

Characterization of Differentiation of the Supernumerary Dental Pulp Stem Cells toward the Odontoblast by Application Period of Additives

Jongsoo Kim

Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Dankook University

Abstract

The aim of this study was to investigate the possibility of the supernumerary teeth for the stem cell source in dentistry. The Real Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Real Time qRT-PCR) method was used to evaluate the differentiation toward the odontoblast of the supernumerary dental pulp stem cells (sDPSCs).

Supernumerary dental pulp stem cells were obtained from 3 children (2 males and 1 female, age 7 to 9) diagnosed that the eruption of permanent teeth was disturbed by supernumerary teeth.

The common genes for odontoblasts are alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OC), osteonectin (ON), dentin matrix acidic phosphoprotein 1 (DMP-1), dentin sialophosphoprotein (DSPP). The sDPSCs were treated for 0 days, 8 days and 14 days with additives and then Real Time qRT-PCR was performed in intervals of 0 days, 8 days and 14 days.

The alizarin-red solution staining was performed to visualize the stained color for the degree of calcification at 7 days, 14 days, 21 days and 28 days after treating additives to the sDPSCs.

From the result of the Real Time qRT-PCR, the manifestation exhibit maximum value at 8 days after additive treatment and shifted to a decrease trend at 14 days.

Alizarin-red solution staining exhibit light results at 7 days after staining and generalized dark result at 14 days.

Consequently, in studies with sDPSCs, appropriate treatment time of additives for Real Time qRT-PCR is 8 days. Also, a suitable period of Alizarin-red solution staining is 14 days.

Key words : Odontoblast, Supernumerary Tooth, Additives, Stem Cell

I. 서 론

재생 상아질의 형성은 치수조직 세포의 중요한 기능이다. 치아우식증의 발생으로 손상된 상아질의 재생은 치수보호에 꼭 필요한 기전이며 이를 담당하는 것이 상아모세포이다¹⁾. 상아모세포는 세포의 기질을 포함한 여러 물질을 형성한다^{1,2)}. 줄기세포란 분화되지 않은 단일세포로서 자가재생능력, 성숙된 전구

세포 생산 능력 및 최종 목적세포로의 분화 능력을 가진 세포이다³⁾. 치수조직에 존재하는 세포는 다양한 조직으로 분화할 수 있는 분화능력(multi-lineage differentiation capacity)을 가지는 줄기세포의 성질을 가지며⁴⁾, 이러한 세포가 상아모세포로 분화할 수 있는 능력이 있다는 것은 여러 학자들에 의해 소개되었다⁵⁻⁹⁾.

치아조직 유래 줄기세포는 매복된 사랑니¹⁰⁾, 탈락 시기에 발

Corresponding author : Jongsoo Kim

Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Dankook University, 119 Dandaero, Dongnamgu, Cheonan, 31116, Korea

Tel: +82-41-550-0222 / Fax: +82-41-550-0118 / E-mail:jskim@dku.edu

Received September 2, 2015 / Revised October 1, 2015 / Accepted October 1, 2015

※ The present research was conducted by the research fund of Dankook University in 2015.

치한 유치¹¹⁾, 매복된 과잉치¹²⁾ 등에서 얻을 수 있다. 과잉치의 90%는 상악에 위치하며, 발거 시기는 인접 치아의 치근 형성에 기초로 하여 결정되나¹³⁾, 매복된 과잉치는 인접치아의 맹출 장애와 같은 문제를 유발하므로 비교적 이른 시기에 제거하게 된다¹⁴⁾. 또한 다른 치아조직 공여부에 비해 버려지는 조직을 이용한다는 측면에서 윤리적으로 조금은 자유로울 수 있다.

치수조직 내의 세포가 상아모세포로 분화되었다는 것을 알아보는 방법에는 상아모세포로 분화되어 생성하는 특이 유전자의 존재를 확인하는 방법이 널리 이용되고 있다¹⁵⁻¹⁷⁾. 이들은 분화 시기에 따라 발현되는 특성이 조금씩 다르다고 알려져 있다^{1,18-21)}. 이로 인해 연구를 진행하는 연구자에게는 적절한 시기를 결정하는 데 어려움이 있는 것이 현실이다.

