를 이용한 상아모세포로의
분화 유도 조건과 분화 증명 실험법 ····· 24

제 3 장 결론 ····· 62

참고문헌 ····· 65

부록 ····· 74

Abstract ····· 94

제 1 장 서론

치성 줄기세포 (dental stem cell)는 중배엽성 기원으로 치아내부의 치수와 치아 주위조직에 분포하는 줄기세포를 말하며 self-renewal 이 가능하고 다양한 종류의 세포로 분화 가능한 특징을 가지고 있다. 현재까지 알려진 치성 줄기세포는 dental pulp stem cell (DPSC), stem cell from exfoliated deciduous teeth (SHED), stem cell from the apical papilla (SCAP), periodontal ligament stem cells (PDLSC), dental follicle precursor cells (DFPC) 5가지이다. 이와 같은 치성 기원의 줄기세포를 이용하여 다양한 종류의 세포로 분화시키려는 노력이 진행되어 왔다. 이들 줄기세포의 다양한 종류의 세포로 분화 가능한 특징은 조직 재생학적 측면에서 매우 의미가 있으며 실제로 여러 연구를 통해 치성 줄기세포의 분화를 이용한 조직 재생이 많은 관심을 받고 있다. 그 중 DPSC는 상아모세포, 골모세포, 연골모세포, 지방세포, 신경세포, 내피세포와 같은 세포로 분화 가능하며 특히 DPSC를 상아모세포 (odontoblast)로 분화 시켜 상아질을 재생하고자 하는 연구가 활발히 진행되어 왔다. 현재까지는 치아가 외상, 감염 등의 이유로 손상 받았을 때 비생체적 재료를 통한 보존 수복이 이루어지고 있고, 치아가 상실된 상황에서도 의치나 임플란트와 같은 인공 매식재를

이용한 치료가 행해지고 있다. DPSC를 상아모세포로 분화 유도시킬 수 있게 되면 상아모세포로부터 만들어지는 상아질을 이용한 보존적 치료나 치아 재생을 통한 치아 상실의 회복을 이룰 수 있기 때문에 임상적으로 큰 의미가 있다.

하지만 현재까지는 DPSC를 이용하여 상아모세포로의 분화를 유도하는 실험적 조건이 연구팀마다 기본적으로는 비슷한데 약간의 차이가 존재하는 것을 알 수 있다. 또한 연구팀마다 분화되었음을 증명하기 위해 시행한 실험법들도 다양함을 알 수 있다. 상아모세포로의 분화를 유도하는 실험적 조건과 분화되었음을 증명하기 위해 어떠한 실험법을 사용하였는지에 대한 경향성을 분석하여 분화 유도를 위한 일반적인 조건을 제시하고 중요한 증명법을 제시하는 것은 DPSC를 상아모세포로의 분화 유도에 관한 연구를 하는 연구자들에게 유의미한 정보를 제공할 수 있기 때문에 의의가 있다. DPSC를 상아모세포로 분화 유도한 여러 연구를 비교 분석하여 실험 조건에 대한 유의미한 기준을 설정하는 것은 관련 연구자들이 실험을 하는데 도움을 줄 것이다.

먼저 줄기세포로서 DPSC의 특성에 대해 알아보고, DPSC를 치수로부터 분리하는 방법과 분리한 세포들이 DPSC임을 확인하는 방법에 대하여 고찰하였다. 그리고 DPSC를 상아모세포로 분화 유도한 22개의 연구를 통해 분화 유도의

실험적 조건, 그리고 상아모세포로 분화되었음을 증명하는 실험 방법에 대해 in vitro, in vivo로 구분하여 종합, 고찰하였다. (Table 1)

제 2 장 본론

제 1 절 치수 줄기세포의 특성

줄기세포는 미분화된 세포로 여러 특정 조직에 존재하는 세포들로 분화할 수 있는 능력을 지닌 세포를 말한다. 줄기세포는 세포분열을 통해 self-renewal 할 수 있고 또한 특정 세포로 분화할 수 있다. 줄기세포는 하나가 두 개로 분열할 때 세포의 주위 미세환경의 상황에 따라 미분화 된 줄기세포 두 개가 될 수도 있고 미분화 줄기세포 하나와 분화된 세포 하나, 분화된 세포 두 개가 형성될 수도 있다.[1] 또한 일반적으로 stem cell은 영양 결핍, 세포 밀도 증가 등 세포의 활동성에 악영향을 끼치지 않는 환경 상태에서는 무제한으로 분열할 수 있는 특성을 가진다.[2]

또한 줄기세포는 그것이 속한 조직으로부터 분리되어 다른 조직에 이식되었을 때, 이식된 조직에서 발견되는 세포 형태로 분화가 가능하다.[1] 이러한 특성으로 인해 특정 환경을 조성해주어 배양하면 원하는 세포로 분화를 유도 할 수 있어서 조직 재생에 이용될 수 있는 잠재능을 갖는다.

줄기세포는 크게 두 가지로 나눌 수 있다. 하나는 배아의 발생과정에서 나타나는 배아줄기세포 (embryonic stem cell),

다른 하나는 성체의 조직에 분포하는 성체줄기세포 (adult stem cell)이다.

배아줄기세포는 배아 발생 4-5일에 나타나는 배반포 (blastocyst) 시기의 배아모체 (embryoblast)으로부터 유래한 세포이다.[3] 이 세포는 태반을 제외한 신체의 어떠한 세포로도 분화 가능한 pluripotent한 특성을 가진다.[4] 따라서 성체줄기세포에 비해 더 많은 세포 형태로 분화가 가능하고, 상대적으로 성체줄기세포에 비해 배양하기가 쉽다고 알려져 있다. 이와 같은 특성은 조직 재생에 이용될 세포로는 반드시 필요한 것이기 때문에 이러한 점만 생각했을 때는 조직 재생 연구에 이용하기에 적합한 세포로 생각된다. 그러나 배아줄기세포를 추출하기 위해서는 자라고 있는 배아를 손상시켜야 하기 때문에 배아를 하나의 생명체로 생각했을 때 생명을 인위적으로 파괴하는 것이 되어 윤리적으로 문제가 될 수 있다.[3]

성체줄기세포는 성체의 뇌, 골수, 근육, 심장, 위장, 피부, 생식기, 치아 등 다양한 조직에 분포하고 있는 줄기세포로 조직이 손상을 입어 파괴 당했을 때나 성장인자 분비 같은 특정한 자극이 주어졌을 때, 여러 세포로 분화되는 특징을 보인다. 성체줄기세포는 태반을 제외한 신체의 어떠한 세포로도 분화 가능한 특성을 가진 배아줄기세포와는 다르게 multipotent, 즉 연관된 몇몇의 특정 조직 세포로만 분화할 수 있는 능력을

가진다.[5, 6] 성체줄기세포는 조직 내부에 매우 적은 양이 존재하기 때문에 이를 분리하여 배양시키는데 연구자의 능력이 큰 영향을 미친다. 반면에 성체의 조직에서 줄기세포를 채취하는 것이기 때문에 환자의 동의만 있으면 윤리적으로 문제가 없다는 점에서 배아줄기세포에 비해 연구 모델로 큰 관심을 받고 있다.

성체줄기세포에 대한 연구는 골수 내부에서 multipotent한 능력을 가진 세포가 존재한다는 것이 밝혀지면서 시작되었다. 골수에서 발견된 줄기세포 중 하나는 분화되어 혈구세포를 생성하는 조혈 줄기세포 (hematopoietic stem cell)이고 다른 하나는 골수 내에서 뼈, 연골, 지방과 같은 구성조직을 생성하는 세포로 분화되는 줄기세포이다.[7, 8] 이 중 후자를 중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cell)이라고 명명하였다.[9, 10] 골수 내부의 중간엽 줄기세포 발견 이후로 신체를 구성하는 다른 조직에도 다양한 중간엽 줄기세포가 존재한다는 것이 밝혀졌다.

구강 조직에도 중간엽 줄기세포들이 존재한다. 치아와 치아 주위 조직에 존재하는 중간엽 줄기세포는 현재까지 알려진 것으로 dental pulp stem cell (DPSC), stem cell from exfoliated deciduous teeth (SHED), stem cell from the apical papilla (SCAP), periodontal ligament stem cells (PDLSC), dental follicle precursor cells (DFPC) 5가지이다. 그 중 가장 먼저 분리 배양된 치성 중간엽 줄기세포는 치아 내부의 치수에

존재하는 dental pulp stem cell이다.[11] 그 이후로, 유치로부터 유래한 stem cells from exfoliated deciduous teeth, 치주인대 내부에 존재하는 periodontal ligament stem cell, 치아의 치근단 하방 골조직 내부에 존재하는 stem cell from apical papilla, dental follicle로부터 유래한 dental follicle precursor cell들이 차례로 분리 배양되었다.[12-14] 이 치성 기원의 중간엽 줄기세포들은 각기 다른 세포로 분화할 수 있는 능력이 있다. 여러 분화 유도 실험을 통해 DPSC는 상아모세포, 골모세포, 연골모세포, 지방세포, 내피세포, 신경세포, 근육 세포로 분화 가능하고, SHED는 상아모세포, 골모세포, 신경세포, 지방세포, 내피세포로 분화 가능하며, PDLSC는 상아모세포, 치주조직, 골모세포, 백악모세포, 연골세포, 지방세포로 분화 가능하다고 알려져 있다.[15] DFSC는 치주인대 원시세포, 골모세포, 백악모세포, 신경모세포로 분화 가능하며, SCAP는 상아모세포, 골모세포로 분화 가능하다고 알려져 있다.[15] 이들 치성 중간엽 줄기세포 중 DPSC의 상아모세포로의 분화는 현재까지 매우 활발하게 연구되고 있는 분야이다.

치아가 물리적인 응력, 세균에 의한 법랑질-상아질 파괴, 산성에 의한 부식 등의 자극을 받았을 때, 상아모세포에 의한 수복상아질 형성은 임상적으로 잘 알려져 있다.[16] 치아가 악영향을 받는 환경에 노출되었을 때 상아모세포에 의한 치수

방어 기전이 세포 수준에서 연구되기 시작하였다. 그 결과 치아 내부에서 상아모세포로의 증식과 분화를 일으키는 전구세포가 치수 조직 내에 존재할 것이라 예측되었고 이 전구세포를 분리 배양하기 위한 많은 시도가 진행되었다. 치수 조직은 특정 환경 조건에서 상아모세포와 유사한 세포로 분화되어 석회화된 조직을 형성한다는 것이 밝혀졌다.[17] Gronthos 등 연구팀은 성체의 치수 조직 내에 multipotent한 능력을 가진 줄기세포가 존재할 것이라는 가정 하에 분열능이 높고 상아질, 석회화된 조직을 형성할 수 있는 세포를 분리 배양하는데 성공하였고 이 세포를 DPSC라고 명명하였다. [11]

제 2 절 치수 줄기세포의 분리, 확인법

인간 DPSC를 사용한 연구에서 DPSC를 추출한 부위는 다양하다. Gnonthos팀은 성인 (19-29세)의 발치한 매복 제3대구치의 치수조직으로부터 DPSC를 추출하여 배양하는데 성공하였다.[11] 제3대구치의 경우 일반적으로 구강 내에서 기능을 하지 않는 치아이며 미맹출되거나 부분 맹출되어 치태, 치석 침착을 통해 치주조직의 건강 유지에 좋지 않은 영향을 줄 수 있기 때문에 발치가 선호된다. 따라서 DPSC를 추출하는데 좋은 원천이 될 수 있다. 이후로 많은 연구팀에서 제3대구치 내부의 치수조직에서 DPSC를 추출하여 이를 연구에 이용하였다. 유치 치수조직도 DPSC의 좋은 원천이 된다. Miura 외 연구팀은 소아 (7-8세)의 발치된 유전치의 치수조직에서 DPSC를 추출하였다[12]. 또한 apical papilla와 과잉치로부터 추출한 DPSC를 연구에 이용하기도 하였다.[14, 18, 19] 심지어 파절된 치아, 치수염에 이환된 치아도 DPSC의 원천으로 연구에 이용되었다.[19] 파절, 감염으로 인한 염증반응이 진행된 치수로부터 추출한 DPSC가 정상 치수 조직으로부터 유래한 DPSC와 surface marker, 분열능력, 분화능력에 차이가 없다는 연구결과가 있지만, 세포 추출 시 세균 또한 함께 추출될 수 있기 때문에 주의해야 한다.[20, 21]

인간 이외에도 쥐[22-30], 개[31, 32], 돼지[33], 양[34], 토끼[35], 원숭이[36] 등 여러 실험 동물 유래의 치아를 대상으로 한 DPSC 연구들이 행하여졌다. 사람 이외의 대부분의 동물에서 실험을 위해 전치를 발치 하였는데 DPSC는 모든 치아의 치수 조직 내에 존재하기 때문에 어떤 치아를 발치하는지는 큰 의미는 없고 접근성이 다른 부위 치아보다 좋은 점이 이유로 보인다.

일반적으로 알려진 DPSC 추출법은 다음과 같다. 실험에 사용되는 치아를 추출하여 항생제가 담긴 멸균 용액에 담궈둔다. 치아의 표면을 깨끗이 한 후 치아의 백악-법랑 경계 부위를 멸균된 dental bur를 이용하여 개방시켜 치수강을 노출시킨다. 노출된 치수강으로부터 치수를 분리할 때 법랑질 조직과 apical bud로부터 떨어뜨려 치성 상피조직이 포함되지 않는 순수 DPSC를 추출하는게 중요하다.

추출한 치수 조직으로부터 DPSC를 분리하는 방법은 크게 두 가지이다. 그 중 한가지는 효소를 이용하여 DPSC를 분리하는 collagenase-seperation 방법이다. 추출한 치수 조직을 3mg/ml collagenase type I, 4mg/ml dispase 혼합액에 37℃, 5% CO_2 환경에서 1시간동안 처리한다. 이후 70μm strainer에 세포를 통과시켜 single-cell suspension을 얻은 후, 연구할 목적에 맞게 배양한다.[11]

다른 하나의 방법은 추출한 치수 조직을 분절하여 그 상태로 culture dish에 배양하는 explant 방법이다. 추출한 치수 조직을 약 3-4mm^2로 분절하여 이를 culture dish에 배양한다. 하나의 치아에서 추출한 치수 조직으로 약 20-30개의 explant를 얻을 수 있다.[37]

이번 연구에 사용되는 22편의 논문들을 분석해보면, 22개 중 21개의 연구에서 치수 조직으로부터 DPSC를 분리할 때 collagenase-seperation 방법을 사용한 것으로 나타났으며 22개 중 1개의 연구에서 추출한 치수 조직을 explant로 만들어 분화 연구에 사용한 것을 알 수 있었다. Explant의 경우 단지 추출한 치수 조직을 배양에 알맞은 크기로 절단한 것으로, 그 자체가 축소된 치수 조직을 나타낸다. 따라서 explant 내의 DPSC가 원래 존재하던 조직 환경 그대로 배양될 수 있기 때문에 생체 내 치수 환경과 비슷한 조건에서 DPSC의 분화 유도를 재현할 수 있다는 장점이 있다. 그러나 추출한 치수 조직 내부에는 DPSC 뿐만 아니라 섬유모세포 (fibroblast), 내피세포 (endothelial cell) 등 치수를 구성하는 여러 가지 다른 세포와 세포를 지지하는 세포외기질 (extracellular matrix, ECM)이 존재하게 된다. 이들 조직에서 DPSC를 분리 하지 않고 함께 배양하게 되므로 DPSC를 선택적으로 실험에 사용했다고 말하기에는 신뢰성이 떨어지는 단점이 있다. 그리고 explant 내부에 존재하는 세포와

표면에 존재하는 세포 사이의 배지 공급의 정도 차이가 배양 결과에 영향을 미칠 수 있다는 점 또한 단점이다.

