

치아의 치수 줄기 세포와 치주 인대 줄기 세포의 석회화와 분화에 PRP가 미치는 영향

조선대학교 구강생물학 연구소 및 2단계 BK21

이가영 · 문상원 · 박지영 · 박종태 · 이동설 · 김홍중 · 박주철*

I. 서 론

상실된 치아나 손상된 치아 주위 조직(periodontal tissue)의 재생을 위해 줄기세포를 접목시킨 조직공학(stem cell-based tissue engineering)에 관한 연구가 다양하게 진행되고 있다¹⁾. Sharpe 등²⁾은 외배엽성간엽(ectomesenchyme)을 대체하여 사용된 골수줄기세포(bone marrow stem cells)를 구강상피(oral epithelium)와 조직재조합(tissue recombination)을 시행하여 초기 치아 발생을 유도하였고 이를 콩팥주머니(renal capsule)에 이식하여 일정기간 경과 후 치아 구조가 형성되었음을 보고한 바 있다.

출생 후 줄기세포(postnatal stem cells)는 골수, 신경, 피부, 모낭(hair follicle), 골격근, 치수(dental pulp) 등 다양한 조직에서 얻을 수 있다³⁻⁹⁾. 치수에는 골모세포(osteoblast), 상아모세포(odontoblast), 신경유사세포(neuronal-like cells)로 분화할 수 있는 출생 후 줄기세포가 포함되어 있다. 치수에서 분리한 치아 치수 줄기세포(Dental pulp stem cells, DPSCs)를 면역반응이 억제된 생쥐(immunocompromised mice)에 이식하였을 때 상아질 유사 구조(dentin-like structure)가 형성되었음이 보고된 바 있다. 이는 DPSCs를 이용한 치아 재생 (tooth regenera-

tion)의 가능성을 암시한다⁹⁻¹¹⁾.

치주인대(periodontal ligament, PDL)는 백악모세포(cementoblast), 골모세포(osteoblast)로 분화할 수 있는 이형세포집단(heterogenous cell populations)을 포함하고 있다¹²⁻¹⁵⁾. PDL내의 다양한 세포 형태는 조직의 항상성(homeostasis) 유지와 치주조직의 재생을 가능하게 하는 전구세포(progenitor cells)의 존재를 암시한다^{12,16-18)}.

혈소판농축혈장(Platelet-Rich Plasma, PRP)은 손상된 조직에 고농도의 성장인자를 제공하는 자가 혈장(autologous plasma)으로써 원심분리기를 이용하여 밀도가 높은 적혈구층과 혈소판희석혈장(Platelet-Poor Plasma, PPP)층 사이에서 분리할 수 있다¹⁹⁻²⁰⁾. PRP는 혈소판유래성장인자(Platelet Derived Growth Factor, PDGF), 전환성장인자- β_1 (Transforming Growth Factor, TGF- β_1) 그리고 혈관내피성장인자(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)등과 같은 많은 성장인자를 함유하고 있으며, 또한 임상적으로는 PRP가 심장수술, 성형외과수술, 구강악안면치료에 있어서 골과 연조직재생을 강화시킨다고 보고된 바 있다²⁰⁻²²⁾. 한편 또 다른 보고에 있어서는 이러한 임상적으로 좋은 결과가 근본적으로 PRP의 역할에 의한 것인지에 대해 의문이 제기되고 있다²³⁾.

그러나 PRP가 직접적으로 세포에 미치는 영향에 대해서는 연구가 미흡한 상태이다. 보다 성공적인 임상적 적용을 위해서는, 세포학적 수준

* 교신저자.