이에, 본 연구의 목적은 과잉치 치수세포에서 추출한 세포의 석회질 결절이 형성되는 최적의 시기를 알아보고, 분화제를 처리한 기간에 따른 상아모세포 특이 인자의 발현양상을 Real Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Real Time qRT-PCR)법을 이용하여 확인해 보는 것이었다.

II. 연구 대상 및 방법

1. 과잉치로부터 일차배양(Primary Culture from Deciduous Teeth)

과잉치로부터 줄기세포의 일차배양은 환아 및 보호자의 서면 동의를 받고서 이루어졌으며, 만 7 - 9세의 건강한 남자 3명(남자 2명, 여자 1명)으로부터 조직을 얻었다.

과잉치 치수 조직은 매복된 과잉치로 인해 인접 영구치의 맹출에 장애를 줄 것으로 판단하고 무균상태에서 발거한 과잉치로부터 얻었다(n=3). 과잉치 치수로부터 얻은 줄기세포는 과잉치 치수유래 줄기세포(supernumerary dental pulp stem cells, sDPSCs) 라고 명명하였다. 얻어진 조직으로부터의 일차 배양은 Enzymatic digestion 법을 이용하였다. 얻어진 조직은 세포의 손실을 최소화하기 위해 발치 즉시 100 U/ml of penicillin and 100 µg/ml of streptomycin (Gibco BRL), 2 mM L-glutamine (Gibco BRL), 10 mM L-ascorbic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA)와 fetal bovine serum 20% (FBS; Gibco, Life Technologies Corporation, Carlsbad, Calif., USA)를 함유한 α -minimum essential medium (α -MEM; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에 보관하여 치수 세포 채취를 위해 실험실로 옮겼고, 당일 치수조직으로부터 세포를 채취하였다.

세포 추출은 멸균된 공간에서 행하였으며 과잉치에서 범랑상 아경계 하방을 생리식염수를 주수하면서 치수가 노출되지 않을 정도까지 멸균된 고속 절삭기구로 자른 후, 부러뜨려서 치수를 노출 시키고, 치수를 꺼내어 1 mm³ 이내로 잘게 자른 후 3 mg/mL의 Type I collagenase (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, M.O., USA) 와 4 mg/mL 의 Dispase (Sigma-

Aldrich Co., St. Louis, M.O., USA)를 넣고 반응이 잘 일어나도록 37°C, Shaking incubator에 1시간 동안 두어 세포를 분리하는 Enzymatic digestion 방법을 적용하였다.

이후 단일 세포를 얻기 위해 70 µm Falcon strainer (CORNING Inc., N.Y., USA)로 거른 후 필터를 빠져나온 세포를 α -MEM (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 배지에 20% FBS (Gibco, Life Technologies Corporation, Carlsbad, Calif., USA), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Gibco BRL), 2 mM L-glutamine (Gibco BRL) 그리고 10 mM L-ascorbic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 첨가한 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 습윤 환경에서 7일간 배양하였다. 배지는 48시간 후부터 교체하기 시작하여 2 - 3일에 한 번씩 바꾸었으며 배양용기에 부착되지 않는 부유물들은 배지 교체 시 함께 씻어내었다. 용기의 바닥에 부착된 세포가 80%를 차지할 정도로 포화상태에 도달했을 때 Trypsin-EDTA (CORNING Inc., N.Y., USA)로 세포를 분리시킨 후 1/4씩 나누어 동일한 방법으로 2세대까지 배양하며 연구준비를 하였다.