그에 반해 collagenase-seperation 방법을 사용하면 효소인 collagenase, dispase의 작용에 의해 ECM을 구성하는 단백질인 collagen, fibronectin 등을 효과적으로 분해하여 single-cell suspension을 얻을 수 있다. 치수 조직의 ECM이 제거된 상태의 cell만을 분리하여 실험에 이용할 수 있기 때문에 explant 방법에 비해 신뢰성이 높은 장점이 있다. 그리고 세포를 배양하는 dish의 크기에 알맞은 정도로 분산하여 배양할 수 있기 때문에 배지로부터 세포에 필요한 영양분의 공급되는 정도도 explant 방법에 비해 균일하게 만들 수 있다. 이러한 장점으로 인해 치수 조직으로부터 DPSC를 분리하는데에는 collagenase-seperation 방법이 일반적으로 사용되고 있다.

위에서 언급한 세포 분리방법을 통해 추출한 치수 조직으로부터 single-cell suspension을 얻을 수 있다. 하지만 얻어진 세포들이 DPSC라고 단정지을 수는 없다. 왜냐하면 치수 조직에는 DPSC 뿐만 아니라 ECM을 만들어내는 섬유모세포, 혈관을 구성하는 내피세포, 혈관 주위에 분포하는 주위세포(pericyte), 각종 면역 관련 세포 등 다양한 종류의 세포가 존재하기 때문이다. 따라서 DPSC를 이용한 분화 유도 실험을 하기 위해서는 추출한 세포로부터 DPSC를 선택적으로 분리,

증명할 수 있어야 한다. DPSC를 선택적으로 분리하는데에는 줄기세포로써의 특성이 이용된다.

일반적으로 추출된 cell suspension에서 DPSC를 분리하고 DPSC임을 입증할 수 있는 방법은 크게 세 가지가 있다.

첫 번째로 줄기세포의 특성 중 하나인 높은 분열능을 이용하는 방법이 있다.

줄기세포는 세포가 자랄 수 있는 적절한 환경에서 분화된 일반 세포들에 비해 매우 빠른 분열능을 가진다. 이는 골수 기질 줄기세포 (bone marrow stromal cell, BMSC)을 추출하여 배양하여 분열능을 측정한 실험을 통해 잘 알려져 있다. Gronthos 외 연구자들은 BMSC와 DPSC의 분열능을 군체 형성 능력 (colony-forming efficiency)와 Bromodeoxyuridine을 이용한 세포 분열능 검사를 통해 비교하였다.[11] 이 연구에 따르면 세포를 plate에 유사한 수로 seeding한 후 배양하였을 때, DPSC이 BMSC보다 더 높은 세포 분열능을 보인다는 것을 알게 되었다. 또한 일반 세포에 비해서도 높은 세포 분열능을 보인다. 이와 같이 세포 배양 환경에서 높은 분열 능력을 지닌 DPSC의 특성을 이용하여 DPSC가 존재함을 입증할 수 있다. 대표적인 검사로 군체 형성 능력 검사와 Bromodeoxyuridine을 이용한 세포 분열능 검사가 있다.

군체 형성 능력 검사는 치수 조직으로부터 얻은 세포들을 plate에 하나의 세포로부터 colony를 형성할 수 있도록 세포들을 낮은 밀도로 도말한 후 14일 정도 배양하여 4% formalin으로 고정한 다음 0.1% toluidine blue로 염색한다. 형성된 colony 숫자를 통해 치수 조직으로부터 얻은 세포들 중 DPSC의 비율을 알 수 있고 분열능이 높은 단일 군체로부터 DPSC를 추출할 수 있다.

Bromodeoxyuridine을 이용한 세포 분열능 검사는 Bromodeoxyuridine이라는 물질의 특이적 성질을 통하여 세포 분열능을 측정한다.[38] Bromodeoxyuridine은 DNA를 구성하는 nucloeside 중의 하나인 thymidine의 유사체이다. Bromodeoxyuridine은 thymidine과 구조가 유사하여 분열하는 세포의 DNA 합성시 thymidine 대체로 삽입될 수 있다. 배양 중인 세포에 bromodeoxyuridine을 처리 시 활발히 분열 중인 세포의 DNA에 bromodeoxyuridine이 많이 삽입된다는 점을 이용하여 bromodeoxyuridine에 특징적으로 결합하는 항체를 처리한 후 이를 감지하여 배양 중인 세포들의 분열능을 수치화 할 수 있다. 이와 같은 방법을 통한 세포 분열능 검사는 DPSC를 확인하는 하나의 방법이 될 수 있다.

두 번째로 줄기세포에만 존재하는 특정 surface marker를 이용한 분리 방법이 있다.

세포의 surface marker에 specific하게 붙는 형광물질을 적용한 후 Fluorescence-activated cell sorting (FACS)를 이용하여 선택적으로 분리할 수 있다. FACS는 flow cytometry의 한 형태로 세포의 특정 surface marker에 결합하는 형광물질을 적용하여 세포를 분류하는 방법을 말한다. 또는 세포의 surface marker에 specific하게 붙는 antibody를 적용한 후 antibody-conjugated microbead를 이용하여 세포를 분류하는 방법을 사용한다.

줄기세포에 특징적으로 존재하는 surface marker로는 여러 가지가 있는데 가장 많이 탐지되는 marker로 STRO-1이 있다.

STRO-1은 초기에 BMSC에서 발현되는 surface protein으로 알려졌었다.[39] 이후 대부분의 기질 줄기세포 (stromal stem cell)에서 세포 표면에 발현이 된다는 사실이 알려지면서 줄기세포임을 확인할 때 쓰이는 marker 단백질이 되었다.[40] 비록 추출한 DPSC가 heterogeneous하기 때문에 모든 DPSC에서 발현이 나타나는 것은 아니지만 대부분의 DPSC에서 세포 표면에 발현되기 때문에 DPSC를 확인하는데 이용할 수 있다. 치수 조직에서 STRO-1이 발현이 관찰되는 세포들은 대부분이 주위세포 (pericyte)이며 이를 통해 치수 조직의 혈관 주위에 DPSC가 분포한다는 가설이 제기되었다.[41] STRO-1이 발현된 DPSC는 상아모세포, 골모세포로 분화되는 경향이 있기

때문에 STRO-1이 경조직을 만들어 내는 세포를 확인할 때 쓸 수 있는 유용한 marker가 될 수 있다.[25, 42]

CD29와 CD44 또한 일반적으로 중간엽 줄기세포에서 발현되는 surface marker로 알려져 있다.[43] CD29는 integrin family의 한 구성요소로 세포 표면에 존재하여 fibronectin, collagen 등의 ECM에 세포가 접착할 때 작용한다.[44] 세포의 상호작용, 면역, 지혈 등에도 관여한다. 또한 접착 후 세포 내에 생기는 신호전달계의 활성화, 유전자 발현의 조절, 세포골격의 재구축 등에 관여하는 기능적 수용체로 알려져 있다. CD44는 세포막에 존재하는 당단백질로 lymphocyte의 활성화에 관여하는 것으로 알려져 있다.[45] CD73 또한 중간엽 줄기세포에서 발현되는 marker 단백질로 세포 부착에 관여하고 림프구가 내피세포에 부착하는데 영향을 미친다. [46] CD90은 일반적으로 백혈구에서 발현되는 glycosylphosphatidylinositol (GPI)에 부착된 당단백질로 세포-세포, 세포-기질 상호작용에 관여하는 표면 단백질이다. [47] CD105는 transforming growth factor-beta (TGF-b) 수용기 복합체를 구성하는 구성요소 중 하나로 CD105가 발현된 치수 세포는 높은 분열능을 보이며, 다양한 계통으로 분화할 수 있는 잠재력이 있는 것으로 알려져 있다. [48] CD166과 CD146은 사람의 내피세포에 나타나는 표면 단백질로 immunoglobulin superfamily에 속해 있으며 활성화 된 T cell,

단핵구, 멜라닌 세포로부터 유래한 세포에서도 관찰된다.[49] 이들 세포의 세포 부착에 관여하여 활성화를 매개하는 것으로 알려져 있다. CD271은 신경세포의 생존을 자극하는 성장인자로 알려져 있다.[50] 몇몇 DPSC에서 발현되는 것으로 알려져 있으며, 연구 결과 CD271이 발현된 치수 세포는 CD105와 Notch2 또한 발현되는 것으로 나타났다.[51] 최근의 연구에 따르면 CD271은 DPSC를 포함한 중간엽 줄기세포의 골형성, 지방형성, 연골형성, 근육형성 계통으로의 분화를 억제하는 기능을 가진다고 한다.[52]

위에서 언급한 다양한 surface marker는 중간엽 줄기세포에서 발현되며 여러 연구 결과 DPSC에서도 발현이 일어난다고 알려져 있는 세포 표면 단백질들이다.[19, 20, 52-61] 이 surface marker들을 통해 DPSC를 확인하는 것이 가능하다.

조혈 줄기세포에서 특징적으로 발현되는 surface marker중에 DPSC에서 관찰되는 단백질들이 있다.

CD34는 다양한 조직의 혈관내피에서 발현되는 단백질로 조혈 원시세포에서 발현된다고 알려져 있다.[62] CD34는 일반적으로 조혈 줄기세포를 확인하는데 사용하는 marker이지만 몇몇 연구에서는 MSC와 DPSC에서도 발현이 된다고 알려져 있다.[63-66] CD117은 receptor tyrosine kinase type III로도 알려져 있으며 세포의 생존, 분열, 분화에 중요한 역할을 한다고

알려져 있다.[67] CD117 또한 CD34와 마찬가지로 조혈 줄기세포를 확인하는데 사용하는 marker 이지만 DPSC에서도 몇몇 연구 결과 발현이 된다고 알려져 있다.[55, 60, 63, 68, 69]

몇몇 surface marker는 분화능을 가지는 배아줄기세포에서 주로 발현되는데 DPSC에서도 관찰된다.

OCT-3/4는 POU family의 homeodomain transcription factor로 미분화된 배아줄기세포에서 self-renewal에 중요한 역할을 하는 단백질로 알려져 있다. 이와 같은 특성 때문에 미분화된 세포를 인지하는 marker로도 사용된다.[70, 71] NANOG 는 homeoprotein으로 미분화된 배아줄기세포에서 발현되는 단백질이다. 미분화 배아줄기세포의 self-renewal, pluripotency를 유지하는데 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다.[70]

위에서 언급한 다양한 surface marker는 여러 연구 결과 DPSC에서도 발현이 일어난다고 알려져 있는 세포 표면 단백질들이다. 따라서 줄기세포에서 특이적으로 발현되는 이러한 surface marker를 이용하여 DPSC를 분리, 확인하는데 사용할 수 있다. 그러나 아직까지 DPSC에만 특이적으로 발현되는 surface marker는 알려져 있지 않은 상태이고, 모든 DPSC에서 위의 표면 단백질이 발현되는 것은 아니기 때문에 surface marker를 이용한 DPSC 분리 시, 결과 해석에 주의가 필요하다.

DPSC를 정확히 분리, 확인하기 위해서는 DPSC에만 특이적으로 발현되는 surface marker의 발견이 필요할 것으로 보인다.

세 번째로 형광 DNA 결합 dye에 대한 줄기세포의 반응을 이용한 방법이 있다. 줄기세포의 일부에서는 Hoechst dye 33342라고 하는 형광 DNA 결합 dye의 세포 내 유입을 억제한다. 이 줄기세포 집단에는 Hoechst dye 33342를 세포 밖으로 내보내는 ATP-binding cassette transporter가 존재한다.[72] 이 방법을 이용하여 치수 조직으로부터 추출한 치수 세포들 중에 줄기세포인 DPSC를 선택적으로 분리, 확인할 수 있다.[31] 그러나 몇몇 연구에서는 이렇게 분리, 확인된 줄기세포가 줄기세포로서의 특징인 self-renewal activity를 가지지 않는다는 결과를 발표하였다. 또한 Hoechst dye를 사용하여 분리한 DPSC의 경우 DNA에 결합하는 Hoechst dye의 특성으로 인해 dye가 carcinogen, mutagen으로 작용할 수 있기 때문에 임상연구에 사용하기엔 적절하지 않을 수 있다. 그리고 몇몇 연구에서는 Hoechst dye 33342이 세포의 분화, clone 형성 능력을 손상시킨다는 결과를 나타내기 때문에 Hoechst dye 33342를 이용한 DPSC 분리, 확인법은 신중하게 사용되어야 할 것으로 보인다.[73, 74]

제 3 절 치수 줄기세포를 이용한 상아모세포로의 분화 유도 조건과 분화 증명 실험법

DPSC을 이용하여 상아모세포로 분화 유도한 실험은 2000년대 초반부터 활발히 시작되어 현재까지 이어지고 있다. DPSC를 상아모세포로 분화 유도한 22개의 연구 결과를 토대로 분화를 유도하기 위한 실험적 조건에 대해 알아보기로 한다. 또한 상아모세포로 분화되었음을 증명하는 실험들에 대해 알아보고 각 실험들의 의미, 실험이 행하여지는 조건에 대해 비교 분석함으로써 DPSC의 상아모세포로의 분화 유도에 관한 일반적인 기준을 제시해본다.

22개의 연구결과를 크게 in vitro와 in vivo 조건으로 나누어 비교 분석하겠다.

3.1 In vitro

총 22개의 연구 중 20개의 연구가 in vitro 환경에서 DPSC를 상아모세포로 분화 유도하였다. 종 별로 살펴보면 human

DPSC를 사용한 연구가 10개, rat (mouse 포함) DPSC를 사용한 연구가 9개, bovine DPSC를 사용한 연구가 1개, rabbit DPSC를 사용한 연구가 1개, porcine DPSC를 사용한 연구가 1개였다.

In vitro 환경에서 DPSC를 상아모세포로 분화 유도 하기 위해 사용한 DPSC의 세대 수 (passage)에 대해 분석해본다. 또한 DPSC를 상아모세포로 분화 유도 하기 위해 사용한 분화 유도 배지의 조성에 대해 분석해본다. 그리고 분화 유도 배지를 적용하여 분화를 유도하는 기간에 대해 비교해본다. 또한 각 연구들에서 상아모세포로 분화되었음을 입증한 실험들의 종류를 살펴보고 각 실험들의 의미, 실험이 진행된 시점에 대해 비교 분석해본다. 이를 통해 In vitro 환경에서 DPSC를 상아모세포로 분화시키기 위한 일반적인 기준을 확립해본다.

3.1.1 DPSC의 세대 수

22개의 연구를 분석해보면 DPSC를 상아모세포로 분화 유도할 때 사용한 DPSC의 세대수의 경향을 알 수 있다. 일반적으로 4세대 이하의 DPSC가 주로 사용되었음을 알 수 있는데 22개의 연구 중 17개의 연구에서 4세대 이하의 DPSC가 분화에 사용되었다. 모든 조건을 통제한 상황에서 세대수의 차이에 따른

분화 유도 능력을 비교해보는 실험이 위의 22개 연구에서는 실행되지 않아서 세대 수에 따른 DPSC의 상아모세포로의 분화 유도능의 차이는 정확히 언급하기 어렵지만 분석을 통해 4세대 이하의 DPSC를 이용한 분화 유도가 주류를 이룬다는 것을 알 수 있다. 일부 연구에서는 10세대 이상의 DPSC를 이용하여 분화 유도를 하였다. Kumabe 연구팀은 13세대의 DPSC를 alginate scaffold를 통해 배양하여 상아모세포로 분화 유도하는 연구를 시행하였고, Yang 연구팀은 10세대 DPSC를 adenovirus를 이용한 BMP-2 유전자 transfection을 통해 상아모세포로 분화 유도하는 실험을 행하였다.[29, 75] 이와 같이 10세대 이상의 DPSC를 이용한 상아모세포 분화 유도 실험은 alginate와 같은 특정 scaffold를 사용할 때나 virus를 이용한 유전자 transfection 시와 같이 특수한 환경에서 주로 이용되는 양상을 보였고 일반적인 상황에서는 4세대 이하의 DPSC가 주로 이용되는 양상을 보이므로 4세대 이하의 DPSC를 이용한 분화 유도가 일반적인 주류라고 볼 수 있겠다.

