

영구치 치수 기질세포를 이용한 연골 분화 및 분화 시기에 따른 형태학적 변화

정주령^{1,2}, 김하나¹, 박열¹, 김민정¹, 오영주¹, 신수정³, 최윤정^{1,2}, 김경호^{1,2*}

¹연세대학교 치과대학 교정과학교실,
²연세대학교 치과대학 두개안면기형
연구소,
³연세대학교 치과대학 보존과학교실

Received November 28, 2011;
Last Revision January 31, 2012;
Accepted February 2, 2012.

¹Chung CR, DDS, PhD, Assistant professor; Kim HN, DDS, MS, Resident; Park Y, DDS, MS, Graduate Student; Kim MJ, DDS, MS, Assistant professor; Oh YJ, BS, Research assistant; Choi YJ, DDS, MS, PhD, Assistant professor; Kim KH, DDS, MS, PhD, Professor, Department of Orthodontics, Gangnam Severance Dental Hospital, Yonsei University College of Dentistry, Seoul, Korea

²Chung CR, DDS, PhD, Assistant professor; Choi YJ, DDS, MS, PhD, Assistant professor; Kim KH, DDS, MS, PhD, Professor, Institute of Craniofacial deformity, Yonsei University College of Dentistry, Seoul, Korea

³Shin SJ, DDS, MS, PhD, Assistant professor, Department of Conservative Dentistry, Gangnam Severance Dental Hospital, Yonsei University College of Dentistry, Seoul, Korea

*Correspondence to

Kyung-Ho Kim, DDS, MS, PhD.
Department of Orthodontics,
Gangnam Severance Dental Hospital,
Yonsei University College of Dentistry,
211 Eonju-ro, Gangnam-gu, Seoul,
Korea 135-720
TEL, +82-2-2019-3562; FAX, +82-2-3463-4052; E-mail, khkim@yuhs.ac

Morphological evaluation during *in vitro* chondrogenesis of dental pulp stromal cells

Choo-Ryung Chung^{1,2}, Ha-Na Kim¹, Yeul Park¹, Min-Jeong Kim¹, Young-Ju Oh¹, Su-Jung Shin³, Yoon-Jeong Choi^{1,2}, Kyung-Ho Kim^{1,2*}

¹Department of Orthodontics, Yonsei University College of Dentistry, Seoul, Korea

²Institute of Craniofacial deformity, Yonsei University College of Dentistry, Seoul, Korea

³Department of Conservative Dentistry, Yonsei University College of Dentistry, Seoul, Korea

Objectives: The aim was to confirm the stem cell-like properties of the dental pulp stromal cells and to evaluate the morphologic changes during *in vitro* chondrogenesis.

Materials and Methods: Stromal cells were outgrown from the dental pulp tissue of the premolars. Surface markers were investigated and cell proliferation rate was compared to other mesenchymal stem cells. Multipotency of the pulp cells was confirmed by inducing osteogenesis, adipogenesis and chondrogenesis. The morphologic changes in the chondrogenic pellet during the 21 day of induction were evaluated under light microscope and transmission electron microscope. TUNEL assay was used to evaluate apoptosis within the chondrogenic pellets. **Results:** Pulp cells were CD90, 105 positive and CD31, 34 negative. They showed similar proliferation rate to other stem cells. Pulp cells differentiated to osteogenic, adipogenic and chondrogenic tissues. During chondrogenesis, 3-dimensional pellet was created with multi-layers, hypertrophic chondrocyte-like cells and cartilage-like extracellular matrix. However, cell morphology became irregular and apoptotic cells were increased after 7 day of chondrogenic induction. **Conclusions:** Pulp cells indicated mesenchymal stem cell-like characteristics. During the *in vitro* chondrogenesis, cellular activity was superior during the earlier phase (within 7 day) of differentiation. (*Restor Dent Endod* 2012;37(1):34-40)

Key words: Cartilage; Chondrogenic pellet; Dental pulp stem cell; Dental pulp stromal cell; *in vitro* chondrogenesis

서론

악관절은 하악의 위치를 결정하고 저작, 연하 등과 같은 다양한 구강악안면영역의 기능을 담당하는 부위로 그 표면은 얇은 비혈관성, 비신경성의 치밀한 섬유연골로 덮여있다. 하악과두는 조직학적으로 명확하게 4개의 층으로 구성되는데 최상층은 섬유층으로 관절면에 평행하게 배열하며 치밀하게 구성된 콜라겐섬유로 구성되어 있고 하방의 두층은 연골세포가 일정하게 밀집되어 있는 연골층으로, 상방의 증식층과 하방의 비후층으로 구성되어 있으며, 골과 연접한 네번째 층은 석회화연골층으로 하방의 연골하 골과 구분된다.¹ 이러한 연골조직은 기능 시 기계적 부하에 따라 대사활성을 조절하여 관절 부위를 보호하고 항상성을 유지하고 있으나 생리적 한계 이상의 자극이나 부하가 가해지면 퇴행성 변화

※본 연구는 연세대학교 치과대학 2011년도 교수연구비에 의하여 이루어졌음(2011-0059).