** 이 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업 (03-PJ1-PG1-CH08-0001)의 지원에 의해 이루어진 것임.

에서 PRP의 역할에 대한 평가가 필요하다고 할 수 있다. 이에 본 연구에서는, 치아 치수 줄기세포와 치주인대 줄기세포의 분화에 있어서 PRP의 역할에 관하여 세포학적 수준에서 알아보고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 세포의 배양

본 실험에서는 전신질환이 없는 환자에게서 발치된 제3대구치로부터 일차배양 (primary culture)을 통해 얻은 치수세포와 치주인대 세포에서 줄기세포의 colony를 분리했다. 치아 치수 줄기세포 (Dental Pulp Stem Cells, DPSCs)와 치주인대 줄기세포 (Periodontal Ligament Stem Cells, PDLSCs)는 5% fetal bovine Serum (FBS, Gibco BRL, Rockville, USA)과 항생제 (Penicillin 100U/ml, Streptomycin 100µg/ml, Gentamycin 50µg/ml 및 fungizone 2.5µg/ml)가 함유된 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Gibco BRL, Rockville, USA)으로 배양하였다. 세포의 분화와 석회화를 유도하기 위하여 Dexamethasone, L-ascorbic acid(50µg/ml)와 β-glycerophosphate(10mM)을 첨가하였다. 이를 PRP를 첨가한 실험군 (PRP-)과 첨가하지 않은 대조군 (control-)으로 나누어 15일간 배양하였다.

2. PRP 준비

출생 후 6주된 수컷 쥐 5마리에서 혈액을 채득하여, Heparin 5ml을 첨가한 후 2회의 원심분리를 거쳐 PRP를 분리해 내었다. 먼저 3,200 RPM에서 원심분리 한 후 30ml주사기로 적혈구층을 제거하고 상부의 혈소판 감소 혈장층 (Platelet-Poor Plasma, PPP)과 buffy coat층만을 채득하여 새로운 시험관으로 옮겼다. 동일 원심분리기 5,200 RPM에서 5분간 원심분리하여 하층의 혈소판농축혈장층(Platelet-Rich Plasma, PRP)와 상층의 무세포혈장층(Acellular Plasma)이 형성되도록 하였다. 상층의 무세포혈장층을 제거하

고 약 5ml정도의 하층을 1시간 정도 방치한 후 균일하게 혼합하여 -79℃의 냉동실에 저장한 후 실험 즉시 녹여서 사용하였다.

3. 세포면역 형광 검색

두 가지 종류의 세포에서 배양액을 제거하고 1× PBS로 2회 세척한 후 4% PFA(Paraformaldehyde)로 실온에서 15분간 고정하여 다시 PBS로 5분간 3회 세척하였다. 0.15% Tronton X-100/PBS로 10분간 처리한 후 1% BSA (Bovine Serum Albumin)/PBS 용액을 사용하여 실온에서 30분간 Blocking처리하였다. 1% BSA/PBS 용액을 사용하여 1:100의 배율로 희석한 STRO-1 항혈청 (1차항체)으로 실온에서 1시간 30분 동안 처리하였다. PBS로 10분간 3회 세척한 후 PBS로 1:80배율로 희석한 Fluorescein anti-Rabbit IgG항체 (2차항체, Vector Lab, Burlingame, CA, USA)로 실온에서 1시간 30분 동안 처리하였다. PBS로 10분간 3회 세척한 후 VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (Vector Lab, Burlingame, CA, USA)로 봉입하여 Axioscope 멀티형광 현미경으로 관찰하였다.

4. 세포의 석회화 결절의 확인

두 가지 종류의 세포를 배양 0일, 5일, 10일, 15일 후에 1× PBS로 3회 세척하고 70% ethanol로 20분간 고정한 다음 0.1% NH₄OH가 함유된 1% Alizarin Red-S (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) 용액으로 염색하여 석회화 결절 형성 유무를 확인하였다.

5. RT-PCR분석

두 가지 종류의 세포를 배양 0일, 5일, 10일, 15일 후, Trizol reagent (Invitrogen life tech, califonia, USA)로 처리하여 Total RNA를 추출하였다. RT premix kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 first strand cDNA를 합성하고, DSPP, bone sialoprotein (BSP), alkaline phosphatase (ALP), type I collagen (type I Col),