3.1.2 분화 유도 배지

동물세포를 배양할 때 사용되는 media는 여러 가지가 있다.

Media를 구성하는 요소는 크게 inorganic salts, amino acids, vitamins, carbohydrate source, 지시약과 같은 그 밖의 물질로 구성되어 있다. media마다 이들 요소를 구성하는 물질에 차이가 있고 함유한 양 또한 차이가 있다. 배양하고자 하는 세포의 특성에 알맞은 media를 선택하여 배양 하는 것이 중요하다.

22편의 연구에서 DPSC를 상아모세포로 분화 유도할 때 사용되는 분화 유도 배지를 살펴보면 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM), Alpha Modification of Eagles MEM (a-MEM), basal medium Eagle(BME), DMEM-F12 medium, MSCGM medium이 있었다. 사용 빈도를 살펴보면 총 22개의 연구 중 DMEM의 경우 6개의 연구에서 사용되었고 a-MEM은 12개, BME는 1개, DMEM-F12 medium은 2개, MSCGM medium은 1개의 연구에서 사용된 것을 알 수 있었다. 종 별로 나누어보면 전체 10개의 human DPSC 의 상아모세포로의 분화 연구 중에 DMEM이 2개의 연구에서 사용되었고 a-MEM이 6개, BME이 1개, MSCGM medium이 1개의 연구에서 사용되었고, DMEM-F12 medium은 사용되지 않았음을 알 수 있었다. 전체 9개의 Rat 유래의 DPSC 분화 연구 시에는 DMEM이 1개의 연구에서 사용되었고 a-MEM이 6개, DMEM-F12 medium이 2개의 연구에서 사용되었고, BME와 MSCGM medium은 사용되지 않았음을 알 수 있었다. bovine DPSC를 사용한

연구에서는 DMEM이 사용되었고, rabbit DPSC를 사용한 연구에서는 DMEM 또는 a-MEM이 사용되었으며, porcine DPSC를 사용한 연구에서는 DMEM이 사용되었음을 알 수 있었다.

DPSC의 상아모세포로의 분화 유도에 사용된 배지들의 특징은 다음과 같다.

Basal Medium Eagle (BME)은 1950년대에 Harry Eagle에 의해 HeLa 세포를 배양하는데 사용할 수 있도록 개발된 배지이다.[76] BME는 세포가 성장하는데 필요한 필수 영양분 및 기타 요인들 (무기염류, 비타민류)에 대한 연구의 결과로 얻어진 배지로, 현재 널리 사용되고 있는 MEM과 DMEM의 기본 조성이 된 배지이다. 이후 적절한 첨가제를 사용함으로써 좀 더 다양한 정상세포와 형질전환 세포의 배양에 적용할 수 있음이 보고되었다.

동물조직/세포배양을 위해서 BME가 처음 문헌에 발표된 후로 몇 번의 수정을 통해 발전되어 왔다. DMEM은 Minimum Essential Medium (MEM)에 D-glucose (1000 mg/L 또는 4500 mg/L)뿐만 아니라 고농도의 amino acids, vitamins을 첨가하여 개발된 것이다.[77]

Minimum Essential Media, Alpha Modification (Alpha

MEM)은 외래 DNA를 동물세포로 transfection시키기에 적당하도록 MEM에 아미노산 및 비타민이 강화되었다. MEM은 Harry Eagle에 의해서 개발된 것으로 현재 부착성 세포를 비롯한 여러 종류의 세포배양에 널리 사용되는 배양액이다. 초기에 개발된 BME로는 정상적인 섬유아세포와 특정 HeLa세포를 배양하는데 있어 영양분이 부족하다는 연구결과로 인해 이러한 점이 개선된 MEM이 개발되었다. MEM에는 아미노산이 고농도로 포함되어 있어 배양하는 세포의 단백질 합성이 용이하다. 또한 Hanks' salts 또는 Earle's salts가 포함된 조성에 비 필수 아미노산을 추가로 첨가 함으로써 더욱 다양한 세포 배양에 사용할 수 있다.

Chinese Hamster Ovary (CHO) 세포의 클론 성장 (clonal growth) 을 위해 1960년대에 Ham, R.G.에 의해 Ham's nutrient mixture들이 개발되었다. 이 배지들은 혈청을 대체하기 위해 영양소, 성장인자 그리고 호르몬 들이 첨가되어 있어 초기에는 무혈청 배지로 사용 되었고 HeLa세포와 mouse L-세포의 클론 성장에도 적합하며 현재에는 혈청을 첨가하여 좀 더 다양한 세포주를 배양하는데 사용하기도 한다. Ham's F-12 배지는 rat hepatocytes의 초대 배양 (primary culture)과 rat prostate epithelial cell의 배양에 사용된다. 특히 DMEM과 1:1의 비율로 섞은 DMEM/F-12 배지는 다양한 초대 배양에

적용할 수 있는 무혈청 배지로 사용되기도 한다.[78]

22개의 연구결과를 살펴보면 DPSC의 상아모세포로의 분화 연구 시 주로 사용되고 있는 배지는 a-MEM와 DMEM으로 볼 수 있다. 비록 Couble 연구팀이 human DPSC를 BME를 사용하여 상아모세포로 분화 유도하는데 성공하였지만 이 실험에서는 collagen-seperating 방법을 사용하여 single-cell suspension화 하지 않고 치수 조직을 explant 하여 배양했기 때문에 일반적인 DPSC 분화 유도 조건과는 차이가 있다. 또한 BME은 DMEM이나 a-MEM에 비해 포함된 아미노산, inorganic salt 등 세포의 유지에 부가적으로 필요한 요소들이 적게 함유되어 있기 때문에 상대적으로 효율적이지 않은 것으로 생각된다. DMEM/F12 medium은 일반적으로 무혈청 상태에서 세포를 배양하는데 최적화된 배지로, 혈청을 첨가하여 다양한 세포주를 배양할 수 있다고 알려져 있다.[78] 또한 DMEM/F12 medium의 경우 특히 세포의 초대 배양 시 효과적인 것으로 알려져 있다. Yu, Prescott 연구팀은 10%의 혈청 첨가 하에 DMEM/F12 medium으로 rat의 DPSC를 상아모세포로 분화 유도하였지만, 대부분의 rat DPSC 분화 유도 시 a-MEM이나 DMEM이 사용되었기 때문에 DMEM/F12 medium을 이용한 분화 유도가 주류는 아니라고 볼 수 있다.[24, 27] 또한 DPSC를 이용한 분화 연구 시 초기 세대 보다 여러 세대가 지난 DPSC의

경우 분화능이 더 크다고 언급한 연구가 있기 때문에 DMEM/F12 medium보다 a-MEM, DMEM을 사용하는 것이 일반적이라고 보인다.[75, 79]

a-MEM와 DMEM을 비교해보면, 두 media 다 minimal essential medium으로부터 유래되었지만 차이가 존재한다. DMEM의 경우 a-MEM에 비해 상대적으로 고농도의 glucose, 아미노산, vitamin이 첨가되어 있다. 그에 반해 a-MEM은 DMEM에 존재하지 않는 지질 성분 (lipoic acid)과 아미노산 성분 (L-alanine, L-aspartic acid, L-cysteine HCl H_2O 등)이 포함되어 있으며 DMEM에는 들어있지 않은 ascorbic acid가 포함되어 있다. (Table 2) Ascorbic acid의 경우 ECM을 구성하는 collagen 형성에 cofactor로 작용하기 때문에 상아모세포에 의한 ECM 형성에 중요한 성분이다. 두 media 모두 분화 유도에 사용되지만 22편의 연구 중 a-MEM을 사용하여 분화 유도한 실험이 DMEM 사용에 비해 더 많은 점은 주목할 만하다. 특히 a-MEM의 경우 외래 DNA를 동물세포로 transfection을 유도하는데 좋다고 알려져 있기 때문에 BMP-2 등 특정 유전자를 transfection 시켜 분화를 유도하는 실험의 경우 a-MEM을 사용하여 분화 유도하는 것이 적절하다고 보인다.[26] 분화 유도 배지로 DMEM을 사용할 때에는 반드시 ascorbic acid를 추가로 첨가해줘야 상아모세포로의 적절한

분화를 유도할 수 있다.

Beta-glycerolphosphate (β-GP)는 DPSC를 상아모세포로 분화 유도하는 배지에 빈번하게 첨가되는 물질이다. Couble 연구팀의 연구 결과에 따르면, β-GP를 첨가한 분화 유도 배지에서 배양한 실험군과 β-GP를 첨가하지 않은 분화 유도 배지에서 배양한 대조군에서 ECM의 mineralization을 비교했을 때 실험군에서는 ECM의 mineralization이 활발하게 일어났지만 대조군에서는 mineralization이 관찰되지 않았음을 확인하였다.[37] Mineralization은 DPSC가 상아모세포로 분화되었을 때 나타나는 일반적인 현상이다. 이는 β-GP가 DPSC의 상아모세포로의 분화에 결정적으로 작용하는 물질이라는 것을 증명한다. 또한 분화 유도 배지 처리 후 초기에 실험군에서 분화 과정에서 관찰되는 세포의 극성화 (polarization)가 대조군에 비해 훨씬 높은 정도로 관찰되었다. 세포가 극성화된 이후 apical pole에서 ECM 형성을 위한 vesicle이 분비되기 때문에 세포 내의 극성화는 중요한 현상이라고 볼 수 있다. 따라서 이 또한 β-GP가 분화에 중요한 요소임을 입증하는 것이라 볼 수 있다. 일반적으로 β-GP는 organic phosphate로 세포 대사 시 glycerol과 phosphate 사이의 결합이 끊어져 세포에 inorganic phosphate의 공급을 원활히 하는 역할을 한다고 알려져 있다. 특히 상아모세포처럼 경조직을 생성하는

세포의 경우 ECM의 mineralization에 phosphate가 더 많이 필요하게 된다. 따라서 β-GP의 경우 상아모세포 분화에 필수적인 요소라 할 수 있다. 22개의 연구 결과를 비교해보면 일반적으로 분화 유도 배지에 β-GP는 10mM의 농도로 첨가됨을 알 수 있었다. β-GP를 분화 유도 배지에 첨가하지 않고도 DPSC를 상아모세포로 분화 유도한 몇몇의 실험들도 존재하는데 이 경우는 β-GP 이외의 다른 phosphate 공급 물질을 첨가하여 해결하였다.

Ascorbic acid 또한 DPSC를 상아모세포로 분화 유도하는 배지에 빈번하게 첨가되는 물질이다. Ascorbic acid는 ECM을 구성하는 collagen 형성 시 효소 반응을 매개하는 cofactor로 작용한다.[80] 소포체 (endoplasmic reticulum)에서 pre-pro-collagen이 세 가지의 변형을 거쳐 procollagen으로 바뀌는데 첫 번째 과정은 N-terminal의 signal peptide가 잘려 나가는 것이고 두 번째 과정은 prolyl hydroxylase과 lysyl hydroxylase에 의해 proline과 lysine이 hydroxylation 되는 것이다. 세 번째 과정은 lysine의 hydroxyl group에 glycosylation이 일어나는 것이다. Ascorbic acid는 두 번째 과정인 prolyl hydroxyase와 lysyl hydroxylase에 cofactor로 작용하여 전자를 전달하는 역할을 한다. proline과 lysine의 hydroxylation은 collagen의 triple helix 구조 형성에 필요한 중요한 단계이기 때문에

collagen 합성 시 ascorbic acid는 꼭 필요한 요소라고 할 수 있다. DPSC 분화에 사용되는 media에 ascorbic acid는 포함되어 있지 않다면 media에 추가로 첨가시켜줘야 한다. 22개의 연구 결과를 비교해보면 일반적으로 분화 유도 배지에 ascorbic acid는 50ug/mL의 농도로 첨가됨을 알 수 있었다.

항생제는 분화 유도 배지에 반드시 첨가시켜 줘야 할 요소이다. 세포를 배양하는데 있어서 배양하고자 하는 세포만 잘 자랄 수 있는 환경을 조성해주고 병원균은 배지 내에서 자라지 못하도록 하는 것은 세포를 배양하는데 매우 중요한 요소이다. 병원균에 의해 배지가 오염이 되는 것을 막기 위해 배지에 첨가시켜 주는 것이 항생제이다. 일반적으로 사용되는 항생제는 penicillin-streptomycin이다. Penicillin은 beta-lactam 계열의 항생제로 세균의 세포벽을 구성하는 peptidoglycan의 cross-link 형성을 억제하여 세균을 죽이는 살균성 항생제이다. Penicillin은 일반적으로 Gram 양성균에 작용하는 항생제이다. streptomycin은 aminoglycoside 계열의 항생제로 bacterial ribosome의 30S subunit을 구성하는 16S rRNA에 결합하여 30S subunit에 formyl-methionyl-tRNA가 결합하는 것을 방해하여 단백질 합성을 억제함으로써 세균의 대사를 막는다. Streptomycin은 Gram 양성균과 음성균 모두에 작용한다. Penicillin에 의해 세균의 세포벽 형성을 막으면 streptomycin이

세균의 세포 내로 침투하기가 용이하기 때문에 두 항생제를 함께 사용하면 배지 내에 세균이 자라는 것을 더욱 잘 억제할 수 있다. 몇몇 Rat DPSC 분화 연구에서 gentamicin이 항생제로 사용되는 것을 볼 수 있다. Gentamicin은 aminoglycoside 계열의 항생제로 bacterial ribosome의 30S subunit에 결합하여 단백질 합성을 막는 살균성 항생제이다. Gentamicin은 그람 양성균과 음성균 모두에 작용한다. 22개의 연구 결과를 비교해보면 일반적으로 differentiation media에 penicillin은 100U/mL, streptomycin은 100ug/mL의 농도로 첨가됨을 알 수 있었다. Gentamicin은 50ug/mL의 농도로 첨가됨을 알 수 있었다.

일부 실험에서는 분화 유도 배지에 amphotericin B를 첨가한 것을 볼 수 있다. amphotericin B은 방사균 *Streptomyces nodosus*가 생산하는 폴리엔계 항생물질로 항진균작용을 가지기 때문에 이와 같은 목적에 의해 첨가되기도 한다.