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

가 야기되고 이로 인해 교합과 골격의 불안정, 턱관절 기능이상, 통증과 함께 안면비대칭, 전치부 개방교합, 하악 후퇴 등 교합의 이상이 초래되는 경우도 있다.²⁻⁴ 하지만 악관절, 특히 연골 조직의 퇴행성 변화의 경우 개선이 어려우며 다양한 외과적 시술조차 예측가능하고 안정적인 치료결과를 보장하지 못하는 것이 임상적인 한계이다.⁵⁻⁷

한편, 신체 내의 타 관절의 경우 골수줄기세포를 비롯한 줄기세포를 이용한 골절, 관절염, 관절연골손상, 인대와 건의 손상의 재생에 대한 보고가 다수 있다.⁸⁻¹¹ 줄기세포란 여러종류의 신체조직으로 분화할 수 있는 능력을 가진 미분화세포로서 손상된 조직의 재생치료 등에 응용할 수가 있다. 치수 및 치근막 등의 치아 주변 조직에서도 줄기세포를 분리할 수 있고 타조직으로의 분화 가능성이 알려져 있으며, 치료 시 발치되는 치아를 이용하는 경우가 많아 채취가 용이하고 추가적인 통증이나 감염의 우려가 없다는 장점이 있다.^{12,13} 특히 치수에서 유래된 줄기세포의 경우 치아를 발거하지 않고도 줄기세포를 채취할 수 있을 뿐 아니라 타조직 유래의 줄기세포에 비해 면역거부반응이 낮은 장점이 있다고 알려져 있다.¹⁴⁻¹⁵

치수 유래 줄기세포를 이용한 연골 분화 가능성은 보고되고 있으나 분화된 또는 조직 공학으로 만들어진 연골조직에 대한 성상 규명이나 이를 이용한 재생 치료는 아직 미미한 실정이다.¹⁶ 특히 임상 응용에 사용되는 연골조직은 입체적이기 때문에 내부의 형태학적 특성 및 분화 시기에 따른 변화를 파악하는 것이 중요하다고 판단된다.¹⁷ 따라서 본 연구에서는 영구치의 치수에서 얻어지는 기질세포를 연골조직으로 분화시키고 분화 시기에 따른 변화를 추적하여 향후 임상 적용에 가장 유리한 조건에 대한 정보를 얻고자 하였다.

연구 재료 및 방법

치수조직의 분리 및 기질세포의 배양

강남세브란스병원 치과 교정과에 교정치료를 위하여 내원한 환자들 중 조직 공여에 동의한 6명의 환자(남 3명, 여 3명, 13.2 - 22.1세, 평균 17.1세)들로부터 치료 목적 상 발치된 소구치를 이용하였다. 모든 실험 과정은 강남세브란스병원 기관윤리심의위원회(IRB)로부터 승인(2009-0069)을 받고 이루어졌다. Carbide bur를 사용하여 치아 강축을 따라 틈새를 형성하고, pin cutter를 이용해 치아를 세로로 절단하여 내부의 치수조직을 분리해내었다. 치수조직을 1 - 3 mm²의 크기로 잘게 자른 후 outgrowth방법으로 배양하여 조직에서 자라나는 기질세포를 이용하였다.¹⁸ 요약하면 100 units/mL penicillin과 100 µg/mL streptomycin과 3% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 alpha modification of Eagle's medium (α -MEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 3회 세척한 후, 치수 조직을 100 mm 배양기에 옮겼다. 계대 배양은 1주마다 시행하였으며 세포는 10% FBS와 1% antibiotics를 함유한 배지에서 배양하였다. 3차 계대 배양한 세포를 이용하여 본 연구를 시행하였다.

유세포분석(Flow cytometry)

초기 중배엽 줄기세포의 표지인자 중 표면항원인 CD90 (anti-human CD90 [Thy-1] PE, eBioscience, San Diego, CA, USA), CD105 (anti-human CD105 [Endoglin] PE, eBioscience)와 내피세포, 조혈세포의 표

면항원인 CD31 (anti-human CD31 [PECAM-1] PE, eBioscience), CD34 (anti-human CD34 PE, eBioscience)의 항체를 이용하였다. CD marker는 phycoerythrin (PE)가 결합된 것을 사용하였다. 대조군은 1차 항체를 생략하고 진행하였다. 염색을 시행한 세포들의 형광량은 FACS Calibur Flow Cytometer (Becton-Dickinson, San Joes, CA, USA)로 측정하였고, 발현 양상은 FCSEXPRESS V3 software (De Novo Software, Thornhill, Ontario, Canada)로 분석하였다.

세포 증식 분석(WST assay)

소구치로부터 획득한 치수 기질세포 뿐 아니라, 골수에서 유래된 간엽성 줄기세포(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMMSC, Poietics human mesenchymal stem cells, Lonza, Walkersville, MD, USA)와 강남세브란스병원 성형외과에서 공급받은 지방조직에서 유래된 줄기세포(adipogenic stem cell, ADSC) 및 제3대구치의 치수유래 기질세포를 함께 실험하였다.¹⁹ Hemacytometer를 사용하여 세포 부유액 내의 세포 수를 측정하고, 96 well 배양기의 각 well에 4 x 10⁴개의 세포를 각 세포당 3 well에 분주하였다. 세포는 phenol red가 들어있지 않으며 1% antibiotics를 함유한 Dulbecco-Modified Eagle's Medium (D-MEM, Invitrogen)에서 24시간 배양하였다. 배양이 끝나는 날 10 µL water-soluble tetrazolium assay reagent (WST assay reagent, EZ-Cytox Cell viability assay kit, Daeil lab service, Seoul, Korea)를 각 well에 10 µL씩 분주하고 2시간 배양한 후, VersaMax Microplate Reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3회 측정값의 평균을 계산하였으며, one-way ANOVA분석을 시행하였다. 사후검정은 tukey분석으로 각 세포 군간의 유의한 차이를 확인하였다.