Table 1. Nucleotide sequences of the primers used for RT-PCR

Protein	Primer sequence (5'-3')		Size(bp)
DSPP	Sense	AATGGGACTAAGGAAGCTG	1200
	Anti-sense	AAGAAGCATCTCCTCGGC	
SPARC	Sense	TAAGCTCACCGTCCACAAGC	420
	Anti-sense	CTTTCCTGAAACAGCCTCCC	
OC	Sense	CCACAGCCTTCATGTCCAAG	650
	Anti-sense	GGCAGAGAGAGAGGACAGGG	
ALP	Sense	ACGTGGCTAAGAATGTCATC	450
	Anti-sense	CTGGTAGGCGATGTCTTA	
Type I collagen	Sense	TGACGAGACCAAGAAGCTG	496
	Anti-sense	CCATCCAAACCACTGAAACC	
BSP	Sense	AAGAAAATGGAGACGGCGAT	494
	Anti-sense	CACCTGCTTCAGTGACGCTT	
GAPDH	Sense	ACCACAGTCCATGCCATCAC	452
	Anti-sense	TCCACCACCTGTTGCTGT	

osteocalcin(OC), osteonectin (SPARC; secreted protein acidic and rich in cystein) 및 control인 GAPDH의 특이적 primer를 이용하여 PCR을 시행하였다 (Table 1). PCR 생성물은 1.5% agarose gel에 전기영동하여 유전자 발현을 확인하였다.

III. 실험결과

1. 세포면역형광염색분석

STRO-1 항체를 반응시킨 후 형광 염료인 FITC로 증폭시킨 결과 배양한 두 종류의 세포에서 STRO-1 항체에 반응한 줄기 세포를 관찰할 수 있었다 (Figure 1).

2. Alizarin Red-S 염색 결과 분석

Control-DPSCs와 PRP-DPSCs는 배양 15일 동안, Alizarin-red S 염색된 석회화 결절이 보이지 않았다. 반면에 PRP-PDLSCs에서는 배양 15일에 Control-PDLSCs와 달리 석회화 결절이 많이 관찰되었다 (Figure 2).

3. RT-PCR 결과 분석

두 가지 종류의 세포를 15일간 배양하여 RT-PCR 분석을 한 결과는 다음과 같다 (Figure 3). 치아 치수 줄기세포에서는 유전자 중 DSPP의 발현정도에 차이를 보였다. 15일간의 배양기간 동안 5일, 10일, 15일 모두 대조군보다 PRP를 첨가한 실험군에서 강한 발현을 보였다. 그러나 DSPP 이외의 유전자 발현에서는 큰 차이를 보이지 않았다. 치주인대 줄기세포에서는 15일간의 배양기간 동안, 각 유전자의 발현에 있어서 실험군과 대조군의 뚜렷한 차이를 찾을 수가 없었다.

IV. 총괄 및 고안

최근 들어 조직형성(tissue formation)을 위해 안정된 분화를 유도할 수 있는 세포의 공급원으로 줄기세포에 관한 관심이 집중되고 있다. 성인의 치아에서 분리한 DPSCs가 in vitro에서 석회화 결절(calcified nodule)을 형성하였고 in vivo에서 상아질과 유사한 석회화 조직(mineralized tissue)을 형성하였음이 보고된 바

있다²⁴⁻²⁵). 또한 탈락 유치에서 얻은 줄기세포(Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth, SHED)는 임상적 적용의 잠재성과 쉽게 조직을 구할 수 있는 장점을 지녀 새로운 줄기세포의 공급원으로 기대되고 있다²⁶).

특성이 다른 세포를 분리하는 방법으로써 세포배양접시의 표면을 이용할 수 있는데, 골수세포(bone marrow cells)의 경우 바닥에 붙은 세포(adherent cell)는 기질세포(stromal cells)로, 그리고 붙지 않은 세포(non-adherent cells)는 조혈세포(hematopoietic cells)로 간주할 수 있다²⁷). 이와 같은 방법을 적용시켜서 치수와 치주인대 속에 포함되어 있는 줄기세포로부터 형성된 colony를 분리하였다. 치수 속에 포함되어 있는 치아 치수 줄기세포는 간엽성 줄기세포 표지인자(mesenchymal stem cells marker)인 STRO-1을 발현한다. 최근에 치주인대에서 치주인대 줄기세포(Periodontal ligament stem cells, PDLSCs)를 분리하였으며 또한 치주인대 줄기세포가 STRO-1을 발현함이 확인된 바 있다²⁸).