2. 경조직 형성 세포로의 분화능력 관찰(Osteogenic Differentiation)

과잉치 치수유래 줄기세포의 골모세포로의 분화유도를 평가하기 위해 골분화 배지에 배양하여 2계대의 세포를 관찰하였다. 각각의 샘플들은 거의 바닥에 부착된 세포가 80%를 차지할 정도로 포화상태에 도달했을 때 골분화를 유도하기 위해, α -MEM (Gibco, LifeTechnologies, Grand Island, N.Y., USA)에 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Life Technologies Corporation, Carlsbad, Calif., USA)과 5 mM β -glycerophosphate (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, M.O., USA), 100 nM Dexamethasone (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, M.O., USA) 그리고 100 µM Ascorbic acid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, M.O., USA)를 혼합하여 제작한 골분화 배지에서 배양하였다. 배양액은 3일에 1회씩 교환 해주었다.

분화 정도를 확인하기 위해 Alizarin Red S 염색을 시행하여 세포 밖에 형성된 석회화 결절을 관찰하였다. 세포를 70% 에탄올에 5분간 고정하고 2% Alizarin-red solution (pH=4.5; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, M.O., USA)으로 5분간 염색한 다음 증류수로 세척한 후 건조하였다. 골분화 유도제를 적용한 표본은 8일, 14일, 21일 그리고 28일 동안 분화시킨 후 각각 염색하였다.

3. Total RNA의 추출 및 cDNA 합성

Total RNA를 Easy-spin total RNA extraction Kit (iNtRON Biotechnology, Gyeonggi-do, Korea)를 사용하여 시행하였다. 이후 Total RNA의 정량을 위해 Nanodrop ND-

2000® (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) 분광광도계를 사용하였다. cDNA의 합성을 위해 각각의 total RNA 1 µg을 oligo (dT) 15 primer를 함유한 qPCR RT Master Mix kit (TOYOBO Co., Osaka, Japan)에 넣고 Nuclenase-free water를 섞어 총 20 µl을 만들고, 65°C에서 5분, 4°C에서 5분 그리고, 95°C에서 5분간 반응시켰다.

3. 실시간 정량적 역전사 중합효소 연쇄반응(Real Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, Real Time qRT-PCR)

분석을 위해 사용된 인자는 각각 ALP, OC, ON, DMP-1, DSPP이며, 분화 전후의 각 mRNA의 상대적 발현 양의 비교는 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 기준으로 분석하였다. cDNA가 25 ng이 되도록 멸균증류수를 이용하여 희석하고 반응액은 forward 및 reverse primer (10 pmol/µl) 각각 0.5 µl, 와 2x SYBR Premix Ex Taq™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, C.A., USA) 5 µl를 넣어 총 10 µl를 만들었으며, StepOnePlus™ Real Time PCR (AB Applied Biosystems by life Technology, Waltham, M.A., USA)으로 증폭 및 형광을 검출하였다. 증폭과정은 초기 denaturation을 95°C에서 20초, annealing은 각 전처리제의 적정 온도에서 1분, 총 40 cycle 진행하고, 이후 65°C에서 95°C까지 dissociation 과정을 통해 melting curve 분석도 함께 시행하였다. Melting curve가 하나의 peak로 나와서, 단 하나의 PCR product가 만들어 지는 지를 검증하였다. 사용한 primer의 조건은 Table 1와 같다. 자료는 StepOnePlus™ (AB Applied Biosystems by life Technology, Waltham, M.A., USA)를 이용 분석하였다.

4. 통계분석(Statistical Analysis)

Real Time qRT-PCR 분석은 각 표본마다 각각 3회씩 시행하여 평균값과 표준편차로 산출하였다. 각 mRNA의 상대적 발현량의 비교는 GAPDH를 기준으로 하여 2^{-ΔΔCT}법을 이용하였다²²⁾. 분화제 처리 기간에 따른 상대적인 mRNA 발현량의 차이는 SPSS (Version 17.0; Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 Kruskal-Wallis 분석을 시행하였고, Mann-Whitney U test로 배양 기간 간의 통계적 유의차를 검증하였다(p < 0.05).

Ⅲ. 결 과

1. 과잉치로부터 일차배양(Primary Culture from Supernumerary Teeth)

배양 후 3 - 4일이 지나면 과잉치 치수조직에서부터 얻은 조직에서 세포가 자라나오기 시작하였으며, 자라나온 세포는 광학현미경 상에서 방추형이거나 혹은 섬유모세포와 유사한 형태를 보였고 방향성을 가지고 증식하는 양상이 관찰되었다(Fig. 1).