다분화유도검사

A. 골분화 유도

치수세포 2 x 10⁵개를 6 well 배양기에 분주하고 2 mL의 α -MEM에 10 nM의 Dexamethasone, 1 mg/mL의 β -glycerolphosphate, 50 µg/mL의 ascorbic acid를 첨가한 골분화유도배지상에서 2주간 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 고정 및 세척 후 20 mg/mL의 Alizarin Red S (Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액으로 10분간 세포를 염색하였으며 광학 현미경하에서 석회화결절 형성을 관찰하였다.²⁰

B. 지방분화 유도

치수세포 2 x 10⁵개를 6 well 배양기에 분주한 후 지방분화유도배지(STEMPRO Adipogenesis Differentiation Kit, Invitrogen)로 교환하여 2주간 배양하였다. 2주간 배양한 세포들은 고정 및 세척 후 3 mg/mL의 Oil Red O (Sigma) 용액으로 10분간 염색을 시행하였다.²¹

C. 연골분화 유도

본 연구에서는 Ahrens 등에 의해 제안된 방법을 변형한 micromass technique을 사용하여 연골조직을 배양하였다.²² 요약하면 1.6 x 10⁷ cells/mL 농도가 되도록 resuspension 후 10-µL droplets를 24 well plate의 중심에 seeding 하고 5% CO₂, 37°C 조건의 배양기에서 2시간 동안 유지한다. 이후 growth factor인 TGF- β 1 (Human TGF- β

1, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)이 첨가된 STEMPRO Chondrogenic Differentiation media (Invitrogen) 로 배양을 지속하며 2일 마다 배지를 교환하고 총 21일간 유지하였다. 연골분화를 통해 얻어진 입체조직(펠렛)은 사진촬영 및 조직 절편을 통해 분석하였다.

연골조직의 형태학적 분석

A. 조직학적 분석

연골 유도 3, 7, 14 그리고 21일 후 생성된 펠렛을 10% buffered neutral formalin에 고정하고, paraffin에 embedding 한 후 4 μ m의 조직 절편을 제작하였다. Hematoxylin-eosin (HE)과 alcian blue로 염색하여 연골 분화 및 glucosaminoglycan 기질 생성 여부를 관찰하였다.

B. 초미세구조 관찰

연골 유도 3, 7, 14 그리고 21일 후 생성된 펠렛을 Karnovsky's fixative (2% Glutaraldehyde, 2% Paraformaldehyde, 0.5% CaCl_2)에서 최소 6시간 동안 고정하였다. 0.1 M PBS로 2시간 동안 세척한 후 1% osmium tetroxide에서 postfixation하고, ethanol solutions에서 탈수시킨 후 EPON mixture (EPON 812, MNA, DDSA, DMP30)와 propylene oxide에 포매하였다. Ultra microtome을 이용하여 조직을 두께 80 nm의 얇은 시편으로 만들고 Cu grid 상에서 uranyl acetate와 lead citrate로 double-staining 후 transmission electron microscope (TEM, JEM-1011, JEOL, Tokyo, Japan)을 이용해 초미세구조를 관찰하였다.

C. 세포 자멸사 평가

ApopTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection kit (Millipore-Chemicon, Temecula, CA, USA)을 제조사의 지시에 따라 사용하여 연골 유도 3, 7, 14 그리고 21일 후 생성된 펠렛조직의 Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUDP nick end labeling (TUNEL) 분석을 시행하였다. 20 μ g/mL proteinase K (Roche, Mannheim, Germany)로 상온에서 10분간, 3% H_2O_2 를 포함한 PBS에서 10분간, kit equilibration buffer를 처리 후 working-strength TdT enzyme을 37°C에서 60분간 첨가하고, anti-digoxigenin antibody conjugated to a peroxidase reporter molecule와 함께 상온에서 30분간 배양하였다. 그 후 세척하고 3,3'-diaminobenzidine hydrochloride로 발색 후 light hematoxylin으로 배경 염색을 하였다.

결과

치수세포의 자가 증식능력

소구치로부터 치수조직을 분리하여 outgrowth방법으로 일차 배양한 후 약 14일 후부터 일차 배양한 조직의 경계로부터 세포가 자라나와 약 21일경에 배양기 내에 군집을 이루며 단층으로 자란 것을 확인할 수 있었다. 치수 기질세포는 골수유래 줄기세포(BMSC)와 유사한 방추형의 섬유모세포양의 형태를 보였다(Figure 1a).

표면표지자 항체를 이용한 유세포분석 결과, 치수 기질세포에서 중간엽 줄기세포 표지자인 CD90, CD105이 발현하였으며, 조혈세포와 내피세포의 표지자인 CD31과 CD34에는 미약한 반응을 보였다(Figure 1b).

소구치로부터 획득한 치수 기질세포(DPC4), 골수유래 줄기세포(BMSC), 지방유래 줄기세포(ADSC) 및 제3대구치의 치수 기질세포(DPC8)의 자가증식능력을 비교하였으며 모든 군에서 유사한 증식률을 관찰하였다(Figure 1c).

치수 세포의 다분화능력

분화유도를 통해 약 14일 후, Alizarin Red S 염색을 통한 석회화 결정, Oil-Red O 염색을 통한 지방 조직 및 glucosaminoglycan 기질침착이 관찰되었으며 연골 펠렛의 형성을 확인할 수 있었다(Figure 2).