혈청은 DPSC의 분화 연구에 사용되는 대부분의 배지에 첨가되어 사용된다. 혈청은 기본 배지에는 존재하지 않지만 세포 배양을 위해 꼭 필요한 성분들을 공급해주는 역할을 하며 매우 적은 양의 항체를 함유하는 반면 세포 성장에 필요한 성장인자를 다량 함유하고 있기 때문에 세포 배양에 널리 사용된다.[81] 혈청 성분으로는 insulin, transferrin 등의 펩티드성 호르몬, 스테로이드호르몬, 접착인자로서의 fibronectin, 지질 성분의

담체로서의 lipoprotein, selenium 등의 미량금속이 있다. 22개의 연구에 사용된 배지 조성을 보면 21개의 연구에서 media에 혈청 성분을 첨가하여 배양한 것을 알 수 있으며 사용된 혈청은 Fetal bovine serum (FBS)가 10개의 연구에서, Fetal calf serum (FCS)가 11개의 연구에서 사용되었다. FBS는 소의 태아로부터 추출한 혈청을 말하며 FCS는 대략 16개월 된 송아지에서 채취한 혈청을 말한다. FBS와 FCS는 항체와 호르몬의 양에 차이가 난다. FBS의 총 단백질량은 3.6 mg%인데 반하여 FCS는 6.5 mg%로서 FCS의 단백질량이 FBS의 2배에 달한다. FCS의 항체 양도 FBS의 대략 100배정도 더 많이 함유되어 있다. FCS가 FBS에 비해 가격면에서 경제적이지만, 일반적인 세포 배양 시 FBS가 FCS에 비해 더 적절하다고 여겨지는데 그 이유는 생활환경이 항상적으로 품질간 분산이 비교적 적다는 것, 알부민 대신 태아성 단백질인 페투인 (fetuin)을 포함하여 많은 세포의 증식이나 유지에 유효하다는 것, 지방 함량이 적고 투명하여 취급이 쉽다는 점을 들 수 있다. DPSC의 상아모세포 분화 유도 시 FBS, FCS에 상관없이 두 경우 모두 분화 유도에 성공한 결과를 보이므로 두 혈청 중 어떤 것을 사용하더라도 결과에 유의미한 차이를 보이진 않는다고 볼 수 있다.

혈청의 농도가 세포 분화에 영향을 미친다는 연구결과가 있다. 22개의 연구 결과를 비교해보면 첨가한 혈청의 농도는 크게

10%, 15%, 20%로 나누어 볼 수 있다. Couble 팀의 연구에서 배지에 10% FCS를 첨가한 경우와 15% FCS를 첨가한 경우를 나누어 DPSC를 분화유도 시켜 보았다.[37] 5-6주동안 배양한 후 세포의 형태와 ECM 생성 양상을 비교해보았는데 10% FCS 환경에서 자란 DPSC의 경우에 비해 15% FCS 환경에서 자란 DPSC에서 더 많은 세포가 극성화된 형태를 나타내었고 cellular process가 같은 방향으로 정렬되어 있는 양상을 나타내었다. 또한 DSPP에 대하여 in situ hybridization을 시행하였을 때, 10% FCS 환경에서 자란 DPSC의 경우 DSPP 발현이 explant 변연부에는 관찰되지 않는 반면에 15% FCS 환경에서는 변연부에서도 DSPP 발현이 관찰되었다. 극성화된 세포는 apical pole 방향으로 ECM 형성 물질들을 활발히 분비할 수 있기 때문에 상아모세포와 같이 ECM 형성을 활발히 하는 세포에서 잘 나타나는 형태이다. 또한 dentin-specific marker로 알려져 있는 DSPP의 발현을 변연부에서도 유도한 15% FCS 환경이 10% FCS 환경보다 DPSC의 상아모세포로의 분화에 더 적절한 조건임을 실험을 통해 증명하였다. 그러나 10%, 15%와 20% 혈청을 첨가하여 분화 유도 정도를 비교한 연구는 시행되지 않았기 때문에 20% 혈청 농도에 대해서는 10%, 15% 혈청과 비교하여 분화 유도의 적절성을 판단하긴 어렵다.

DPSC의 상아모세포로의 분화에 있어서 dexamethasone이

효과적으로 작용한다는 데에 있어서는 아직 논란이 있다. Brigitte팀의 연구에 따르면 dexamethasone을 첨가했을 때가 그렇지 않을 때와 비교해서 DPSC의 상아모세포로의 분화를 촉진한다고 결론을 내렸으며 그 증거로 ALP activity 상승, 주된 odontoblastic marker로 알려져 있는 dentin sialophosphoprotein (DSPP)의 발현 증가를 들었다.[82] 그 밖에도 여러 연구에서 dexamethasone은 배지에 포함되었을 때 ECM의 mineralization을 증가시키고 상아모세포로의 분화를 촉진하는 효과가 있다는 결론을 도출하였다. 또한 Zhang 팀의 연구 결과를 보면 dexamethasone이 포함된 배지에서 DPSC를 배양한 실험군과 dexamethasone이 포함되지 않은 상태에서 DPSC를 배양한 대조군의 calcium nodule 형성 정도를 비교한 결과 실험군에서는 calcium nodule 형성이 활발하였지만 대조군에서는 그렇지 않다는 사실을 알 수 있다.[22] 22개의 연구 중 8개의 연구에서 분화 유도 배지에 dexamethasone을 첨가하였고 그 결과 상아모세포로의 분화를 유도하였다. 하지만 이들 중 일부 연구에서는 대조군을 형성할 때 dexamethasone만을 제외하고 나머지 조건을 똑같은 조성으로 한 것이 아니라 일반적으로 상아모세포 분화 유도 배지에 첨가되어야 한다고 알려져 있는 β-GP, ascorbic acid 또한 제외하여 배양한 후 결과 비교를 하였기 때문에 대조군에서 상아모세포로의 분화를 관찰하지 못한 것이 순전히

dexamethasone의 영향이라고 말할 수는 없다. 또한 Iohara 팀 등 여러 연구팀의 연구 결과를 보면 분화 유도 배지에 dexamethasone을 첨가하지 않은 상황에서도 DPSC를 상아모세포로 분화 유도하는데 성공하였다.[33] 이 결과를 보면 dexamethasone이 상아모세포로의 분화에 반드시 필요한 구성 요소라고는 볼 수 없을 것 같다. 이 부분은 이후 더 많은 연구결과를 놓고 비교해 보아야 할 것으로 보인다. Dexamethasone 첨가 시엔 일반적으로 10^{-8} M로 첨가한다.

BMP-2도 DPSC의 상아모세포로의 분화유도 시 자주 첨가되는 물질이다. 지금까지 시행된 여러 DPSC의 상아모세포로의 분화유도 연구에서 BMP-2 첨가는 상아모세포로의 분화에 효과적으로 영향을 미치는 인자로 알려져 있다. 예를 들면, Nakashima, Iohara, Yang, Okamoto, Ahmed 팀의 연구 결과, BMP-2 첨가 시 첨가하지 않은 대조군에 비해 ALP activity가 상승하였고 mineralized ECM형성이 현저히 증가했으며 Dmp1, Dspp, enamelysin, Phex 등의 dentin specific marker들의 발현도 증가하였음이 관찰되었다.[26, 33, 83-85] 이렇듯 BMP-2를 첨가했을 때 DPSC가 상아모세포로 분화하는 경향이 증가하는 것은 사실이다. 하지만 BMP-2가 분화 과정에서 결정적으로 영향을 미친다고는 볼 수 없는데 그 이유는 dexamethasone과 마찬가지이다. BMP-2를 첨가하지

않은 상태에서 분화에 결정적으로 영향을 미친다고 알려진 β-GP, ascorbic acid가 첨가된 분화 유도 배지에서 배양 시 상아모세포로의 분화가 유도될 수 있기 때문이다. 따라서 BMP-2는 분화에 결정적인 요소는 아니지만 첨가 시에 분화 유도가 더욱 효율적으로 일어날 수 있도록 한다고 볼 수 있다. 일반적으로 분화 유도 배지에 BMP-2를 첨가할 때 농도는 50 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL가 사용되는데 Iohara 팀의 연구 결과에 따르면 각각 50 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL의 BMP-2를 첨가하여 분화 유도 했을 때, dentin specific marker들의 발현이 dose dependant하게 증가했음을 알 수 있었다.

L-glutamine은 분화 유도 배지 구성에 꼭 필요한 아미노산이다. Glutamine은 세포의 주요한 탄소원과 에너지원 중 하나로 배지에 첨가된 액체 상태의 glutamine은 불안정하기 때문에 다른 아미노산보다 높은 농도로 배지에 첨가해주게 된다. 그런데 glutamine은 분해되는 과정에서 ammonia를 형성하기 때문에 너무 과량으로 첨가해주면 분해과정에서 발생하는 ammonia의 양이 많아져 세포에 독성 물질로 작용, 세포의 생존을 위협할 수 있다. 따라서 적절한 양의 glutamine 첨가가 필요하다. 일반적으로 a-MEM, DMEM에 glutamine이 첨가되어 제조되는 것도 있고 그렇지 않은 것도 있다. 첨가되어 있는

제품의 경우 따로 glutamine 첨가 없이 실험에 사용하면 되고 glutamine이 첨가되어 있지 않은 경우엔 2 mM 정도의 농도로 첨가하여 사용한다.

Vitamin D는 분화 유도 배지에 꼭 필요한 성분은 아니다. 대부분의 상아모세포 분화 연구에서 vitamin D는 배지 조성에 포함되어 있지 않다. 그러나 Huang 팀의 연구 결과를 보면 dexamethasone이 첨가된 분화 유도 배지에 vitamin D를 5×10^{-8} M 첨가했을 때 상아모세포로의 분화가 촉진되었음을 알 수 있었다. [86]

정리하면, DPSC를 상아모세포로 분화 유도 하는데 사용되는 differentiation media에 반드시 포함되어야 하는 구성 요소로 a-MEM 또는 DMEM, 10 mM β-GP, 50 ug/mL ascorbic acid, penicillin 100 U/mL- streptomycin 100 ug/mL (또는 Gentamicin 50 ug/mL), 15% FBS(또는 FCS)가 있으며 a-MEM 또는 DMEM에 L-glutamine이 포함되어 있지 않은 경우엔 2 mM L-glutamine의 첨가가 필요하다. Dexamethasone, BMP-2은 현재까지는 분화 유도 배지의 필수 요소라는데 논란이 있는 상황이다.

3.1.3 분화 유도 기간

DPSC를 분화 유도 배지에 배양하여 상아모세포로 분화를 유도하는 기간은 각 연구마다 약간의 차이가 있다. 22개의 연구를 보면 짧게는 1주, 길게는 8주까지 분화 유도 배지 상에서 DPSC를 배양한 것을 볼 수 있다. 상아모세포로 분화되었음을 검증하는 여러 실험들이 있고 각 실험마다 결과가 얻어지는 시점이 다르기 때문에 행하여진 실험에 따라서 분화 유도 기간에 차이가 있다고 볼 수 있다.

3.1.4 분화를 증명할 주요 실험들

DPSC가 상아모세포로 분화되었음을 입증하는 실험들은 다양하다. 다른 세포와는 다른 상아모세포의 특징을 이용한 검증법이 DPSC가 상아모세포로 분화되었음을 증명하는데 중요하다. 다음 3가지의 실험이 이에 해당된다고 볼 수 있다.

1) Alkaline phosphatase activity test

Alkaline phosphatase (ALP)는 hydrolase의 일종으로 세포내의 여러 분자에서 phosphate 기를 분리시키는 역할을

하는 효소이다.[87] Radioactive phosphate를 포함한 환경에서 세포를 배양할 경우 DNA의 phosphate기가 radiolabeling된다. DNA의 5' end에는 phosphate기가 연결되어 있는데 ALP는 5' end의 phosphate를 DNA로부터 분리시켜 3' end에서 5' end로의 부착이 일어나지 않도록 유도한다. 분리된 radioactive한 phosphate를 정량함으로써 DNA 양을 유추할 수 있기 때문에 세포의 분열능과 세포 내 ALP의 활성을 알 수 있다.

골과 치아와 같은 경조직을 형성하는데 Alkaline phosphatase는 매우 중요한 역할을 한다. 경조직이 형성되려면 ECM에 calcium phosphate의 침착이 이루어져야 하며 calcium ion과 phosphate ion이 공급되어야 한다. 이 때의 phosphate ion은 inorganic한 것이기 때문에 세포내의 organic phosphate의 inorganic phosphate로 변환이 필요하다. ALP는 organic phosphate의 organic component와 phosphate component의 결합을 끊어 ECM의 calcium phosphate 침착에 필요한 inorganic phosphate를 공급해주는 역할을 한다. 따라서 경조직의 형성에 매우 중요한 기능을 하는 것으로 볼 수 있다. 세포 배양 시 세포 내 ALP 농도의 증가는 mineralized ECM의 형성이 활발히 일어나고 있음을 나타낸다. DPSC에서 세포 내 ALP의 농도 증가는 ECM의 mineralization을 활발하게 유도하는 상아모세포/골모세포로의 분화가 유도되었음을 나타내는 지표로

사용된다. 따라서 DPSC의 상아모세포로의 분화를 연구한 여러 논문들에서 분화 유도의 지표로 사용되었다.

이번 연구에 사용되는 22편의 논문들 중 DPSC의 상아모세포로의 분화를 증명하는 방법으로 ALP activity을 근거로 채택한 논문들의 수는 22편 중 14편으로 약 63.6%의 사용빈도를 보였다. 이는 DPSC의 상아모세포로의 분화를 증명하는 방법으로 ALP activity의 형성이 매우 중요한 실험적 근거로 적용되고 있음을 나타낸다.

ALP activity를 측정한 14편의 논문들을 비교해보면 분화 유도 배지에서 배양한 후 3-4주 간의 기간에 걸쳐서 ALP activity를 측정하였고 일반적으로 약 1주 간격으로 ALP activity를 측정한 것을 알 수 있다. 일반 culture dish에서 DPSC를 분화 유도한 경우 분화 유도 1주에서 2주로 접어들 때 ALP activity가 큰 폭으로 상승하는 것을 볼 수 있었다. 따라서 ALP activity test를 적어도 분화 유도 후 2주 시점 까지는 시행하여야 상아모세포로 분화되었음을 밝힐 수 있는 실험적 근거를 마련할 수 있을 것이다.

일부 3D scaffold를 사용하여 배양한 경우는 ALP activity 증가 시점이 일반 culture dish보다 늦기 때문에 이를 감안하여 ALP activity를 측정해야 한다. Zhang 팀의 연구 결과에 따르면 HA-TCP를 scaffold로 사용하여 분화 유도한 경우 ALP

activity가 분화 유도를 시작한 시점으로부터 4주 째부터 크게 증가하기 때문에 ALP activity 실험을 4주 이후까진 진행해야 상아모세포로 분화되었음을 확실하게 증명할 수 있을 것이다.[22]

2) Calcium nodule (content) detection test

Calcium nodule의 형성을 확인하는 것은 DPSC가 상아모세포로 분화하고 있음을 알려주는 좋은 지표이다. Calcium nodule의 형성을 확인하는 염색법은 여러 가지가 존재하는데 자주 사용되는 것으로 alizarin red staining, von Kossa staining이 있다. 또한 sample에 존재하는 calcium content를 측정하는 *o*-cresolphthalein complexone method는 상아모세포로의 분화를 확인하는 좋은 실험법이다.

Alizarin red staining은 calcium의 유무를 판별하는데 널리 사용되는 염색법이다.[88] alizarin (1,2-dihydroxyanthraquinone)은 붉은 빛을 띄는 염료로 free calcium에 적용되었을 때는 free calcium과 결합하여 침전물을 형성하고, calcium을 포함하는 조직에 적용되었을 때는 스며들어 즉시 붉은 색을 띄게 만든다. 따라서 alizarin을 통한 염색은 석회화 침착의 유무를 확인하는데 필요한 생화학적 실험법으로

널리 사용되고 있다.

Von Kossa staining은 von Kossa라는 사람이 만든 염색법으로 배양된 세포와 조직 절편의 mineralization을 정량화 하는데 널리 사용되는 염색법이다.[89] 염색을 위한 매개체로 silver ion이 사용되며 silver nitrate 용액을 배양된 세포나 조직 절편에 처리했을 때 calcium 대신 silver ion이 phosphate와 반응하여 결합한다. calcium을 silver ion으로 치환시킨 후 광조사 하에 silver phosphate를 silver로 환원을 유도하여 cell culture나 조직 절편 내의 calcium 침착의 유무를 판별하는 방법이다.

o－cresolphthalein complexone method는 calcium이 alkaline medium상에서 *o*－cresolphthalein complexone와 반응했을 때 보라색을 띄는 complex를 형성하는 것을 이용한 방법이다. complex 형성 후 540nm의 광원을 통해 intensity를 조사하여 calcium의 존재 정도를 정량할 수 있다.