2. 경조직 형성 세포로의 분화(Osteogenic Differentiation)

Alizarin Red S로 형성된 석회화 결절을 염색한 결과, 과잉치 치수유래 줄기세포에서 경조직 형성 세포로의 분화가 8일째에는 희미하게 염색되기 시작하여서, 14일에는 확연한 염색 소견을 보였다. 이후 21일 및 28일째까지 관찰한 결과 더욱 짙게 염색이 되는 양상이 관찰되었다(Fig. 2).

Table 1. Real Time quantitative RT-PCR primer sequences used in this study

Gene		Sequence of Primer (5'- 3')	Annealing Temp (°C)
GAPDH	forward	GGAGTCCACTGGCGTCTTCAC	57
	reverse	GCTGATGATCTTGAG GCTGTTGTC	
ALP	forward	CTTGACCTCCTCG GAAGACACTC	60
	reverse	CGCCCACCAC CTTGTAGCC	
OC	forward	CCTCA CACTCCTCGCCCTATTG	57
	reverse	CGCTG CCCTCCTGCTTGG	
ON	forward	AGGAG GTGGTGCGGAAAATC	55
	reverse	GTGG CAAAGAAGTGGCAGGAAG	
DMP-1	forward	CA GGAAGAGGTGGTGAGTGAGTC	63
	reverse	CTG GATTGCTGCTGTGCTTGC	
DSPP	forward	CAG TACAGGATGAGTAAATGCCAGTG	64
	reverse	CCATTCCCTTCTCCCTGTGACC	

(GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, ALP: alkaline phosphatase, OC: Osteocalcin, ON: Osteonectin, DMP-1: dentin matrix acidic phosphoprotein 1, DSPP: dentin sialophosphoprotein)

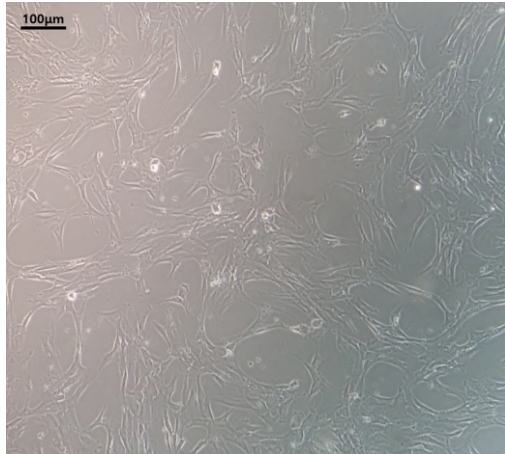


Fig. 1. Morphology of stem cells obtained from supernumerary teeth: supernumerary dental pulp stem cells (sDPSCs). Original magnification: $\times 100$, Scale bar: 100 μm .

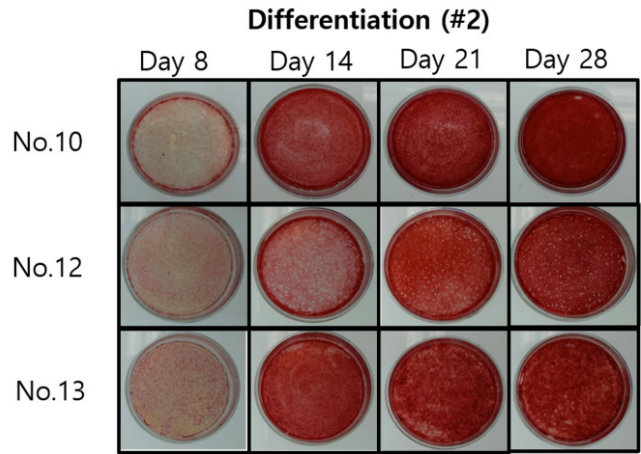


Fig. 2. Osteogenic differentiation of the sPDLSCs and BMMSCs. Alizarin Red S staining after 5 weeks of culture in osteogenic differentiation medium and control medium.