분화 시기에 따른 펠렛의 형태학적 변화

연골 분화배지를 이용하여 치수세포를 배양 시작 후 이틀부터 약 1 mm³ 사이즈의 백색 펠렛이 관찰되었다. 3, 7, 14, 21일의 배양기간 동안 크기나 모양은 유사하게 유지되었다.

조직 구조를 살펴보면 분화 3일 후에는 펠렛의 표면 형태와 평행하게 나열되는 납작한 spindle-like cell로 구성되는 표층과 크고 polygonal한 세포와 세포간질이 풍부한 심층으로 구분되었다(Figure 3a). Glucosaminoglycan 기질 침착은 표층의 세포간 기질에서 관찰되었다(Figure 3e). 세포의 초미세구조의 경우, 세포 기질내의 미세 구조는 명확히 구분되나 핵소체가 명확하게 보이지는 않았다(Figure 3i). 분화 7일에는 표면과 평행하게 주행하는 납작한 세포로 구성된 표층과 polygonal한 세포로 구성된 심층 사이에 비대한 세포로 이루어진 중간층이 관찰되었다(Figure 3b). Glucosaminoglycan 기질 침착은 표층 및 중간층의 세포간 기질에서 조금 더 광범위하게 관찰되었다(Figure 3f). 전자현미경 상에서도 세포 사이의 간격이 증가되며 세포 핵내에서는 핵소체(흰 화살표)가 명확하게 구분되어 단백질 합성 등 세포의 활성이 높음을 알 수 있었다(Figure 3j). 분화 14일은 7일과 유사하게 3개층으로 이루어졌으나, 중간층의 세포가 조금 더 응집되고 세포 크기가 작아지는 양상이 관찰되었다(Figure 3c). 이에 반해 세포 외 기질의 축적이 증가하며 펠렛 내층까지 분포하였다(Figure 3g). 세포의 형태는 다소 불규칙하였으나, 핵소체(흰 화살표)는 명확히 구분되었으며 세포와 세포 사이 사이의 섬유성 기질의 침착이 증가된 양상(검은 화살표)을 관찰할 수 있었다(Figure 3k). 분화 21일째에는 납작한 세포로 구성된 표층과 동그란 세포가 응집되어 있는 심층이 완전하게 구분되어 2층 구조를 이루었다. 세포는 7일, 14일에 비해 납작하거나 작아져 비대한 세포가 거의 존재하지 않았으며 glucosaminoglycan 기질 침착이 보다 광범위하고 풍부하게 관찰되었 (Figures 3d and 3h). 핵이 농축되고(pyknosis) 및 핵붕괴(karyorrhexis 흰 화살표)를 나타내며 괴사되는 세포가 다수 발견되었다(Figure 3l).

세포 자멸사(apoptosis)의 변화

Apoptotic cell은 3일에는 표층에서만 매우 드물게 관찰되었으나 7일에는 전층에 걸쳐 분포하며 증가된 양상이었다. 14일은 전층에 걸쳐 분포하였으나 21일에는 표층에서 대부분 관찰되었다(Figure 4).