이 밖에도 scanning electron microscope (SEM)을 통해 Calcium nodule 형성을 관찰한 연구도 있었고 mineralization을 측정하기 위해 culture 내의 전체 calcium의 정량을 측정하는 calcium－C test와 같은 방법을 통해 mineralization 양상을 관찰한 연구도 있었다.

이번 연구에 사용되는 22편의 논문들 중 DPSC의 상아모세포로의 분화를 증명하는 방법으로 calcium nodule 형성을 근거로 채택한 논문들의 수는 22편 중 17편으로 약 77.3%의 사용빈도를 보였다. 이는 DPSC의 상아모세포로의 분화를 증명하는 방법으로 calcium nodule의 형성이 매우 중요한 실험적 근거로 적용되고 있음을 나타낸다.

Calcium nodule 형성을 관찰한 17편의 연구 중 Alizarin red staining을 시행한 연구는 7개였고 주로 human DPSC에서 시행되었다. Alizarin red staining을 시행한 기간은 연구마다 차이가 존재하였다. 짧게는 2주, 길게는 8주까지 분화 유도 후 Alizarin red staining를 시행하였다. Iohara, Kumabe, Yu, Nam 팀의 연구에 따르면 분화 유도 후 2-3주째에 calcium nodule이 형성되기 시작한다는 것을 알 수 있다.[23, 33, 75, 90] 따라서 Alizarin red staining은 적어도 분화 유도 후 2-3주 이후에 시행하면 calcium nodule 형성을 발견할 수 있을 것이다.

Von Kossa staining은 17편의 연구 중 5개에서 시행되었고 human, rat DPSC를 대상으로 시행되었다. Couble, Yu, Takeda팀의 연구에 따르면 분화 유도 후 2주째에 calcium nodule이 형성되기 시작한다는 것을 알 수 있다.[23, 37, 91] 따라서 Von Kossa staining은 적어도 분화 유도 후 2주 이후에 시행하면 calcium nodule 형성을 발견할 수 있을 것이다.

o-cresolphthalein complexone method는 17편의 연구 중 4개에서 시행되었고 모두 rat DPSC를 대상으로 시행되었다. Zhang, Yang팀의 연구 결과, 분화 유도 후 8일에서 24일 사이에 calcium content가 크게 상승한다는 것을 알 수 있다.[22, 42] 따라서 *o*-cresolphthalein complexone method는 적어도 분화 유도 후 8일에서 24일 사이에 시행하여야 유의미한 결과를 얻을 수 있다.

3) Odontoblast specific gene 발현

줄기세포가 특정 분화세포로 분화하는데에는 해당 분화세포에 특징적인 유전자 발현이 필요하다. 이 유전자는 mRNA로 전사된 후 mRNA에 의해 단백질로 번역되는 과정을 거친다. DPSC에서 상아모세포로 분화가 일어날 때에도 상아모세포에서 특징적으로 발현되는 유전자에 대한 전사, 번역과정이 진행된다.

mRNA 발현은 reverse transcription-PCR (RT-PCR), real time PCR, northern blot, microarray 등의 실험방법으로 확인한다. 이 중 Real time PCR은 PCR 증폭 산물의 확인을 위한 전기 영동이 필요 없으며, 증폭이 지수함수적으로 일어나는 영역에서 증폭 산물량을 비교하여 보다 정확한 정량이 가능한

신속성과 정량성이 뛰어난 방법이다. DPSC가 상아모세포로 분화함을 확인하기 위해 mRNA가 발현되는지의 여부를 관찰할 때 사용하는 유전자는 골이나 상아질생성 시에 특징적으로 발현되는 dentin sialophosphoprotein (Dspp), dentin sialoprotein (Dsp), osteocalcin (Ocn), osteopontin (Opn), collagen type I (Col I), ALP, dentin matrix protein-1 (Dmp-1) 등이 있다.

Dspp는 치아를 구성하는 상아질의 ECM의 두 가지 중요한 단백질, dentin sialoprotein과 dentin phosphoprotein을 인코딩한다. 상아모세포로부터 발현된 DSPP는 전사와 번역 이후 번역 후 변형과 분리과정을 거쳐 상아기질에 주로 발현되는 DSP와 DPP를 만들게 된다. DSP와 DPP은 상아질의 non-collagenous matrix protein으로 상아질의 정상적인 형성에 중요한 단백질로 알려져 있다. Dsp와 Dpp는 collagenous predentin matrix의 형성이 일어난 이후에 발현되며 상아질 신생과정 (dentinogenesis)에 연관되어 중요하다. 최근 상아질 형성 부전증이나 상아질 이형성증과 같은 유전성 상아질 질환 환자에서 Dsp와 Dpp의 발현이 비정상적인 양상을 보이는 것이 알려졌고 이로 인해 상아질의 성숙에 Dsp와 Dpp가 중요한 기능을 한다고 생각되고 있다. 이와 같이 DSPP, DSP, DPP는 상아질을 구성하는 protein으로 상아질에서 그 발현량이 현저히

높기 때문에 상아모세포를 찾는 specific marker gene으로 여겨지고 있다.

Osteocalcin은 bone γ-carboxyglutamic acid-containing protein으로도 알려져 있는 단백질로 골과 상아질에서 발견되는 non-collagenous protein이다. Osteocalcin은 신체의 대사조절과 골 형성에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며, 골모세포로부터 만들어져 분비되기 때문에 실험 시 골형성과정에 관한 specific marker로서 사용되고 있다.

Bone sialoprotein-1 (BSP-1), early T-lymphocyte activation (ETA-1), secreted phosphoprotein-1 (SPP1), 2ar and Rickettsia resistance (Ric)로도 알려져 있는 osteopontin은 골의 ECM을 구성하는 유기 구성요소이다. 골의 remodeling 뿐만 아니라 면역기능 조절, 면역세포들의 화학주성 (chemotaxis), 세포 활성화, 세포 자가 사멸(apoptosis) 과정을 매개한다고 알려져 있다.

collagen type I은 ECM를 구성하는 주요성분으로 조직을 지지하는 기능을 가지며 골이나 치아에서 석회화가 일어날 수 있는 기질을 제공해준다. DPSC가 상아모세포로 분화한 후 상아질을 형성할 때 많은 양의 ECM를 생성하기 때문에 collagen type I의 발현량도 높게 나타나게 된다.

ALP는 세포내의 여러 분자에서 phosphate기를 분리시키는 역할을 하는 효소로, 골이나 치아 같은 경조직 형성 시에 organic phosphate의 organic component와 phosphate component의 결합을 끊어 extracellular matrix의 calcium phosphate 침착에 필요한 inorganic phosphate를 공급해주는 역할을 한다.

Dmp-1은 bone과 상아질의 mineralization에 중요한 역할을 하는 단백질로 DPSC가 상아모세포로 분화되었을 때 발현이 증가하기 때문에 specific marker로 실험에 이용되고 있다.

지금까지 언급한 유전자로부터 발현되는 단백질은 상아모세포로부터 생성된 상아질의 성숙에 큰 영향을 미치며 신체 내 세포들 중 골과 상아질에 특징적으로 발현하는 양상을 보이기 때문에 이들의 발현이 증가된 결과는 DPSC이 상아모세포로의 분화가 진행됨을 의미한다. 따라서 이 유전자들은 specific marker gene으로서 이들의 발현을 조사하는 것은 상아모세포로의 분화유도를 증명하는데 확실한 증거가 된다.

이번 연구에 사용되는 22편의 논문들 중 DPSC의 상아모세포로의 분화를 증명하는 방법으로 dentin specific marker gene의 발현 결과를 근거로 채택한 논문들의 수는 22편 중 17편으로 약 77.3%의 사용빈도를 보였다. 이는 DPSC의 상아모세포로의 분화를 증명하는 방법으로 dentin specific marker gene의 발현 결과가 매우 중요한 실험적 근거로

적용되고 있음을 나타낸다

Col I과 ALP는 분화 유도 후에 비교적 이른 시기에 전사되기 시작한다. 연구마다 약간의 상이함은 있지만 일반적으로 Col I은 분화 유도 시작부터 2주까지 전사되는 양이 증가하고 이후로는 약간 감소하다가 3, 4주째에 다시 증가하는 양상을 보인다.[33, 83, 90] ALP는 분화 유도 시작부터 전사량이 서서히 계속 증가하여 2, 3주까지 증가하다가 일정 수준을 유지한다.[28, 83] 이에 비해 Dspp, Ocn, Dmp-1는 분화 유도 후 비교적 후기에 전사되기 시작한다. Dspp는 분화 유도 일주일 정도부터 전사율이 증가하며 1-2주 사이에 급격히 증가하는 양상을 보인다.[26, 28, 30, 90] Ocn 또한 분화 유도 일주일 정도까지 전사량이 낮게 유지되다가 1-2주사이에 급격히 증가하는 양상을 보이고 이후로는 감소하는 양상을 보이다 3주부터 약간 증가하는 양상이다.[26, 28, 30, 90] Dmp-1도 분화 유도 후반기인 3주경에 전사가 증가하는 양상을 보인다.[33, 90]따라서 이러한 dentin specific marker gene의 전사 시기의 경향성을 염두에 두고 mRNA 전사 양상을 측정한다면 실험에서 불필요한 오류를 줄일 수 있을 것이다.

3.1.5 분화를 증명할 그 밖의 실험들

1) Western blot

Sample 내에서 특정 단백질의 존재 유무를 판별하는 실험법으로 상아모세포에 특징적으로 발현되는 단백질의 존재 유무를 판별하여 분화가 유도되었는지 확인할 수 있다. 그러나 PCR 방법을 통한 mRNA 발현을 조사하는 것이 유전자 발현을 알아보는데 상대적으로 더 간편하고 정확하기 때문에 더 빈번하게 적용되고 있다. 22개의 연구 중, 3개의 연구에서 DSPP, DMP-1, DSP를 검출하기 위해 시행되었다.

2) Tissue morphology analysis

세포의 형태와 주위 ECM의 분포를 주사전자현미경 (scanning electron microscope, SEM) 등의 현미경적 분석 방법을 통해 관찰, 분석하는 방법이다. 세포의 형태와 주위 ECM의 구조를 관찰함으로써 미분화 상태인 줄기세포가 특정 세포로 분화되었음을 확인할 수 있다. DPSC가 상아모세포로 분화되면 특징적인 cellular process와 mineralizated ECM을 관찰할 수

있다. 22개의 연구 중, 9개의 연구에서 시행되었다.

3) Immunohistochemistry

Immunohistochemistry는 세포와 주위 조직에 발현되는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 처리하여 해당 단백질이 존재하는지를 확인하는 실험법이다. STRO-1 등과 같은 stem cell marker나 odontoblast specific protein, dentin specific protein (DSPP, DSP, DMP-1 등) 등에 특이적으로 결합하는 항체를 처리하여 상아모세포로 분화되었음을 확인하였다. 22개의 연구 중, 12개의 연구에서 시행되었다.

4) In situ hybridization

형광 또는 방사선 표지된 DNA나 RNA를 사용하여 조직 내에 존재하는 특정 DNA나 RNA 서열과 혼성화 (hybridization)를 유도, 해당 유전물질이 존재하는지 여부를 확인하는 방법이다. 상아모세포로 분화되었음을 확인하기 위해 odontoblast specific gene을 검출하기 위한 DNA 또는 RNA 절편을 처리한다. 22개의 연구 중, 1개의 연구에서 DSPP 검출을 위해 시행되었다.

3.2 In vivo

총 22개의 연구 중 13개의 연구가 in vivo 환경에서 DPSC를 상아모세포로 분화 유도하였다. 종 별로 살펴보면 human DPSC를 사용한 연구가 6개, rat (mouse 포함)DPSC를 사용한 연구가 5개, rabbit DPSC를 사용한 연구가 1개, porcine DPSC를 사용한 연구가 1개였다.

In vivo 환경에서 DPSC를 상아모세포로 분화 유도 하기 위해 이식한 숙주 (host)에 대해 분석해본다. 그리고 이식 시 포함되는 DPSC의 수, 사용된 scaffold, 분화 유도 기간, 그리고 각 연구들에서 상아모세포로 분화되었음을 입증한 실험들의 종류를 살펴보고 각 실험들의 의미, 실험이 진행된 시점조건에 대해 비교 분석해본다. 이를 통해 In vivo 환경에서 DPSC를 상아모세포로 분화시키기 위한 일반적인 기준을 확립해본다.

3.2.1 숙주 (host)

일반적으로 숙주로 사용되는 동물은 면역계가 손상된 쥐이다. 13개의 in vivo 연구 중에 11개의 연구에서 숙주로 사용되었다. 이 쥐들은 면역체계가 손상되었기 때문에 다른 종 유래의 세포가 이식되어도 면역 거부반응을 일으키지 않는다. DPSC가 면역 손상된 쥐에 주로 이식되는 부위는 등쪽 피하 조직이다. 등쪽에 이식하는 이유는 숙주인 쥐가 스스로 발을 이용하여 이식된 세포-scaffold 복합체에 자극을 줄 수 없는 위치이기 때문이다.

Renal capsule에 이식하는 경우도 있다. Renal capsule은 모세혈관이 매우 발달된 기관 중 하나이기 때문에 분화에 필요한 영양분이나 대사노폐물이 빠르게 교환될 수 있고 capsule로 둘러싸인 구조가 주위 환경으로부터 격리된 공간을 형성하므로 이식세포의 기관 신생형성 (organogenesis)을 유도하는데 적합한 구조다. 따라서 주로 기관 신생형성을 유도할 때 이식되는 부위이다.

한 동물당 이식편이 삽입될 pocket은 1개, 2개 혹은 4개로 조사되었다. 여러 개를 이식할 때는 척추를 중심으로 서로 반대편에 위치하도록 이식하며 pocket당 간격은 적어도 2cm 정도는 유지한다. 이식 후 일정 기간까지 분화를 유도한 다음 이식편을 회수하는데 한 숙주에 여러 개의 이식편이 이식된 경우 이식편을 회수할 때 숙주의 조직 내 반응이 유발되어 남아있는 이식편에 영향을 끼칠 수 있기 때문에 가능한 적은 수의

이식편을 이식하는 것이 변인을 통제하는 방법이라 할 수 있다.

3.2.2 이식된 DPSC의 수 (transplanted DPSC number)

13개의 연구 결과를 보면 일반적으로 한 이식편 단위로서 scaffold에 결합되어 이식되는 세포의 수는 약 1×10^6~5×10^6개 사이로 나타났다.

3.2.3 Scaffold

DPSC가 이식될 때 다양한 scaffold에 결합되어 이식된다. 빈번하게 사용되는 scaffold로 hydroxyapatite-tricalcium phosphate (HA-TCA), alginate, gelatin, poly (lactic-co-glycolic) acid polymer, collagen, calcium phosphate, titanium fiber mesh가 있다.

높은 수준의 생체 적합성과 경조직 형성을 지지할 수 있다는 측면 때문에 HA-TCA는 자주 사용되는 scaffold 중 하나이다. 또한 hydroxyapatite, tricalcium phosphate는 β-GP와 더불어 경조직 형성을 유도할 수 있다고 알려져 있기 때문에 DPSC의

상아모세포로의 분화를 지지하는 scaffold로 적당한 물질이라 할 수 있다.[22]

Titanium fiber mesh 또한 높은 생체 적합성을 가지고 있어 scaffold로 자주 활용되고 있다. 비록 생체 내에서 분해되지 않는 특성이 있지만 경조직 형성을 유도하는 scaffold로 사용될 때는 크게 문제가 되지 않으며, DPSC가 부착, 성장, 분화하기 용이한 3차원적 구조를 가지고 있다는 점이 장점으로 작용한다. [22]

Gelatin, collagen, poly (lactic-co-glycolic) acid polymer 또한 생체적합성이 높고 생체 내에서 스스로 분해되는 성질을 가졌기 때문에 자주 사용되는 scaffold이다. [24, 35]

위의 다양한 scaffold를 이용하여 DPSC를 상아모세포로 분화 유도할 수 있다. scaffold끼리의 효율을 비교하려면 나머지 조건들을 통제한 상황에서 scaffold만 변인으로 하여 실험을 진행할 필요가 있다.