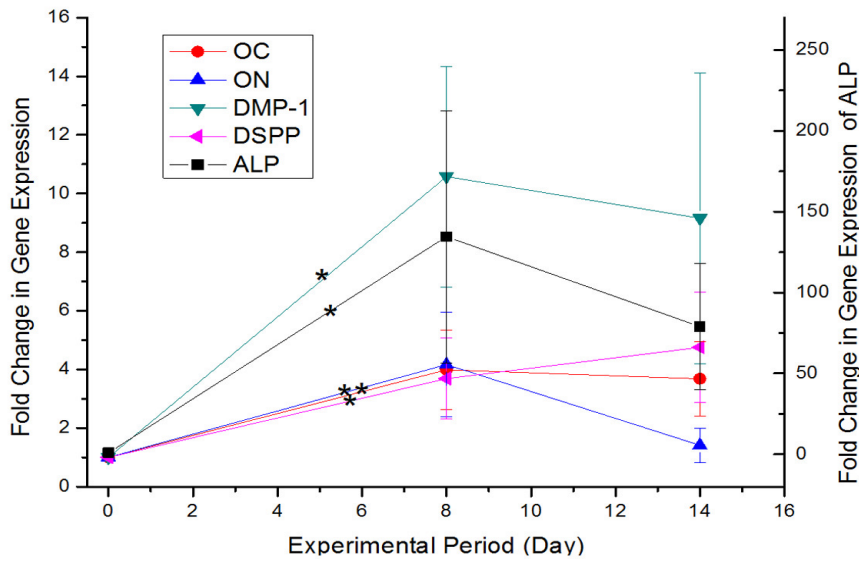


Fig. 3. Osteogenic differentiation of the sDPSCs. Real Time Quantitative RT-PCR analysis revealed the changes in alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OC), osteonectin (ON), dentin matrix acidic phosphoprotein 1 (DMP-1), dentin sialophosphoprotein (DSPP) relative gene expression at 0, 8, and 14 days of culture under osteogenic stimuli (*: $p < 0.05$).

3. 실시간 정량적 역전사 중합효소 연쇄반응(Real Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, Real Time qRT-PCR)

Real Time qRT-PCR 분석 결과, 분화를 진행시킨 표본에서 ALP, OC, ON, DMP-1 및 DSPP 발현 변화가 관찰되었는데, ALP, OC, ON, DMP-1의 경우 두 표본은 분화 8일까지 증가하다가 14일째부터 감소하는 양상을 보였다. 이에 반해, DSPP는 시간이 흐름에 따라 발현양상이 점차적으로 증가하는 소견을 보였다(Fig. 3).

IV. 총괄 및 고찰

본 연구 목적은 인접 영구치의 맹출에 방해가 확실시되어 발거한 과잉치로부터 치수조직을 분리하여, 줄기세포로서의 활용 가능성 여부를 평가하기 위한 기초 연구로서 분화제를 처리하는 기간에 따른 세포의 석회질 결절 형성 능력과 상아모세포의 특성을 나타내는 유전 인자의 발현 양상을 조사해 보는 것이었다.

치아의 발생과정에서 교두 경사면을 따라 아래쪽으로 진행되는 내치 상피세포의 성숙과 이에 대응한 치아유두 유래 미분화 외배엽성 중간엽세포들이 커지면서 상아모세포가 분화되게 된다

23). 상아모세포는 상아질의 형성과 유지를 담당하는 세포이며, 상아질의 유기질은 Type I collagenase와 비교원질성 단백질로 구성된다²⁴⁾.

상아모세포는 비교원성 단백질인 Alkaline Phosphatase (ALP), Osteocalcin (OC), Osteonectin (ON), Dentin matrix acidic phosphoprotein 1 (DMP-1), Dentin Sialophosphoprotein (DSPP) 등의 유전자 발현에 관여한다^{17,25-28)}. 본 연구에서 이들 인자들이 분화제 처리 8일째에 가장 많이 발현되다가 대체로 14일째에는 감소하는 양상을 보여 상아모세포로 분화가 이루어 졌음을 확인할 수 있었다.