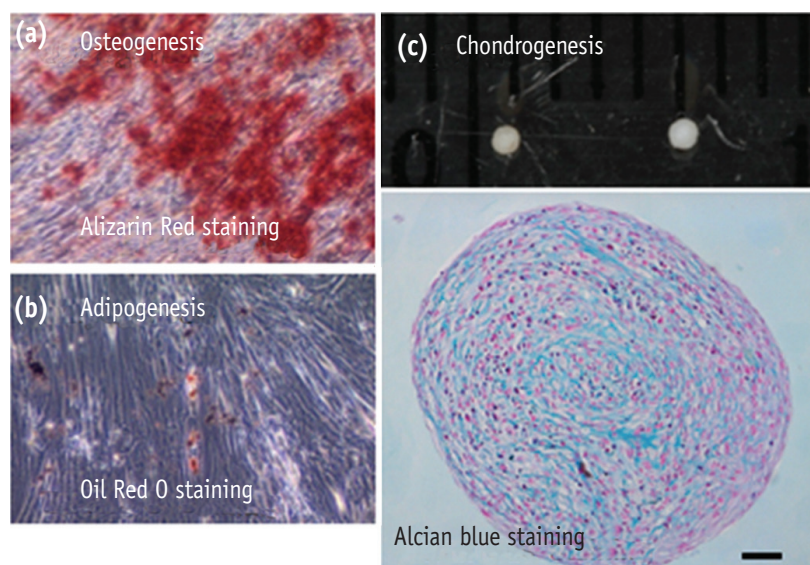
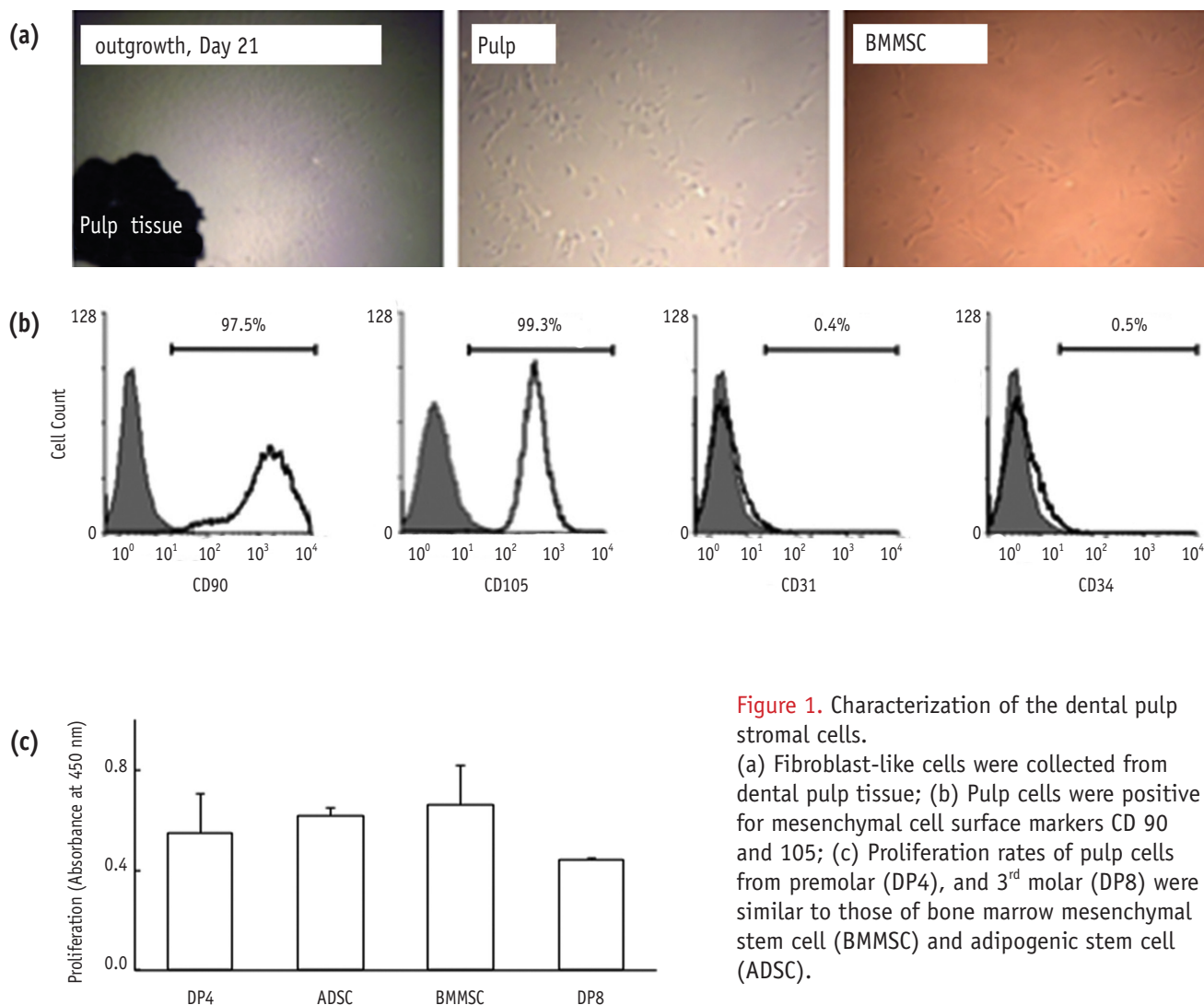


Figure 2. Multipotency of the pulp stromal cells. (a) Osteogenesis; (b) Adipogenesis; (c) Chondrogenesis after 14 days of induction. Scale bar = 50 mm