세포와 결합되어 이식되는 scaffold의 양에 대한 기준은 정해져 있지 않다. 13개의 in vivo 환경에서 이식을 통한 분화 연구에서 scaffold의 사용 용량을 귀납적으로 분석해보면, 일반적으로 HA-TCP는 한 이식편 당 40 mg 정도에 세포를 결합시켜 이식한다. Alginate는 한 이식편 당 1.5% alginate 0.3 mL가 사용되었고 poly (lactic-co-glycolic) acid polymer는 0.9 g이

사용되었다. Collagen은 한 이식편 당 1 x 2 mm^2의 크기로 사용되었다.

경조직 형성을 유도할 때 사용되는 Scaffold의 pore size는 100-350um 사이가 이상적이라는 연구가 있다.[92, 93] 또한 El-Backly팀의 연구에 따르면 poly (lactic-co-glycolic) acid polymer의 pore size가 150-180 um, 180-300 um인 두 그룹에서 osteodentin 형성에 차이가 없음을 입증하였다.[35]

3.2.4 분화 유도 기간

13개의 in vivo 연구를 분석해보면 이식편을 숙주에 이식한 후 분화를 유도한 기간은 짧게는 2주, 길게는 16주 정도였고 일반적으로는 이식 후 4-8주 정도 뒤에 이식편을 다시 수거하여 분화 여부를 분석하였다. Human DPSC를 이식한 경우 많은 경우 이식 6-8주 후부터 이식편을 수거하여 조직 절편 검사를 시행하였을 때 상아질과 유사한 조직이 생성됨이 관찰되었고 scaffold 종류에 따른 분화 유도 기간의 차이는 크지 않았다. 따라서 human DPSC의 상아모세포로의 분화를 유도할 때 적어도 6-8주 정도는 이식 상태로 유지하는 것이 분화를 충분히 유도할 수 있을 것으로 보인다. Yu팀의 연구 결과를 보면 Rat DPSC를

cell pellet을 gelatin과 결합시켜 이식한 후 3일째 수거하여 조직 절편 검사를 시행하였을 때는 상아질과 같은 상아모세포 생성물이 관찰되지 않았으나 2주째 수거하여 검사하였을 때, 상아질-치수 복합체 (dentin-pulp complex)가 관찰되었다.[93] HA-TCP나 PCL/gelatin/nano HA를 scaffold로 사용한 경우에는 이식 4주 이후에 경조직 생성이 관찰되었다.[35] 따라서 monolayer 상태가 아닌 Cell pellet 상태로 이식할 때는 적어도 2주 정도, HA-TCP나 PCL/gelatin/nano HA를 scaffold로 사용하여 이식할 때에는 더 긴 시간 동안 이식상태를 유지하는 것이 상아모세포로 분화 유도하는데 적절하다고 보인다.

3.2.5 분화를 증명할 주요 실험 - 조직 절편 검사

In vivo에서 DPSC가 상아모세포로 분화 유도되었음을 검증하기 위해서 주로 시행되는 시험은 조직 절편 검사이다. 이식 후 분화 유도 기간을 거쳐 수거한 이식편을 절편으로 만들어 염색한 후 현미경을 이용하여 분석한다. In vivo 상태에서 DPSC가 상아모세포로 분화되었을 때 나타나는 특징적인 구조는 상아질-치수 복합체이다. 조직 절편 검사를 시행하면 상아모세포에 의해 형성된 상아질을 관찰할 수 있고 상아질-치수

복합체를 이루는 특징적인 세포 배열과 상아모세포에서 나타나는 cellular process를 관찰할 수 있기 때문에 DPSC가 상아모세포로 분화되었는지의 여부를 정확히 알 수 있다.

총 22개의 연구 중 in vivo 환경에서 진행된 13개의 연구 모두에서 조직 절편 검사로 DPSC의 분화여부를 입증하는 실험이 진행되었다. 조직을 염색하기 위해 가장 많이 사용된 염색법은 hematoxylin-eosin staining이었다.

3.2.6 분화를 증명할 그 밖의 실험들

In vitro 실험 시와 마찬가지로 분화 유도 후 수거한 이식편 조직에서 odontoblast specific marker의 발현 여부를 확인하기 위한 RT-PCR, real time PCR, microarray를 통해 분화를 증명한 연구가 있었다. 또한 immunohistochemistry, calcium nodule detection, in situ hybridization을 통해 DPSC의 분화 여부를 입증하려는 연구가 시행되었다.

제 3 장 결론

본 고찰을 통해 DPSC의 특성, DPSC의 분리, 확인법, DPSC를 이용한 상아모세포로의 분화 유도 조건과 분화를 증명할 실험법들에 대하여 알아보았다. 치수로부터 DPSC를 분리하는 방법으로 collagenase와 같은 효소를 이용한 효소 이용 분리법이 주로 사용되었다. In vitro 환경에서 이용된 DPSC의 세대 수는 주로 1~4세대가 많았으나 특정 scaffold 사용이나 유전자 transfection을 이용한 분화 유도 실험과 같은 특정 환경의 경우 10세대 이상의 높은 세대수의 DPSC를 이용하는 것이 일반적인 경향이다. 분화 유도 배지에 필수적으로 포함되어야 하는 구성요소로 a-MEM 또는 DMEM, β-glycerolphosphate, ascorbic acid, 항생제, 혈청이 있으며, Dexamethasone, BMP-2은 현재까지는 분화 유도 배지의 필수 요소라는데 논란이 있는 상황이다. 상아모세포로 분화되었음을 증명하기 위한 실험법들 중 ALP activity test, calcium nodule detection test, odontoblast specific gene 전사유무 test가 중요하다. ALP activity test의 경우 일반 culture dish에서 DPSC를 분화 유도한 경우 적어도 분화 유도 후 2주 시점 까지는 시행하여야 상아모세포로 분화되었음을 밝힐 수 있는 실험적 근거를 마련할 수 있다. 3D scaffold를 사용하여 배양한 경우는 ALP activity 증가 시점이

일반 culture dish보다 늦기 때문에 이를 감안하여 분화 유도 후 4주 이후까진 진행해야 상아모세포로 분화되었음을 확실하게 증명할 수 있다. Calcium nodule을 확인하는 실험법에는 Alizarin red staining, Von Kossa staining, *o*-cresolphthalein complexone method가 주로 이용되며 Alizarin red staining은 적어도 분화 유도 후 2-3주 이후, Von Kossa staining은 적어도 분화 유도 후 2주 이후, *o*-cresolphthalein complexone method는 적어도 분화 유도 후 8일에서 24일 사이에 시행하여야 유의미한 결과를 얻을 수 있다. odontoblast specific gene은 유전자에 따라 전사 시기에 차이가 있다. 일반적인 경향을 볼 때 Col I과 ALP는 비교적 이른 시기인 분화 유도 후 1주 째부터 전사량이 크게 증가하여 3주쯤까지 증가하나 Dspp, Ocn, Dmp-1는 분화 유도 후 2, 3주쯤에 전사량이 증가하기 시작하므로 검사하고자 하는 유전자에 따라 이러한 경향성에 맞추어 mRNA 전사 검사를 하여야 한다.

In vivo 환경에서 DPSC 를 이식하는데 사용되는 숙주는 면역 억제된 쥐가 대부분이었고 이식되는 DPSC 의 수는 약 1×10^6~5×10^6 개 사이로 경향성이 나타났다. DPSC 를 지지하는 scaffold 는 다양한 물질들이 사용되었는데 각각의 특징이 존재한다. 이식 후 분화 유도 기간은 주로 6~8 주 정도가

필요하고 상아모세포로 분화되었음을 증명하기 위한 실험법으로 조직 절편 검사가 중요하다.

참 고 문 헌

1. Lakshmipathy, U. and C. Verfaillie, *Stem cell plasticity.* Blood reviews, 2005. **19**(1): p. 29-38.
2. Kuhn, N.Z. and R.S. Tuan, *Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis.* Journal of cellular physiology, 2009. **222**(2): p. 268-277.
3. Hemmat, S., D.M. Lieberman, and S.P. Most, *An introduction to stem cell biology.* Facial Plastic Surgery, 2010. **26**(5): p. 343.
4. Morsczeck, C., et al., *[The state of the art in human dental stem cell research].* Mund-, Kiefer-und Gesichtschirurgie: MKG, 2007. **11**(5): p. 259.
5. Meirelles, L.S. and N.B. Nardi, *Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells.* Frontiers in bioscience: a journal and virtual library, 2009. **14**: p. 4281.
6. Misna, L., *Stem Cell Based Treatments and Novel Considerations for Conscience Clause Legislation.* Ind. Health L. Rev., 2011. **8**: p. 471.
7. Barry, F.P. and J.M. Murphy, *Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization.* The international journal of biochemistry & cell biology, 2004. **36**(4): p. 568-584.
8. Zipori, D., *Mesenchymal stem cells: harnessing cell plasticity to tissue and organ repair.* Blood cells, molecules & diseases, 2004. **33**(3): p. 211-215.
9. Kuznetsov, S.A., et al., *Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo.* Journal of bone and mineral research, 1997. **12**(9): p. 1335-1347.
10. Lanza, R., et al., *Handbook of Stem Cells, Two-Volume Set with CD-ROM: Volume 1-Embryonic Stem Cells; Volume 2-Adult & Fetal Stem Cells*. 2004: Academic Press.
11. Gronthos, S., et al., *Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13625-30.

12. Miura, M., et al., *SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(10): p. 5807-5812.
13. Sonoyama, W., et al., *Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study.* Journal of endodontics, 2008. **34**(2): p. 166-171.
14. Sonoyama, W., et al., *Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine.* PLoS One, 2006. **1**(1): p. e79.
15. Ulmer, F.L., et al., *Stem cells--prospects in dentistry.* Schweizer Monatsschrift fur Zahnmedizin= Revue mensuelle suisse d'odonto-stomatologie= Rivista mensile svizzera di odontologia e stomatologia/SSO, 2010. **120**(10): p. 860.
16. Kitamura, C., et al., *Temporal and spatial expression of c-jun and jun-B proto-oncogenes in pulp cells involved with reparative dentinogenesis after cavity preparation of rat molars.* Journal of dental research, 1999. **78**(2): p. 673-680.
17. Smith, A., et al., *Reactionary dentinogenesis.* The International journal of developmental biology, 1995. **39**(1): p. 273.
18. Huang, A.H.C., et al., *Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth.* Journal of oral pathology & medicine, 2008. **37**(9): p. 571-574.
19. Huang, A.H.C., et al., *Isolation and characterization of human dental pulp stem/stromal cells from nonextracted crown-fractured teeth requiring root canal therapy.* Journal of Endodontics, 2009. **35**(5): p. 673-681.
20. Alongi, D.J., et al., *Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential.* Regenerative medicine, 2010. **5**(4): p. 617-631.
21. Wang, Z., et al., *Putative stem cells in human dental pulp with irreversible pulpitis: an exploratory study.* Journal of endodontics, 2010. **36**(5): p. 820-825.
22. Zhang, W., et al., *Differentiation ability of rat postnatal dental pulp cells in vitro.* Tissue engineering, 2005. **11**(3-4): p. 357-368.
23. Yu, J., et al., *Differentiation of dental pulp stem cells into regular-shaped dentin-pulp complex induced by tooth germ*

cell conditioned medium. Tissue engineering, 2006. **12**(11): p. 3097-3105.
24. Yu, J., et al., *Odontogenic capability: bone marrow stromal stem cells versus dental pulp stem cells.* Biology of the Cell, 2007. **99**(8): p. 465-474.
25. Yang, X., et al., *The odontogenic potential of STRO-1 sorted rat dental pulp stem cells in vitro.* Journal of tissue engineering and regenerative medicine, 2007. **1**(1): p. 66-73.
26. Yang, X., et al., *STRO-1 selected rat dental pulp stem cells transfected with adenoviral-mediated human bone morphogenetic protein 2 gene show enhanced odontogenic differentiation.* Tissue engineering, 2007. **13**(11): p. 2803-2812.
27. Prescott, R.S., et al., *< i> In Vivo</i> Generation of Dental Pulp-like Tissue by Using Dental Pulp Stem Cells, a Collagen Scaffold, and Dentin Matrix Protein 1 after Subcutaneous Transplantation in Mice.* Journal of endodontics, 2008. **34**(4): p. 421-426.
28. Yang, X., et al., *Non-viral bone morphogenetic protein 2 transfection of rat dental pulp stem cells using calcium phosphate nanoparticles as carriers.* Tissue Engineering Part A, 2008. **14**(1): p. 71-81.
29. Yang, X., et al., *Mineralized tissue formation by BMP2-transfected pulp stem cells.* Journal of dental research, 2009. **88**(11): p. 1020-1025.
30. Yang, X., et al., *The performance of dental pulp stem cells on nanofibrous PCL/gelatin/nHA scaffolds.* Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2010. **93**(1): p. 247-257.
31. Iohara, K., et al., *Side Population Cells Isolated from Porcine Dental Pulp Tissue with Self-Renewal and Multipotency for Dentinogenesis, Chondrogenesis, Adipogenesis, and Neurogenesis.* Stem cells, 2006. **24**(11): p. 2493-2503.
32. Iohara, K., et al., *Regeneration of dental pulp after pulpotomy by transplantation of CD31-/CD146-side population cells from a canine tooth.* Regenerative Medicine, 2009. **4**(3): p. 377-385.
33. Iohara, K., et al., *Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic*

protein 2. Journal of dental research, 2004. **83**(8): p. 590-595.
34. Mrozik, K.M., et al., *Proteomic characterization of mesenchymal stem cell-like populations derived from ovine periodontal ligament, dental pulp, and bone marrow: analysis of differentially expressed proteins.* Stem cells and development, 2010. **19**(10): p. 1485-1499.
35. El-Backly, R.M., et al., *Regeneration of dentine/pulp-like tissue using a dental pulp stem cell/poly (lactic-co-glycolic) acid scaffold construct in New Zealand white rabbits.* Australian Endodontic Journal, 2008. **34**(2): p. 52-67.
36. Cheng, P.H., et al., *Postnatal stem/progenitor cells derived from the dental pulp of adult chimpanzee.* BMC cell biology, 2008. **9**(1): p. 20.
37. Couble, M.L., et al., *Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures.* Calcified tissue international, 2000. **66**(2): p. 129-138.
38. Lehner, B., et al., *The dark side of BrdU in neural stem cell biology: detrimental effects on cell cycle, differentiation and survival.* Cell and tissue research, 2011. **345**(3): p. 313-328.
39. Simmons, P.J. and B. Torok-Storb, *Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1.* Blood, 1991. **78**(1): p. 55-62.
40. Dennis, J.E., et al., *The STRO-1+ marrow cell population is multipotential.* Cells Tissues Organs, 2002. **170**(2-3): p. 73-82.
41. Shi, S. and S. Gronthos, *Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp.* Journal of Bone and Mineral Research, 2003. **18**(4): p. 696-704.
42. Yang, X., et al., *Hard Tissue Formation of STRO-1–Selected Rat Dental Pulp Stem Cells In Vivo.* Tissue Engineering Part A, 2008. **15**(2): p. 367-375.
43. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.* science, 1999. **284**(5411): p. 143-147.
44. Goodfellow, P., et al., *Assignment of the gene encoding the beta-subunit of the human fibronectin receptor (β-FNR) to*

chromosome 10p11. 2. Annals of human genetics, 1989. **53**(1): p. 15-22.
45. Aruffo, A., et al., *CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate.* Cell, 1990. **61**(7): p. 1303-1313.
46. Airas, L., et al., *CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73.* The Journal of experimental medicine, 1995. **182**(5): p. 1603-1608.
47. Rege, T.A. and J.S. Hagood, *Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis.* The FASEB journal, 2006. **20**(8): p. 1045-1054.
48. Nakashima, M., K. Iohara, and M. Sugiyama, *Human dental pulp stem cells with highly angiogenic and neurogenic potential for possible use in pulp regeneration.* Cytokine & growth factor reviews, 2009. **20**(5): p. 435-440.
49. Bardin, N., et al., *Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion.* Blood, 2001. **98**(13): p. 3677-3684.
50. Lee, R., et al., *Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins.* Science, 2001. **294**(5548): p. 1945-1948.
51. Waddington, R., et al., *Isolation of distinct progenitor stem cell populations from dental pulp.* Cells Tissues Organs, 2009. **189**(1-4): p. 268-274.
52. Mikami, Y., et al., *CD271/p75NTR inhibits the differentiation of mesenchymal stem cells into osteogenic, adipogenic, chondrogenic, and myogenic lineages.* Stem Cells and Development, 2010. **20**(5): p. 901-913.
53. Jo, Y.Y., et al., *Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues.* Tissue engineering, 2007. **13**(4): p. 767-773.
54. Marchionni, C., et al., *Angiogenic potential of human dental pulp stromal (stem) cells.* International journal of immunopathology and pharmacology, 2009. **22**(3): p. 699.
55. Karaöz, E., et al., *Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth.* Histochemistry and cell biology, 2010. **133**(1): p. 95-112.
56. Hirata, T.M., et al., *Expression of multiple stem cell markers in dental pulp cells cultured in serum-free media.* Journal of endodontics, 2010. **36**(7): p. 1139-1144.