ALP는 대부분의 무기질침착 조직의 형성과 관련이 있으며²⁹⁾, OC는 골모세포, 상아모세포 그리고 백악모세포 등에서 합성되는 비아교성 단백질이며 주로 석회화 후기에 발현된다³⁰⁾. 또한 ON은 골기질에서 광범위하게 발현되며, 골의 생성과정인 기질이 분비되는 증식, 기질의 성숙 그리고 기질의 석회화 단계 중 두 번째 단계에서 ALP와 함께 ON의 발현이 증가한다³¹⁾. ALP와 ON은 그 발현이 8일째에 가장 높게 나타나다가 14일째부터 감소하는 소견을 보여 위의 연구와 유사한 결과를 보였으며, 이는 또한 박 등³²⁾이 과잉치 치주인대로부터 유래한 세포에서의 연구 결과와도 합치한다. 그러나 송 등⁵⁾이 유치 치주조직으로부터 유래한 세포에 대한 연구에서는 ALP의 활성이 분화 28일까지 지속적으로 증가하는 양상을 보였다는 것과는 대치되는 결과를 보였다. OC와 DMP-1 또한 그 정도는 약하지만 대체로 8일째 증가하다가 14일째는 감소하는 경향을 나타내었다.

DSPP는 대표적인 상아질 특이 단백질이며 상아질의 석회화 과정에서 중요한 역할을 수행한다³³⁾. DSPP의 발현 양상은 14일째까지 점진적으로 증가하는 양상을 보였다는 점에서 다른 것들과 구분되는 양상을 보였다. 이는 sDPSCs가 조상아세포로 보다 잘 분화될 수 있는 세포임을 유추해 볼 수 있는 결과라고 사료된다.

세포의 석회질 결절 형성 정도를 시각적으로 판단하기 위해 Alizarin-red solution (pH 4.5)로 칼슘을 염색하여 세포의 기질의 석회화를 관찰하여 8일째부터 다소 흐리게 염색되기 시작하다가 14일째에는 배지 전체에 뚜렷한 염색 소견을 보였다. 분화제를 처리한 기간이 증가함에 따라 강하게 염색되는 소견을 보였다고 보고한 기존의 연구와도 일치하는 소견이었다^{7,31)}. 이것은 ALP발현 양상과도 유사한 결과였으며 ALP가 조골세포의 전구체에서 발현되며, 세포가 배양되면서 조골세포로 분화된 것을 표시한다³⁴⁾.

분화제의 처리 기간이 증가할수록 Alizarin-red solution의 염색 정도는 증가하였으나, 세포의 입장에서는 생성된 석회화 결절들로 인해 성장할 수 있는 공간이 부족하게 되고 양분의 고갈로 인한 죽는 세포 또한 증가하게 된다. Real Time qRT-PCR의 결과를 통해서 분화제 처리 8일째가 가장 높은 발현 양상을 보이다가 14일째에는 감소하는 양상을 보였다. 따라서 14일 이상의 분화제 처리 기간은 큰 의미를 찾기 어려우며, 부작용이 커지는 효과가 있으므로 적절한 기간은 14일 이내일 것이라 사료된다.

V. 결 론

이상의 연구를 종합해 보면, Real Time qRT-PCR법을 통한 상아모세포의 대표 발현 인자에 관한 연구에서 ALP, OC, ON, DMP-1 그리고 DSPP의 발현이 뚜렷하게 관찰되었기에 sDPSCs가 상아모세포로 분화가 가능한 세포를 포함하고 있다고 사료된다.

Alizarin-red solution의 염색 결과는 sDPSCs가 석회화 결절을 생성할 수 있는 세포로 분화가 이루어 졌음을 시사한다.

따라서 향후, sDPSCs를 이용하여 줄기세포로서의 가능성을 확인하기 위한 연구를 수행할 때, 분화제의 처리 기간은 8일 정도로 하여도 충분한 유의성을 갖는 결과를 얻을 수 있으리라 사료되었다.