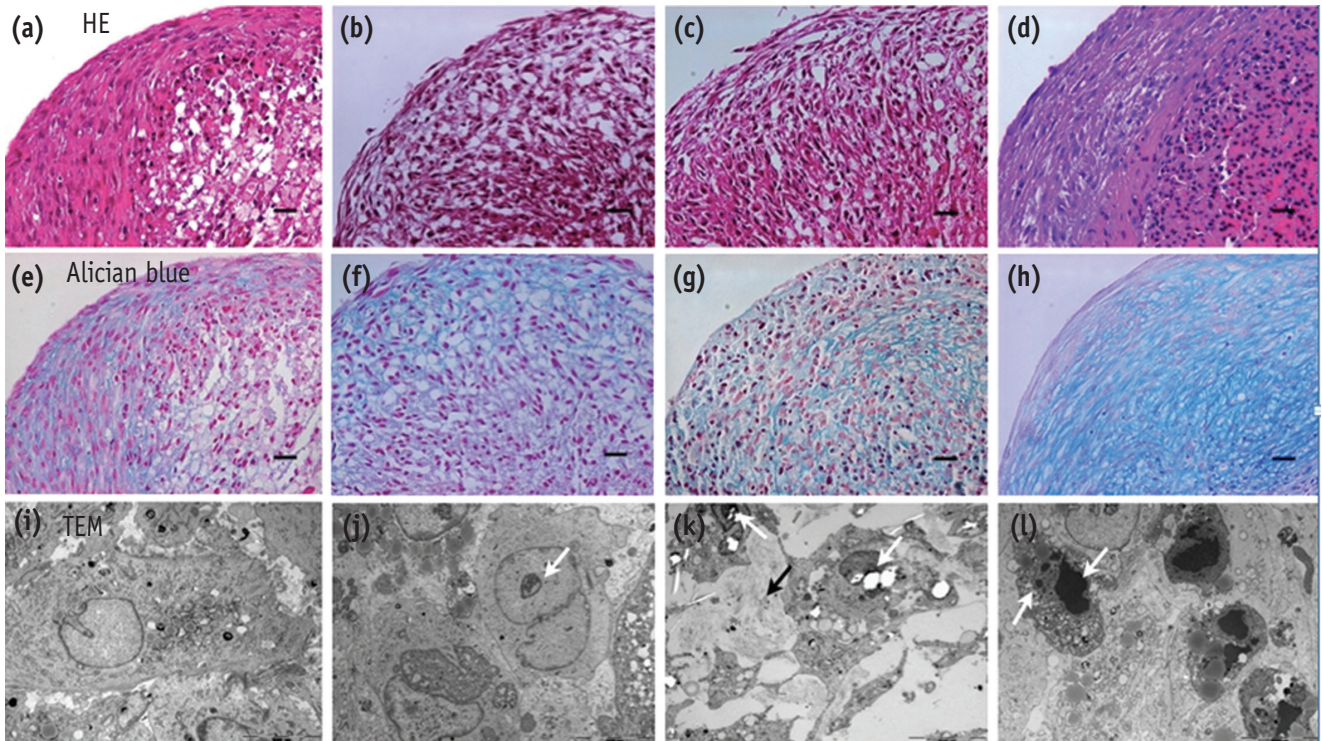


Figure 3. Morphologic evaluation of the chondrogenic pellets engineered from pulp cells. HE (a, b, c, d) and Alcian blue (e, f, g, h) staining at 3, 7, 14 and 21 days of chondrogenic induction. Scale bar = 50 µm. TEM (i, j, k, l) images of the cells within the pellets at 3, 7, 14 and 21 days of chondrogenic induction. White arrows, nucleolus; black arrow, extracellular matrix fibers, scale bar = 5 µm. HE, Hematoxylin-eosin; TEM, transmission electron microscope.

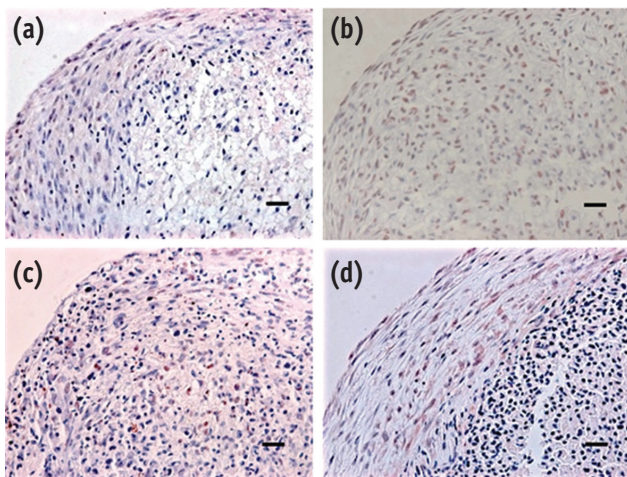


Figure 4. Evaluation of apoptotic cells within the chondrogenic pellets.

(a) At day 3, few TUNEL positive cells were localized only within the superficial layer, but as induction period increased TUNEL positive cells were scattered throughout the pellet; (b) at day 7; (c) at day 14; (d) at day 21. Scale bar = 50 µm

총괄 및 고안

본 연구를 통해 성인의 소구치의 치수에서 자라난 기질세포는 줄기세포의 특징을 보이며 이를 이용하여 충구조를 나타내는 연골조직을 형성할 수 있음을 알 수 있었다. 또한 배양 시기에 따른 형태학적인 분석을 통해 연골 배양 초기의 펠렛이 배양 후기에 비해 세포의 기질 형성 능력이 높고 세포 자멸사가 적어 향후 재생 치료에 응용 시 유리할 수 있음을 알 수 있었다.

유치의 치수로부터 확인된 줄기세포는 골수유래 줄기세포나 영구치 치수 줄기세포에 비해 자가 증식 능력이 유의하게 뛰어나지만 영구치열기가 시작된 이후의 성인 환자에게는 얻을 수 없다는 한계가 있다.^{23,24} 발수된 성인 치수로부터도 줄기세포를 분리해낸 바 있으며 이는 정상조직을 제거하지 않고도 채취가 용이하다는 접근상의 장점이 있는 반면 채취되는 양이 한정적이라는 단점이 있다.¹⁴ 본 연구에서는 교정 치료를 위해 발치되는 영구소구치를 사용하였다. 소구치는 상대적으로 발거가 간단하며 치료 시 양악 소구치를 모두 발거하는 경우가 많기 때문에 한 환자에서 한 번의 수술시 획득할 수 있는 치아와 그 치아로부터 얻을 수 있는 세포의 양이 많다. 또한 대부분 기능하고 있던 건전한 치아로서 온전한 구조를 가지고 있다. 적정 수준의 기계적 장력은 골수유래 중간엽줄기세포 증식에 긍정적인 조절인자이며

인간의 치수 줄기세포의 증식과 분화, 기질생성에 있어 긍정적인 영향을 끼칠 수 있다는 결과도 보고된 바 있어 교합을 이루어 기능을 하던 정상적인 건전치아의 세포는 분열이나 증식, 분화에 있어 매복치의 세포나 염증 조직으로부터 유래된 세포에 비해 더 유리할 것이라 기대할 수 있다.^{25,26}

기존 연구들의 경우 치아 조직으로부터 세포를 배양할 때 크게 두 가지 방법을 사용하고 있다. 획득한 조직을 배양기 바닥에 붙여서 조직으로부터 기질세포가 자라나오도록 배양하는 outgrowth방법과 trypsin이나 collagenase 등의 효소를 이용하여 조직을 단일 세포로 분해하여 증식시키는 enzyme digestion의 방법이다. Outgrowth방법에 비해 enzyme digestion방법의 경우 증식률과 분화 능력, 중간엽 줄기세포 표지자의 발현이 상대적으로 높아 중간엽 줄기세포 특성의 연구에 더 적합하다고 하였으나 그 술식이 복잡하고 유래가 다양한 효소 처리 과정을 반복하기 때문에 임상적인 응용을 고려할 때 단점이 될 수 있다.^{18,27} 따라서 본 연구에서는 향후 자가재생치료를 목표로 outgrowth방법을 선택하여 치수 조직의 기질세포를 효소처리 없이 얻어 사용하였다. 그 결과 영구치 치수의 기질세포는 높은 증식률과 골, 지방, 연골로 분화되는 다분화능력을 가진 간엽성 줄기세포의 특징을 가지고 있음을 알 수 있었다.