본 연구에서는 치수와 치주인대에서 얻어낸 세포에 STRO-1 항체를 반응 시킨 후 형광 염료인 FITC로 증폭시킨 결과 배양한 두 종류의 세포에서 STRO-1 항체에 반응한 줄기 세포를 확인할 수 있었다.

PRP, 혈소판농축액(platelet concentrate) 및 혈소판 겔내의 성장인자와 섬유소 전색제(fibrin sealants)를 조합 처리하면 골과 치주인대의 치유에 효과적이라고 보고된 바 있다²⁹). 또한 Danesh-Meyer 등³⁰)은 상악동 증대수술(sinus augmentation surgery)시 자가골과 PRP를 조합처리하면 상악동부위의 골 형성을 증가시키나 유의성은 없었다고 보고하였다. 이와 같이 임상적인 적용에 있어서 PRP의 역할에 대해서는 다양한 결과가 나타나고 있는 실정이며, 또한 임상적으로 좋은 결과가 근본적으로 PRP의 역할에 의한 것인지에 대해 의문에 제기되고 있다.

이에 본 연구에서는 치아 치수 줄기세포와 치주인대 줄기세포를 PRP를 첨가한 실험군(PRP-)과 첨가하지 않은 대조군(control-)으로 나누어 15일간 배양하였다. 그리하여 세포학적

수준에서 PRP의 역할에 대해 알아보고자 DSPP, BSP, ALP, type I collagen, OC, SPARC의 유전자 발현을 RT-PCR을 통하여 조사하였다.

DSPP는 상아질에서만 특이하게 발현되는 유전자로 알려져 있는데 하나의 유전자에서 dentin phosphoprotein (DPP)과 dentin sialoprotein (DSP)이 합성되어 따로 분비된다³¹). BSP 유전자는 기본적으로 석회화 결합조직에 제한적으로 발현되며 골, 치아, 백악질형성 초기에 높게 나타난다³²). Osteocalcin은 골모세포, 상아모세포, 백악모세포의 성숙도, 분화 정도에 대한 지표가 되며 무기질 침착의 정도를 조절하는 유전자이다³³⁻³⁴). type I collagen은 골조직에서처럼 백악질에서도 가장 주요한 세포의 기질로서 기질의 구조를 결정하며 침착되는 무기질을 수용한다. ALP는 석회화가 일어나는 경조직에서 활성이 매우 높게 나타나며 Osteonectin(SPARC)은 칼슘결합기질 세포성 당단백질로서 세포와 세포의 기질과의 상호작용을 조절하는데 성장기의 골, 치아, 배아의 조골세포, 조상아세포, 연골주위 섬유아세포 및 분화기의 연골세포 등에서 고농도로 발현된다³⁵⁻³⁷).

본 연구에서는 치아 치수 줄기세포에서 유전자 중 DSPP의 발현 정도에 차이를 보였다. 15일간의 배양기간 동안 5일, 10일, 15일 모두 대조군보다 PRP를 첨가한 실험군에서 강한 발현을 보였다. 그러나 DSPP 이외의 유전자 발현에서는 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 Alizarin-red S 염색에서 Control-DPSCs와 PRP-DPSCs는 배양 15일동안, 된 석회화 결절이 보이지 않았다. 이는 PRP가 상아모세포의 분화에는 어느 정도 관여하는 것으로 추정된다. 그러나 석회화에 대해서는 세포의 배양기간을 15일 이상 더 진행해 본 후 그에 대한 평가가 필요하다고 여겨진다.

치주인대 줄기세포에서는 15일간의 배양기간 동안, 각 유전자의 발현에 있어서 실험군과 대조군의 뚜렷한 차이를 찾을 수가 없었다. 또한 Alizarin-red S 염색에서 PRP-PDLSCs에서는 배양 15일에 Control-PDLSCs와 달리 석회화 결절이 많이 관찰되었다.

이상의 결과로 볼 때, PRP가 상아모세포의 분

화에 관여할 가능성을 확인할 수 있다. 그러나 다른 유전자의 발현에 있어서는 특이한 변화가 없는 것으로 보아서 PRP의 역할에 대한 좀 더 정확한 세포학적 평가를 위해서는 동종의 혈액 추출, PRP의 적용 농도, 세포의 배양기간과 같은 요소들을 변화시킨 보완적인 연구가 필요하다고 사료된다.