57. Agha-Hosseini, F., et al., *In vitro isolation of stem cells derived from human dental pulp.* Clinical Transplantation, 2010. **24**(2): p. E23-E28.
58. Huang, G.T.J., S. Gronthos, and S. Shi, *Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine.* Journal of dental research, 2009. **88**(9): p. 792-806.
59. Agata, H., et al., *Effect of ischemic culture conditions on the survival and differentiation of porcine dental pulp-derived cells.* Differentiation, 2008. **76**(9): p. 981-993.
60. Balic, A., et al., *Characterization of stem and progenitor cells in the dental pulp of erupted and unerupted murine molars.* Bone, 2010. **46**(6): p. 1639-1651.
61. Suchanek, J., et al., *Dental pulp stem cells and their characterization.* Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2009. **153**(1): p. 31-36.
62. Burn, T.C., A.B. Satterthwaite, and D.G. Tenen, *The human CD34 hematopoietic stem cell antigen promoter and a 3'enhancer direct hematopoietic expression in tissue culture.* Blood, 1992. **80**(12): p. 3051-3059.
63. Laino, G., et al., *In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp.* Journal of Craniofacial Surgery, 2006. **17**(3): p. 511-515.
64. d' Aquino, R., et al., *Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes.* Eur Cell Mater, 2009. **18**: p. 75-83.
65. Tirino, V., et al., *Methods for the identification, characterization and banking of human DPSCs: current strategies and perspectives.* Stem Cell Reviews and Reports, 2011. **7**(3): p. 608-615.
66. Laino, G., et al., *A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB).* Journal of bone and mineral research, 2005. **20**(8): p. 1394-1402.
67. Edling, C.E. and B. Hallberg, *c-Kit—a hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase.* The international journal of biochemistry & cell biology, 2007. **39**(11): p. 1995-1998.
68. Laino, G., et al., *An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering.* Journal of cellular physiology, 2005. **206**(3): p. 693-701.

69. Gagari, E., et al., *Expression of stem cell factor and its receptor, c-kit, in human oral mesenchymal cells.* European journal of oral sciences, 2006. **114**(5): p. 409-415.
70. Huang, A.H.C., et al., *Putative Dental Pulp-Derived Stem/Stromal Cells Promote Proliferation and Differentiation of Endogenous Neural Cells in the Hippocampus of Mice.* Stem Cells, 2008. **26**(10): p. 2654-2663.
71. Kerkis, I., 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, 2006. **184**(3-4): p. 105-116.
72. Goodell, M.A., et al., *Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo.* The Journal of experimental medicine, 1996. **183**(4): p. 1797-1806.
73. Adamski, D., et al., *Effects of Hoechst 33342 on C2C12 and PC12 cell differentiation.* FEBS letters, 2007. **581**(16): p. 3076-3080.
74. Zhong, Y., et al., *Most MCF7 and SK-OV3 cells were deprived of their stem nature by Hoechst 33342.* Biochemical and biophysical research communications, 2007. **364**(2): p. 338-343.
75. KUMABE, S., et al., *Human dental pulp cell culture and cell transplantation with an alginate scaffold.* Okajimas folia anatomica Japonica, 2006. **82**(4): p. 147-156.
76. Harry, I., *Nutrition Needs of Mammali Cells in Tissue Cultu.* 1955.
77. Rutzky, L.P. and R.W. Pumper, *Supplement to a survey of commercially available tissue culture media (1970).* In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 1974. **9**(6): p. 468-469.
78. Barnes, D. and G. Sato, *Methods for growth of cultured cells in serum-free medium.* Analytical biochemistry, 1980. **102**(2): p. 255.
79. Lopez-Cazaux, S., et al., *Culture medium modulates the behaviour of human dental pulp-derived cells: technical note.* Eur Cell Mater, 2006. **11**: p. 35-42.
80. Peterkofsky, B., *Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of*

collagen synthesis in scurvy. The American journal of clinical nutrition, 1991. **54**(6): p. 1135S-1140S.
81. Khanna-Jain, R., et al., *Growth and Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells Maintained in Fetal Bovine Serum, Human Serum and Serum-free/Xeno-free Culture Media.* J Stem Cell Res Ther, 2012. **2**(126): p. 2.
82. Alliot-Licht, B., et al., *Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures.* Cell and tissue research, 2005. **321**(3): p. 391-400.
83. Nakashima, M., et al., *Regulatory role of transforming growth factor-beta, bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells.* Dev Biol, 1994. **162**(1): p. 18-28.
84. Okamoto, Y., et al., *Simvastatin induces the odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells in vitro and in vivo.* Journal of endodontics, 2009. **35**(3): p. 367-372.
85. Ahmed, N.E.M.B., et al., *Isolation of Dental Pulp Stem Cells and their In Vitro Differentiation into Odontoblast-like Cells.* Macedonian Journal of Medical Sciences, 2011. **4**(3): p. 253-260.
86. Huang, G.T.J., K. Shagramanova, and S.W. Chan, *Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro.* Journal of endodontics, 2006. **32**(11): p. 1066-1073.
87. Kim, E.E. and H.W. Wyckoff, *Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. Two-metal ion catalysis.* Journal of molecular biology, 1991. **218**(2): p. 449.
88. Puchtler, H., S.N. Meloan, and M.S. TERRY, *On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium.* Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1969. **17**(2): p. 110-124.
89. Meloan, S.N. and H. Puchtler, *Chemical Mechanisms of Staining Methods: Von Kossa's Technique: What von Kossa Really Wrote and a Modified Reaction for Selective Demonstration of Inorganic Phosphates.* Journal of Histotechnology, 1985. **8**(1): p. 11-13.

90. Nam, S., et al., *Odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells stimulated by the calcium phosphate porous granules.* Journal of tissue engineering, 2011. **2**(1).
91. Takeda, T., et al., *Characterization of dental pulp stem cells of human tooth germs.* Journal of dental research, 2008. **87**(7): p. 676-681.
92. Whang, K., et al., *Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture.* Tissue engineering, 1999. **5**(1): p. 35-51.
93. Yang, S., et al., *The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors.* Tissue engineering, 2001. **7**(6): p. 679-689.

부 록

Table 1. DPSC 를 상아모세포로 분화 유도한 실험들

– 실험 조건, 분화 증명 실험법

실험	(1994) Nakashima, M., et al.	(2000) Couble, M.L., et al.	(2000) Gronthos, S., et al.	(2003) Batouli, S., et al.	(2004) Iohara, K., et al.
specise	bovine	human	human	human	porcine
실험 종류	in vitro	in vitro	in vitro, in vivo	in vivo	in vitro, in vivo
세포 분리 방법	collagenase–seperation method	explant	collagenase–seperation method	collagenase–seperation method	collagenase–seperation method
cell passage	1, 2, 3	1	1, 2(in vitro), 3(in vivo)	1	1
colony forming unit	–	–	22–70 colonies/10^4 cells plated	–	–
media 조성	DMEM, 10% FCS, 50ug/ml ascorbic acid	① Eagle's basal medium, 50ug/ml ascorbic acid, 100IU/ml penicillin–50ug/ml streptomycin, 10% FCS with	α–MEM, 20% FCS, 100uM ascorbic acid, 2mM L–glutamine, 100U/ml penicillin–100ug/ml streptomycin,	α–MEM, 15% FCS, 100uM ascorbic acid, 2mM L–glutamine, 100U/ml penicillin–100ug/ml streptomycin,	DMEM, 10% bovine calf serum(BCS), 50ug/ml ascorbic acid, penicillin–streptomycin,

		or without 10mM β-GP ② Eagle's basal medium, 50ug/ml ascorbic acid, 100U/ml penicillin-50ug/ml streptomycin, 15% FCS with or without 10mM β-GP	glucocorticoid, dexamethasone, inorganic phosphate	glucocorticoid, dexamethasone, inorganic phosphate	recombinant human BMP-2(10, 25, 50, 100, 200ng/mL)
in vitro					
media 교체 간격	1 일	no description	no description	-	2 번/주
분화유도 후 배양 기간	5 주	4-8 주	5-6 주	-	4 주
scaffold	-	-	-	-	-
mRNA 발현	northern blot (a1(III) Col, a1(I) Col, fibronectin, ALP, OCN,BMP-2,4,TGF-b1)-1 주 간격으로 4 주까	-	-	-	real time PCR (a1(I)collagen, DMP-1, DSPP, Osterix, enamelysin/MMP20, Phex, Cbfa1, Cbfa3)-1 주 간격으로 3 주까지 조사

	지 조사				
western blot	–	–	–	–	–
ALP activity	o–1 주 간격으로 4 주까지 조사	–	o– secondary culture	–	o–1 주 간격으로 3 주까지 조사
tissue morphology analysis	–	o (transmission electron microscopy)– 5–6 주 째	–	–	o (H&E staining)
immunohistochemistry	–	o (type I collagen) – 3–5 주째	o (CD14, CD34, CD44, CD45, integrin β1, VCAM–1, MyoD, a–SM actin, neurofilam, MUC–18, collagen–1,2,3, osteocalcin, ostnectin, BSP, alk phos, PPARr, FGF–2)– primary culture 의 2×10^4 cell/well	–	o (type I, III collagen) – 3 주째
calcium nodule 생성	calcium 농도 측정 (calcium–C test)–	o (von Kossa staining, X–ray analysis) –	o (Alizarin Red staining)– 5–6 주	–	o (Alizarin Red staining)

	5 주	4 주(15% FCS), 6 주(10% FCS)			
in situ hybridization	–	o (DSPP)	–	–	–
분화결과	hard tissue generating cell	odontoblast	odontoblast	–	odontoblast
in vivo					
host	–	–	immunocompromised mice 의 dorsal surface	immunocompromised mice 의 dorsal surface	dog 의 canine pulp cavity
scaffold/carrier	–	–	40mg HA/TCP	40 mg, HA/TCP, acid-etched dentin tissue	DPSC pellet
transplanted cell number	–	–	5.0×10^6	4.0×10^6, 2.0×10^6	no description
period	–	–	6 주	2,4,8,16 주	3 주
조적절편검사	–	–	o	o	o
mRNA 발현	–	–	RT-PCR (DSPP, BSP, OCN)-transplantation 6 주 후	–	–
immunohistochemistry	–	–	–	o (βFGF, MMP-9, DSP)	–
calcium nodule 생성	–	–	–	–	–
in situ hybridization	–	–	o (DSPP, alu)	o (alu)	–

분화결과	–	–	dentinogenic cell	dentinogenic cell	osteodentin structure

실험	(2005) Zhang, W., et al.	(2006) Huang, G.T.J., K. Shagramanova, and S.W. Chan	(2006) Yu, J., et al.	(2006) KUMABE, S., et al.	(2007) Yu, J., et al.
specise	rat	human	rat	human	rat
실험 종류	in vitro	in vitro	in vitro, in vivo	in vitro, in vivo	in vitro, in vivo
세포 분리 방법	pulp mince & trypsin–EDTA 처리	collagenase–seperation method	collagenase–seperation method	collagenase–seperation method	collagenase–seperation method
cell passage	4	3	2	13	2
colony forming unit	–	–	–	–	–
media 조성	α–MEM, 10% FCS, 10mM β–GP, 10^{-8}M dexamethasone, 50ug/mL ascorbic acid, 50 ug/mL gentamycin	α–MEM, 20% FBS, 2mM L–glutamine, 100uM ascorbic acid, 100U/mL penicillin–G, 100ug/mL streptomy	DMEM,10% FBS, 0.292 mg/mL Glutamine, 100 units/mL penicillin G, 100 mg/mL streptomycin, 2.5 mg/mL ascorbic acid	DMEM, 20% FBS, 100U/mL penicillin, 100ug/mL streptomycin, β–GP	DMEM/F12, 10% FBS, 0.292mg/mL glutamine, 100U/mL penicillin G, 100ug/mL streptomycin, 2.5ug/mL ascorbic acid, 25mg/L bovine pituitary extract

		cin, 0.25ug/mL fungizone, 2mM KH_2PO, 20mM HEPES,100nM dexamethasone, 5×10^{-8} M dihydroxy vitamin D3			
in vitro					
media 교체 간격	2-3 일	no description	1 일	no description	no description
분화유도 후 배양 기간	1,2,4,6, 8 주	5-8 주	1-2 주	3-4 주	1-2 주
scaffold	-	-	-	-	-
mRNA 발현	RT-PCR (DSPP, OCN, Col I)-1,2,4,6, 8 주마다	-	RT-PCR (DSPP, DMP-1)-7 일 째	RT-PCR (DSPP)	RT-PCR (DSPP, AMBN)-7 일째
western blot	-	-	o (DSP, DMP-1)-7 일 후	-	-
ALP activity	o-1,3,5,10,14,21	-	o-1,3,5,7,10,14 일째마다	o-3,7,14,21 일째마다	o-3,7,14 일째마다

	,28 일째마다				
tissue morphology analysis	o (phase contrast microscopy, SEM)	o (SEM)	–	–	–
immunohistochemistry	o (STRO-1)	–	o (STRO-1, DSP, ON, Col I, BSP, OPN, DMP-1) - 7 일 후	o (type I, III collagen, DSP)	o (STRO-1, CD14, vimentin, EMA, a-SMA, nestin, DMP-1, DSPP, Col I, Col II, Col III, OPN, OCN, BSP, ALP, βFGF, Factor VIII,S-100, GFAP, CK, CD45, P75, HNK-1, AMBN) - 6 일 후
calcium nodule 생성	o (o-cresolphthalein complexone method)	o (Alizarin Red staining) - 5~8 주 째	o (von Kossa staining) - 14 일째 (5×10^3 cells/mL on 60mm dishes)	o (Alizarin Red staining) - 3,7,14,21 일째마다	o (von Kossa staining) - 14 일째
in situ hybridization	–	–	–	–	–