특히 본 연구의 경우, 치수세포를 이용해 특별한 지지체나 원심 분리 등의 기술을 동원하지 않고 기본적인 배양기 바닥에 10- μ l droplet의 세포를 분주하고 연골 분화 배지를 사용하여 배양하는 방식으로 비교적 간단하게 펠렛 형태의 구형 연골조직을 얻을 수 있었다. 연골펠렛의 경우 배양 시기에 따른 크기의 차이는 크게 관찰되지 않았으나, 분화가 진행됨에 따라 그 내부 미세구조 및 형태가 변화하는 것을 알 수 있었다. 분화 정도에 따른 형태학적 변화는 골수줄기세포, 활막줄기세포, 연골세포를 이용하여 생성된 연골펠렛의 경우에도 보고되고 있다.¹⁷ 골수줄기세포로 분화시킨 펠렛의 경우 활막, 연골 세포와는 달리 세포의 형태에 따라 분화 초기(1일)에는 펠렛의 표면 형태와 평행하게 나열되는 납작한 spindle-like cell로 구성되는 표층과 크고 polygonal한 세포와 세포간질이 풍부한 내층의 2층으로 구분되었다가, 중기(7일)에는 중간층에 비대세포들이 나타나면서 3층으로 구분되었다. 그리고 전자현미경관찰 결과 기질내의 미세구조가 명확히 구분되고 세포와 세포 사이의 간격이 증가되면서 그 사이로 섬유성 기질의 침착이 관찰되었다. 그러나 분화후기(21일)로 가면서 골수줄기세포의 경우 납작한 세포로 구성된 표층과 동그란 세포가 응집되어 있는 내층이 완전하게 구분되어 표층이 명확한 상태로 남는 2층 구조로 관찰되었고 세포사멸이 나타났다.¹⁷ 본 연구 결과 치수 기질세포는 골수 유래 줄기세포와 같이 간엽성 줄기세포의 표지자를 나타내며 다분화능력을 가지고 있으며 유사한 정도의 증식능력을 나타내었다. 이를 이용한 연골펠렛의 형태 및 그 변화 또한 골수유래 줄기세포를 이용한 펠렛과 가장 유사하였다.

Alcian blue 염색은 연골조직에 특이적으로 나타나는 glycosaminoglycan 기질을 염색하는 것으로 분화 기간 전체에 걸쳐서 관찰되면 그 양이 증가하였다. 전자현미경을 통해 관찰한 결과, 기질 형성의 측면에서는 관찰 시기가 진행됨에 따라 기질 형성이 증가하며 연골 분화가 유리하게 진행됨을 알 수 있었다. 하지만 세포의 경우, 7일경부터는 Tunel 양성인 세포가 나타내는 apoptosis가 급격히 증가하고 분화 후기로 갈수록 핵이 농축되어 괴사되는 세포가 출현하였다. 비록 7일경을 피크로 Tunel 양성 세포양이 줄어들기는 하나 여전히 분화 초기보

다는 증가된 양상을 보이며 이는 골수줄기세포를 이용한 연골분화의 경우와도 유사하다. 연골 펠렛의 분화에 따른 세포의 생존능력은 분화 첫주에 급감하고 그 후 2 - 3주에는 비교적 적은 양이 감소한다고 보고되고 있다.¹⁷ 반면, 전자현미경에 의해 관찰되는 사멸세포는 분화 후기로 갈수록 증가되었기 때문에 apoptosis를 경유하지 않는 세포 사멸 또한 공존하고 있다고 판단할 수 있다.

일반적으로 줄기세포를 이용해 형성된 연골조직은 골결손부 또는 연골결손부의 재생치료에 응용되며 그 효과 또한 긍정적으로 보고되고 있다.²⁸ 따라서 특수한 효소 처리없이 분리, 배양한 치수 기질세포 유래의 연골조직을 향후 동물 실험 등을 통해 악관절 영역의 재생에 응용하기를 기대할 수 있을 것이다. 본 연구에서 보았듯이 소구치 발거를 통해서 추출한 기질세포가 줄기세포의 특징을 보이며 이를 이용하여 충구조를 나타내는 연골조직으로 분화될 수 있음을 확인할 수 있었다. 배양 2일째 생성된 펠렛의 크기나 모양이 전체 배양기간 동안 증가하지 않는 점, 배양 3 - 7일 동안 표층과 심층 사이에 비대한 세포로 이루어진 기질 생성이 왕성한 중간층이 두드러지는 점, 7일을 지나면서 사멸세포들이 늘어나며 14일 이후 후기에는 세포 형태나 배열이 불규칙해지고 세포 괴사가 일어나는 점을 토대로 향후 이를 연골의 재생으로 응용시에는 배양 초기의 펠렛이 배양 후기에 비해 유리할 것으로 사료된다.