V. 결 론

이 연구는 성공적인 임상적 적용을 위해 PRP의 역할에 대해 평가하고자 치아 치수 줄기세포와 치주인대 줄기세포의 분화에 있어서 PRP의 역할에 관하여 세포학적 수준에서 알아보고자 하였다. 연구 결과 치아 치수 줄기세포에 PRP를 첨가한 실험군에서 대조군보다 DSPP의 발현이 증가함을 확인할 수 있었다. 그리하여 PRP가 치아 치수 줄기세포의 상아모세포로의 분화에 관여함을 추측할 수 있었다. 그러나 보다 더 정확한 PRP의 역할을 알기 위해서는 다양한 임상적 결과를 토대로 실험의 방법적인 면에서 보완 연구가 필요하다고 사료된다.

참 고 문 헌

1. Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L : Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol.* 174:249-282, 2006.
2. Ohazama A, Modino SA, Miletich I, Sharpe PT : Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *J Dent Res.* 83:518-522, 2004.
3. Gage FH : Mammalian neural stem cells. *Science.* 287:1433-1438, 2000.
4. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 284:143-147, 1999.
5. Prockop DJ : Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues. *Science.* 276:71-74, 1997.
6. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T : Stem cells find their niche. *Nature.* 414:98-104, 2001.
7. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD : Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol.* 3:778-784, 2001.
8. Weissman IL : Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science.* 287:1442-1446, 2000.
9. 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.* 97:13625-13630, 2000.
10. Shi S, Gronthos S : Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res.* 18:696-704, 2003.
11. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S : Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 81:531-535, 2002.
12. Gould TR, Melcher AH, Brunette DM : Migration and division of progenitor cell populations in periodontal ligament after wounding. *J Periodontol Res.* 15:20-42, 1980.
13. McCulloch CA, Melcher AH : Cell density and cell generation in the periodontal ligament of mice. *Am J Anat.* 167:43-58, 1983.
14. McCulloch CA, Bordin S : Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. *J Periodontol Res.* 26:144-154, 1991.
15. Isaka J, Ohazama A, Kobayashi M, Nagashima C, Takiguchi T, Kawasaki H, Tachikawa T, Hasegawa K : Participation of periodontal ligament cells with regeneration of alveolar bone. *J Periodontol.* 72:314-323, 2001.
16. Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J : The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol* 2000. 13:20-40, 1997.
17. Boyko GA, Melcher AH, Brunette DM : Formation of new periodontal ligament by periodontal ligament cells implanted in vivo after culture in vitro. A preliminary study of transplanted roots in the dog. *J Periodontol Res.* 16:73-88, 1981.
18. Liu HW, Yacobi R, Savion N, Narayanan AS, Pitaru S : A collagenous cementum-derived attachment protein is a marker for progenitors of the mineralized tissue-forming cell lineage of the periodontal ligament. *J Bone Miner Res.* 12:1691-1699, 1997.
19. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR : Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 85:638-646, 1998.
20. Whitman DH, Berry RL, Green DM : Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 55:1294-1299, 1997.
21. Kassolis JD, Reynolds MA : Evaluation of the adjunctive benefits of platelet-rich plasma in subantral sinus augmentation. *J Craniofac Surg.* 16:280-287, 2005.
22. Philippart P, Daubie V, Pochet R : Sinus grafting using recombinant human tissue factor, platelet-rich plasma gel, autologous bone, and anorganic bovine bone mineral