References

1. Aubin J, Liu F, Malaval L, et al. : Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone*, 17:S77-S83, 1995.
2. Arana-Chavez VE, Massa LF : Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *Int J Biochem Cell Biol*, 36:1367-1373, 2004.
3. Park JW, Song JS, Son HG, et al. : Effect of storage media and duration on pulpal cell viability in exfoliated deciduous teeth. *J Korean Acad Pediatr Dent*, 41:1-7, 2014.
4. Gronthos S, Brahimi J, Li W, et al. : Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*, 81:531-535, 2002.
5. Song JS, Kim SH, Jung HS, et al. : Characterization of Stem Cells Obtained from the Dental Pulp and Periodontal Ligament of Deciduous Teeth. *Tissue Eng Regen Med*, 7:575-582, 2010.
6. Wang S, Gao X, Gong W, et al. : Odontogenic differentiation and dentin formation of dental pulp cells under nanobioactive glass induction. *Acta Biomater*, 10:2792-2803, 2014.
7. Lei M, Li K, Li B, et al. : Mesenchymal stem cell characteristics of dental pulp and periodontal ligament stem cells after in vivo transplantation. *Biomaterials*, 35:6332-6343, 2014.
8. Song JH, Park BW, Byun JH, et al. : Isolation and characterization of human dental tissue-derived stem cells in the impacted wisdom teeth: comparison of dental follicle, dental pulp, and root apical papilla-derived cells. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*, 36:186, 2010.
9. Ruch JV : Odontoblast commitment and differentia-

- tion. *Biochem Cell Biol*, 76:923-938, 1998.
10. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, *et al.* : Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97:13625-13630, 2000.
 11. Miura M, Gronthos S, Zhao M, *et al.* : SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100:5807-5812, 2003.
 12. Huang AH, Chen YK, Lin LM, *et al.* : Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. *J Oral Pathol Med*, 37:571-574, 2008.
 13. Kim JB : Managing Complications Related to Multiple Supernumerary Teeth. *J Korean Acad Pediatr Dent*, 41:180-186, 2014.
 14. Huang WH, Tsai TP, Su HL : Mesiodens in the primary dentition stage: a radiographic study. *ASDC J Dent Child*, 59:186-189, 1992.
 15. Burkhardt JK, Halama D, Frerich B, *et al.* : Real-time RT-PCR discriminating mRNA encoding osteocalcin from unspecific targets. *Anal Bioanal Chem*, 393:1351-1355, 2009.
 16. Turan S, Aydin C, Bereket A, *et al.* : Identification of a novel dentin matrix protein-1 (DMP-1) mutation and dental anomalies in a kindred with autosomal recessive hypophosphatemia. *Bone*, 46:402-409, 2010.
 17. D'souza R, Cavender A, Sunavala G, *et al.* : Gene expression patterns of murine dentin matrix protein 1 (Dmp1) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct developmental functions in vivo. *J Bone Miner Res*, 12:2040-2049, 1997.
 18. De Vries IG, Quartier E, Boute P, *et al.* : Immunocytochemical localization of osteocalcin in developing rat teeth. *J Dent Res*, 66:784-790, 1987.
 19. Mundlos S, Schwahn B, Reichert T, *et al.* : Distribution of osteonectin mRNA and protein during human embryonic and fetal development. *J Histochem Cytochem*, 40:283-291, 1992.
 20. Reichert T, Storkel S, Becker K, *et al.* : The role of osteonectin in human tooth development: an immunohistological study. *Calcif Tissue Int*, 50:468-472, 1992.
 21. Lian JB, Stein GS, Bortell R, *et al.* : Phenotype suppression: A postulated molecular mechanism for mediating the relationship of proliferation and differentiation by Fos/Jun interactions at AP-1 sites in steroid responsive promoter elements of tissue-specific genes. *J Cell Biochem*, 45:9-14, 1991.
 22. Livak KJ, Schmittgen TD : Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25:402-408, 2001.
 23. Nanci A. Ten Cate's Oral Histology-Pageburst on VitalSource: Development, Structure, and Function: Elsevier Health Sciences; 2007.
 24. Leso H : Odontoblast differentiation and tooth morphogenesis. *J Dent Res*, 79:1640, 2000.
 25. Butler WT, Ritchie H : The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *Int J Dev Biol*, 39:169-179, 1995.
 26. Gehron RP : The biochemistry of bone. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 18:858-902, 1989.
 27. Goseki M, Oida S, Nifuji A, *et al.* : Properties of alkaline phosphatase of the human dental pulp. *J Dent Res*, 69:909-912, 1990.
 28. Magnusson P, Larsson L, Magnusson M, *et al.* : Isoforms of bone alkaline phosphatase: characterization and origin in human trabecular and cortical bone. *J Bone Miner Res*, 14:1926-1933, 1999.
 29. Hanawa M, Takano Y, Wakita M : An autoradiographic study of calcium movement in the enamel organ of rat molar tooth germs. *Arch Oral Biol*, 35:899-906, 1990.
 30. Papagerakis P, Berdal A, Mesbah M, *et al.* : Investigation of osteocalcin, osteonectin, and dentin sialophosphoprotein in developing human teeth. *Bone*, 30:377-385, 2002.
 31. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, *et al.* : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284:143-147, 1999.
 32. Park JH, Song JS, Lee JH, *et al.* : Characteristics of Stem Cells Derived from the Periodontal Ligament of Supernumerary Teeth. *Tissue Eng Regen Med*, 8:123-131, 2011.
 33. Feng JQ, Luan X, Wallace J, *et al.* : Genomic organization, chromosomal mapping, and promoter analysis of the mouse dentin sialophosphoprotein (Dsp) gene, which codes for both dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein. *J Biol Chem*, 273:9457-9464, 1998.
 34. Kotobuki N, Hirose M, Funaoka H, *et al.* : Enhancement of in vitro osteoblastic potential after selective sorting of osteoblasts with high alkaline phosphatase activity from human osteoblast-like cells. *Cell Transplant*, 13:377-383, 2004.