결론

치수 조직의 기질세포에서 중간엽 줄기세포의 특성을 확인할 수 있었다. 또한 연골 유도를 시행할 경우 분리 배양 초기의 연골 조직이 배양 후기의 조직에 비해 세포의 기질 형성능력이 높고 세포 사멸사가 적어 응용 시 유리할 것으로 판단된다.

References

- Okeson JP. Management of temporomandibular disorder 5th edition. Philadelphia: Elsevier; 2003. p 15-22.
- Arnett GW, Milam SB, Gottesman L. Progressive mandibular retrusion-idiopathic condylar resorption. Part II. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1996;110:117-127.
- Arnett GW, Milam SB, Gottesman L. Progressive mandibular retrusion-idiopathic condylar resorption. Part I. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1996;110:8-15.
- Wolford LM, Cardenas L. Idiopathic condylar resorption: diagnosis, treatment protocol, and outcomes. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1999;116:667-677.
- Crawford JG, Stoelinga PJ, Blijdorp PA, Brouns JJ. Stability after reoperation for progressive condylar resorption after orthognathic surgery: report of seven cases. *J Oral Maxillofac Surg* 1994;52:460-466.
- De Clercq CA, Neyt LF, Mommaerts MY, Abeloos JV, De Mot BM. Condylar resorption in orthognathic surgery: a retrospective study. *Int J Adult Orthodon Orthognath Surg* 1994;9:233-240.
- Merkx MA, Van Damme PA. Condylar resorption after orthognathic surgery. Evaluation of treatment in 8

- patients. *J Craniomaxillofac Surg* 1994;22:53-58.
8. McIlwraith CW, Frisbie DD, Rodkey WG, Kisiday JD, Werpy NM, Kawcak CE, Steadman JR. Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment healing of microfractured chondral defects. *Arthroscopy* 2011;27:1552-1561.
 9. Meyerrose T, Olson S, Pontow S, Kalomoiris S, Jung Y, Annett G, Bauer G, Nolta JA. Mesenchymal stem cells for the sustained *in vivo* delivery of bioactive factors. *Adv Drug Deliv Rev* 2010;62:1167-1174.
 10. van Buul GM, Kotek G, Wielopolski PA, Farrell E, Bos PK, Weinans H, Grohnert AU, Jahr H, Verhaar JA, Krestin GP, van Osch GJ, Bernsen MR. Clinically translatable cell tracking and quantification by MRI in cartilage repair using superparamagnetic iron oxides. *PLoS One* 2011;6:e17001.
 11. Zhang J, Pan T, Im HJ, Fu FH, Wang JH. Differential properties of human ACL and MCL stem cells may be responsible for their differential healing capacity. *BMC Med* 2011;9:68.
 12. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:13625-13630.
 13. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004;364:149-155.
 14. Huang AH, Chen YK, Chan AW, Shieh TY, Lin LM. Isolation and characterization of human dental pulp stem/stromal cells from nonextracted crown-fractured teeth requiring root canal therapy. *J Endod* 2009;35:673-681.
 15. Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G, Becchetti E, Marchionni C, Alviano F, Fossati V, Staffolani N, Franchina M, Grossi A, Bagnara GP. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation* 2005;80:836-842.
 16. Struys T, Moreels M, Martens W, Donders R, Wolfs E, Lambrichts I. Ultrastructural and immunocytochemical analysis of multilineage differentiated human dental pulp- and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs* 2011;193:366-378.
 17. Ichinose S, Muneta T, Koga H, Segawa Y, Tagami M, Tsuji K, Sekiya I. Morphological differences during *in vitro* chondrogenesis of bone marrow-, synovium-MSCs, and chondrocytes. *Lab Invest* 2010;90:210-221.
 18. Huang GT, Sonoyama W, Chen J, Park SH. *In vitro* characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res* 2006;324:225-236.
 19. Song SY, Jung JE, Jeon YR, Tark KC, Lew DH. Determination of adipose-derived stem cell application on photo-aged fibroblasts, based on paracrine function. *Cytotherapy* 2011;13:378-384.
 20. Kim NR, Lee DH, Ahn SJ, Lee IS, Yang HC. The differentiation-inducing effect of conditioned media obtained from dental pulp cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107:e54-59.
 21. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315-317.
 22. Ahrens PB, Solursh M, Reiter RS. Stage-related capacity for limb chondrogenesis in cell culture. *Dev Biol* 1977;60:69-82.
 23. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:5807-5812.
 24. Nam H, Lee G. Identification of novel epithelial stem cell-like cells in human deciduous dental pulp. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;386:135-139.
 25. Choi KM, Seo YK, Yoon HH, Song KY, Kwon SY, Lee HS, Park JK. Effects of mechanical stimulation on the proliferation of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Biotechnology and Bioengineering* 2007;12:601-609.
 26. Han MJ, Seo YK, Yoon HH, Song KY, Park JK. Effect of mechanical tension on the human dental pulp cells. *Biotechnology and Bioengineering* 2008;13:410-417.
 27. Tanaka K, Iwasaki K, Feghali KE, Komaki M, Ishikawa I, Izumi Y. Comparison of characteristics of periodontal ligament cells obtained from outgrowth and enzyme-digested culture methods. *Arch Oral Biol* 2011;56:380-388.
 28. Mobasheri A, Csaki C, Clutterbuck AL, Rahmanzadeh M, Shakibaei M. Mesenchymal stem cells in connective tissue engineering and regenerative medicine: applications in cartilage repair and osteoarthritis therapy. *Histol Histopathol* 2009;24:347-366.