분화결과	odontoblast	odontoblast	odontoblast	odontoblast	odontogenic differentiation
in vivo					
host	–	–	rat 의 renal capsule	nude mice 의 dorsolumbar area	rat 의 renal capsule
scaffold/carrier	–	–	cell pellet	alginate(1.5%, 0.3mL)	cell pellet in absorbable gelatin sponge
transplanted cell number	–	–	1.0×10^{6}	1.5×10^{7}	1.0×10^{5}
period	–	–	3 일,14 일	6-8 주	2 주
조직절편검사	–	–	o	o	o
mRNA 발현	–	–	–	–	–
immunohistochemistry	–	–	–	–	–
calcium nodule 생성	–	–	–	–	–
in situ hybridization	–	–	–	–	–
분화결과	–	–	dentin/pulp structure	dentin/pulp structure	tooth-shaped tissue

실험	(2007) Yang, X., et al.	(2007) Yang, X., et al.	(2008) El-Backly, R.M., et al.	(2008) Prescott, R.S., et al.	(2008) Takeda, T., et al.
specise	rat	rat	rabbit	mouse	human
실험 종류	in vitro	in vitro	in vitro, in vivo	in vivo	in vitro, in vivo
세포 분리 방법	collagenase-seperation	collagenase-seperation method	collagenase-seperation method	collagenase-seperation method	collagenase-seperation method

	method				
cell passage	10	3	2-3	5	1
colony forming unit	-	-	47-53 colonies/10^4 cells	-	48±30 and 40±35 colonies/10^4
media 조성	α-MEM, 10% FCS, 50 mg/mL gentamycin	α-MEM, 10% FCS, 10mM β-GP, 10^-8 dexamethasone, 50ug/mL ascorbic acid, 50ug/mL gentamycin	DMEM or α-MEM, 20% FBS, 1% L-glutamine, 1% penicillin-streptomycin, 2% HEPES, 50ug/mL ascorbic acid	DMEM/F-12, 10% FBS, 100U/mL penicillin/streptomycin, 2.5UmL amphotericin B	MSCGM medium, 0.1uM dexamethasone, 50ug/mL ascorbic acid, 0.1% β-GP
in vitro					
media 교체 간격	3 일	2-3 일	no description	-	no description
분화유도 후 배양 기간	24 일	24 일	67 일	-	2 주
scaffold	-	-	-	-	-
mRNA 발현	real time PCR (ALP, Col I, OC, BSP, DSPP, DMP-1)1,4,8, 16 일째마다, oligo-microarray-0 일,	real time PCR (ALP, Col I, OC, DSPP, DMP-1)-1, 8, 16 일째	-	-	-

	8 일째				
western blot	–	–	–	–	–
ALP activity	o–4,8,12,16,24 일째마다	o–1,2,4,8,16,24 일째마다	–	–	o–15 일째
tissue morphology analysis	o (SEM)	o (SEM)	–	–	o
immunohistochemistry	o (STRO–1)	o (STRO–1)	o (CD271)	–	–
calcium nodule 생성	o (o–cresolphthalein complexone method) – 8,12,16,24 일째	o (o–cresolphthalein complexone method) – 8, 12,16,24 일째	o (culture flask 내부에 생성) – 12 일째 나타남	–	o (von Kossa staining) –15 일째
in situ hybridization	–	–	–	–	–
분화결과	odontogenic differentiation	odontoblast	odontogenic differentiation	–	odontogenic differentiation
in vivo					
host	–	–	rabbit 의 dorsal subcutaneous area	immunodeficient mouse 의 dorsal subcutaneous area	immunodeficient mouse 의 dorsal subcutaneous area
scaffold/carrier	–	–	0.9g PLCG polymer(particle size; 150–180um, 180–	1.0×2.0mm^2 collagen	calcium phosphate

			300um)		
transplanted cell number	–	–	0.5–1.0×10^6	5.0×10^6	1.0×10^6
period	–	–	2–6 주	6–8 주	8–15 주
조직절편검사	–	–	o	o	o
mRNA 발현	–	–	–	–	microarray, RT–PCR, real time PCR (WNT16, TPD52, ITPR1, TLR4)
immunohistochemistry	–	–	–	–	–
calcium nodule 생성	–	–	o	–	o (von Kossa staining) –15 주째
in situ hybridization	–	–	–	–	–
분화결과	–	–	osteodentin–like structure	dentin/pulp– like structure	dentin/pulp– like structure

실험	(2008) Yang, X., et al.	(2009) Okamoto, Y., et al.	(2009) Yu, V., et al.	(2009) Yang, X., et al.	(2010) Yang, X., et al.
specise	rat	human	human	rat	rat
실험 종류	in vitro	in vitro, in vivo	in vitro, in vivo	in vitro, in vivo	in vitro, in vivo
세포 분리 방법	FACS (STRO–1)	collagenase–seperation method	collagenase–seperation method	FACS (STRO–1)	FACS (STRO–1)
cell	10	3–6	1–2	10	3

passage					
colony forming unit	–	–	–	–	–
media 조성	α-MEM, 10% FCS, 10mM β-GP, 10^{-8} dexamethasone, 50ug/mL ascorbic acid, 50ug/mL gentamycin	α-MEM, 15% FBS, 100mM ascorbic acid, 2mM L-glutamine, 100U/mL penicillin, 100mg/mL streptomycin	α-MEM, 2,5% FBS, 100U/mL penicillin, 100mg/mL streptomycin, 100mM ascorbic acid, 2mM L-glutamine, 50mM β-GP	α-MEM, 10% FCS, 50ug/mL gentamycin	α-MEM, 10% FCS, 10mM β-GP, 10^{-8}M dexamethasone, 50ug/mL ascorbic acid, 50ug/mL gentamycin
in vitro					
media 교체 간격	3 일	no description	3 일	no description	2-3 일
분화유도 후 배양 기간	24 일	1 주	2 주	3 주	24 일
scaffold	titanium mesh	dish plate	glass disc	HA/TCP	PCL/gelatin/nano HA
mRNA 발현	real time PCR (ALP, Col I, OCN, DSPP, DMP-1) - 1,4,8,16 일째	RT PCR (DSPP, OC) - 7 일째	real time PCR (DSPP, DMP-1)	–	real time PCR (OCN, BSP, DSPP, DMP-1) - 4,8,16 일째
western blot	–	–	o (DMP-1, DSPP)	–	–

ALP activity	o– 4 일째 (in vitro transfection), 1,4,8,16,24 일째 (3D scaffold culture)	–	–	o– 1,4,8 일째	o– 1,4,8,16,24 일째
tissue morphology analysis	–	–	–	–	–
immunohistochemistry	o (STRO–1)	–	–	–	o (OCN)– 16, 24 일째
calcium nodule 생성	o (o–cresolphthalein complexone method) – 4,8,16,24 일째	–	o (Alizarin Red staining)– 14 일째	o (SEM)	o (SEM)– 1,4,16 일째
in situ hybridization	–	–	–	–	–
분화결과	odontogenic differentiation	odontogenic differentiation	odontogenic differentiation	odontogenic differentiation	odontogenic differentiation
in vivo					
host	–	immunocompromised mice 의 dorsal subcutaneous area	immunocompromised mice 의 dorsal subcutaneous area	immunocompromised mice 의 dorsal subcutaneous area	immunocompromised mice 의 dorsal subcutaneous area
scaffold/carrier	–	40mg HA/TCP	40mg HA/TCP	HA/TCP	PCL/gelatin/nano HA
transplante	–	4.0×10^{6}	2.0×10^{6}	8.3×10^{5}	8.3×10^{5}

d cell number					
period	–	8 주	6 주	12 주	8 주
조직절편검사	–	o	o	o	o
mRNA 발현	–	–	–	real time PCR (DSPP, DMP-1, OCN, BSP)-1,4,12 주째	real time PCR (OCN, BSP, DSPP, DMP-1)-4,8 주째
immunohistochemistry	–	–	–	–	–
calcium nodule 생성	–	–	–	–	–
in situ hybridization	–	–	–	–	–
분화결과	–	mineralized tissue	hard tissue	bone-like structure	mineralized tissue

실험	(2011) Ahmed, N.E.M.B., et al.	(2011) Nam, S., et al.
specise	human	human
실험 종류	in vitro	in vitro,
세포 분리 방법	collagenase-seperation method	collagenase-seperation method, FACS (SSEA4, STRO-1)
cell passage	3	3-4
colony forming	–	–

unit		
media 조성	DMEM, 10% FBS, 50ug/mL ascorbic acid, BMP-2(10ng/mL)를 분화 유도 1 주일 후에 한번만 처리	α-MEM, 10% FBS, 1% antibiotics /antimycotics, 50ug/mL ascorbic acid, 10mM β-GP, 10^{-7}M dexamethasone
in vitro		
media 교체 간격	3 일	2-3 일
분화유도 후 배양 기간	30 일	3 주
scaffold	-	20mg CaP
mRNA 발현	real time RT-PCR (enamelysin, DSPP) - 30 일째	real time PCR (DSPP, DMP-1, Col I, OCN) - 7,14,21 일째
western blot	-	o (DSP) - 21 일째
ALP activity	-	o- 7,14,21 일째
tissue morphology analysis	-	o(SEM)
immunohistochemistry	-	-
calcium nodule 생성	o (Alizarin	o (SEM, Alizarin

	red staining) –30 일째	red staining) – 28 일째
in situ hybridization	–	–
분화결과	odontogenic differentiation	odontogenic differentiation
in vivo		
host	–	–
scaffold/carrier	–	–
transplanted cell number	–	–
period	–	–
조직절편검사	–	–
mRNA 발현	–	–
immunohistochemistry	–	–
calcium nodule 생성	–	–
in situ hybridization	–	–
분화결과	–	–

Table 2. DMEM, α-MEM, DMEM/F12 medium 조성

1) DMEM

	powder(mg/L)
Inorganic salts	
$CaCl_2$ (anhyd.)	200.00
$Fe(NO_3)$ $9H_2O$	0.10
KCl	400.00
$MgSO_4$ (anhyd.)	97.67
NaCl	6400.00
NaH_2PO_4 H_2O	125.00
Other components	
D-Glucose	4500.00
Phenol Red	15.00
Sodium Pyruvate	110.00
Amino Acids	
L-Arginine HCl	84.00
L-Cystine 2HCl	63.00
L-Glutamine	584.00
Glycine	30.00
L-Histidine HCl H_2O	42.00
L-Isoleucine	105.00
L-Leucine	105.00
L-Lysine HCl	146.00
L-Methionine	30.00
L-Phenylalanine	66.00
L-serine	42.00
L-Threonine	95.00
L-Tryptophan	16.00
L-Tyrosine 2Na $2H_2O$	104.33
L-Valine	94.00
Vitamins	

D-Ca pantothenate	4.00
Choline Chloride	4.00
Folic Acid	4.00
i-Inositol	7.20
Niacinamide	4.00
Riboflavin	0.40
Thiamine HCl	4.00

2) α-MEM

	powder(mg/L)
Inorganic salts	
$CaCl_2$ (anhyd.)	200.00
KCl	400.00
$MgSO_4$ (anhyd.)	98.00
NaCl	6800.00
NaH_2PO_4 H_2O	140.00
Other components	
D-Glucose	1000.00
lipoic acid	0.20
Phenol Red	10.00
Sodium Pyruvate	110.00
Amino Acids	
L-Alanine	25.00
L-Arginine HCl	127.00
L-Asparagine H_2O	50.00
L-Aspartic acid	30.00
L-Cystine 2HCl	31.00
L-Cysteine HCl H_2O	100.00
L-Glutamic Acid	75.00
L-Glutamine	292.00
Glycine	50.00
L-Histidine HCl H_2O	42.00
L-Isoleucine	52.00

L-Leucine	52.00
L-Lysine HCl	73.00
L-Methionine	15.00
L-Phenylalanine	32.00
L-Proline	40.00
L-serine	25.00
L-Threonine	48.00
L-Tryptophan	10.00
L-Tyrosine(disodium salt)	52.00
L-Valine	46.00

3) DMEM/F12 medium

	powder(mg/L)
Inorganic salts	
$CaCl_2$ (anhyd.)	116.60
$CuSO_4$ $5H_2O$	0.0013
Fe(NO3) $9H_2O$	0.05
$FeSO_4$ $7H_2O$	0.417
KCl	311.80
$MgCl_2$	28.64
$MgSO_4$	48.84
NaCl	6995.50
NaH_2PO4 H_2O	62.50
Na_2HPO_4	71.02
$ZnSO_4$ $7H_2O$	0.432
Other components	
D-Glucose	3151.00
Na Hypoxanthine	2.39
Linoleic Acid	0.042
Lipoic acid	0.105
Phenol Red	8.10
Sodium Putrescine 2HCl	0.081
Sodium Pyruvate	55.00

Amino Acids	
L-Alanine	4.45
L-Arginine HCl	147.50
L-Asparagine H_2O	7.50
L-Aspartic acid	6.65
L-Cystine 2HCl	17.56
L-Cysteine H_2O	31.29
L-Glutamic Acid	7.35
L-Glutamine	365.00
Glycine	18.75
L-Histidine HCl H_2O	31.48
L-Isoleucine	54.47
L-Leucine	59.05
L-Lysine HCl	91.25
L-Methionine	17.24
L-Phenylalanine	35.48
L-Proline	17.25
L-serine	26.25
L-Threonine	53.45

Abstract

Dental pulp stem cells – characters and differentiation condition into odontoblasts

Lee, Kyung Joong

Department of Dentistry

School of Dentistry

Seoul National University

Dental pulp stem cells (DPSCs) derived from mesenchymal stem cell are nonspecialized cells that continuously divide, have the ability of self-renewal, and are capable of generating complex tissues and organs, as another stem cells. Many studies about dental pulp stem cells which differentiate into a variety of cell types have been carried out. Through researches, dental pulp stem cells can differentiate to

odontoblasts, osteoblasts, endothelocytes, smooth muscle cells, adipocytes, chondrocytes, and neurons.

In this review, we focus on experimental methods about dental pulp stem cells differentiated into odontoblasts. Up to now, there have been numerous studies about dental pulp stem cells which differentiate into odontoblasts in dentistry field. However, there are a slight different of differentiation conditions about dental pulp stem cells which differentiate into odontoblast. Also, there are various experiments to prove that dental pulp stem cells differentiate into odontoblasts. We analyzed 22 articles which investigated differentiation about dental pulp stem cells into odontoblast in order to know the tendency of differentiation conditions and critical experiment to prove differentiation.

Collagenase-seperation method has been commonly used method to isolate dental pulp stem cells from dental pulp. In vitro condition, 1~4 passage of dental pulp stem cells were predominantly used in differentiation experiments. Essential components that must be included in differentiation media are α-MEM(or DMEM), β-glycerolphosphate, ascorbic acid, antibiotics, serum. There are controversies now whether dexamethasone and BMP-2 are

Essential components or not. ALP activity test, calcium nodule detection test and mRNA detection test of odontoblast specific gene are critical experiments to prove differentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. There are tendencies of the timing that experiments were performed in order to confirm induction of differentiation

In vivo condition, most of hosts for transplanting dental pulp stem cells were immunocompromised mice. There were tendencies of the number of dental pulp stem cells transplanted. Scaffolds supporting dental pulp stem cells were used variously and each scaffold have features for supporting cells. After transplantation, induction periods for differentiation were about 6~8 weeks. Histologic evaluation of tissue sections is critical experiment at in vivo condition to prove differentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts.

In summary, we can propose the general condition of differentiation for dental pulp stem cells changes into odontoblasts. Also, we can propose the critical experiments to prove differentiation.

keywords : dental pulp stem cells, odontogenic media, odontoblast differentiation

Student Number : 2009-22698