국문초록

과잉치 치수유래 줄기세포의 분화제 처리 기간에 따른 상아모세포 발현 특성

김종수

단국대학교 치과대학 소아치과학교실

본 연구의 목적은 치과분야에서 줄기세포 공급원으로써 과잉치의 활용 가능성을 알아보고자 Real Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Real Time qRT-PCR)법을 이용하여 발치된 과잉치 치수 유래 줄기세포 (supernumerary dental pulp stem cells, sDPSCs)로부터 상아모세포로의 분화여부를 관찰해 보는 것이었다.

이를 위해 상아모세포의 대표적인 발현인자로 알려진 alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OC), osteonectin (ON), dentin matrix acidic phosphoprotein 1 (DMP-1) 그리고 dentin sialophosphoprotein(DSPP)의 발현을 분화제 처리 후 0일, 8일 그리고 14일째에 각각 Real Time qRT-PCR 법을 통해 상대적인 mRNA의 발현 양을 비교하여 변화 양상을 알아보았다. 또한 Alizarin-red solution 의 염색을 통해 sDPSCs가 분화제 처리 7일, 14일, 21일 그리고 28일째에 석회화 결절을 형성하는 정도를 시각적으로 확인해 보았다.

Real Time qRT-PCR 결과 분화제 처리 8일째에 가장 높은 발현 양을 보이다가 14일째에 감소하는 추세를 나타내었으며, Alizarin-red solution 염색 결과는 7일째부터 흐리게 나타나다가 14일째에는 배지 전반에 걸쳐 진하게 염색되는 소견을 보였다.

따라서, sDPSCs를 이용한 연구에서 Real Time qRT-PCR법을 위한 분화제의 처리 기간은 8일 정도가 적절하며, Alizarin-red solution 염색은 14일이 적당한 것으로 사료된다.

주요어: 상아모세포, 과잉치, 분화제, 줄기 세포