- xenograft: histologic analysis and case reports. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 20:274-281, 2005.
23. Schmitz JP, Hollinger JO : The biology of platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg.* 59:1119-1121, 2001.
 24. Narayanan K, Srinivas R, Ramachandran A, Hao J, Quinn B, George A : Differentiation of embryonic mesenchymal cells to odontoblast-like cells by overexpression of dentin matrix protein I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:4516-4521, 2001.
 25. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S : Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 81:531-535, 2002.
 26. 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.* 100:5807-5812, 2003.
 27. Bianco P, Gehron Robey P : Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest.* 105:1663-1668, 2000.
 28. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S : Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 364:149-155, 2005.
 29. Soffer E, Ouhayoun JP, Anagnostou F : Fibrin sealants and platelet preparations in bone and periodontal healing. 1: *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 95:521-528, 2003.
 30. Danesh-Meyer MJ, Filstein MR, Shanaman R : Histological evaluation of sinus augmentation using platelet rich plasma (PRP): a case series. *Int Acad Periodontol.* 3:48-56, 2001.
 31. Butler WT, Ritchie H : The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *Int J Dev Biol.* 39:169-179, 1995.
 32. Ganss B, Kim RH, Sodek J : Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med.* 10:79-98, 1999.
 33. Ducy P, Schinke T, Karsenty G : The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science.* 289:1501-1504, 2000.
 34. Karsenty G : Role of Cbfa1 in osteoblast differentiation and function. *Semin Cell Dev Biol.* 11:343-346, 2000.
 35. Sage H, Vernon RB, Decker J, Funk S, Iruela-Arispe ML : Distribution of the calcium-binding protein SPARC in tissues of embryonic and adult mice. *J Histochem Cytochem.* 37:819-829, 1989.
 36. Sage EH, Bornstein P : Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. SPARC, tenascin, and thrombospondin. *J Biol Chem.* 266:14831-14834, 1991.
 37. Tremble PM, Lane TF, Sage EH, Werb Z : SPARC, a secreted protein associated with morphogenesis and tissue remodeling, induces expression of metalloproteinases in fibroblasts through a novel extracellular matrix-dependent pathway. *J Cell Biol.* 121:1433-1444, 1993.

Explanation of Figures

Fig 1. Morphology of the cells after 15 days culture (A: Control-DPSCs, B: PRP-PDLSCs C: Control-DPSCs, D: PRP-PDSLCS).

Fig 2. Immunofluorescence of the cells (A: PULP cells, B: PDL cells)

Fig 3. Expression of DSPP, BSP, ALP, Col I, OC and SPARC mRNAs during the-culture analysed by RT-PCR (A: DPSCs B: PDLSCs)

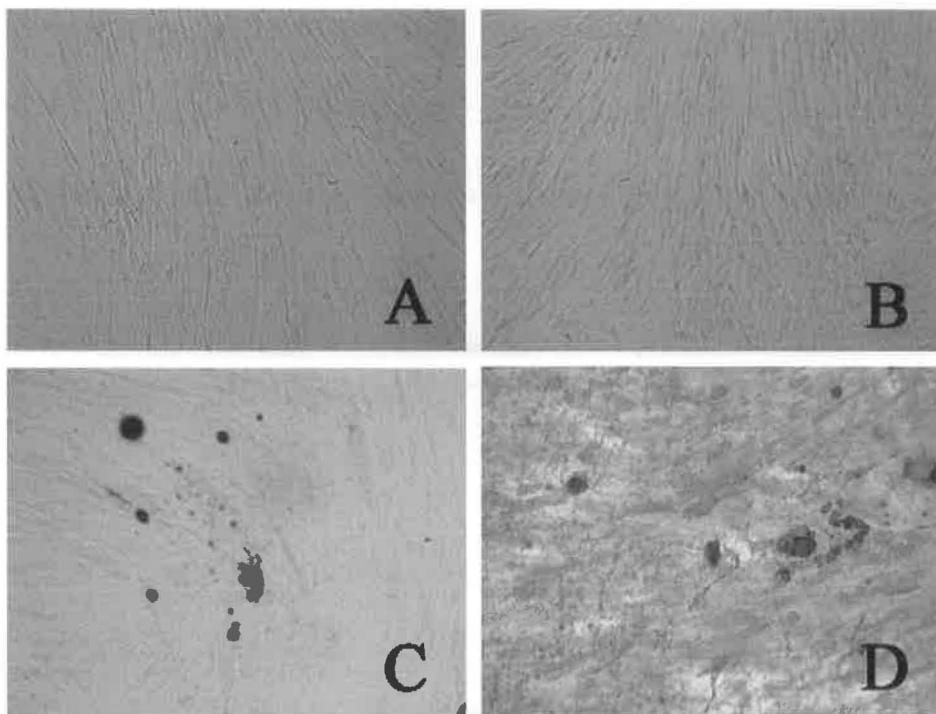


Fig. 1

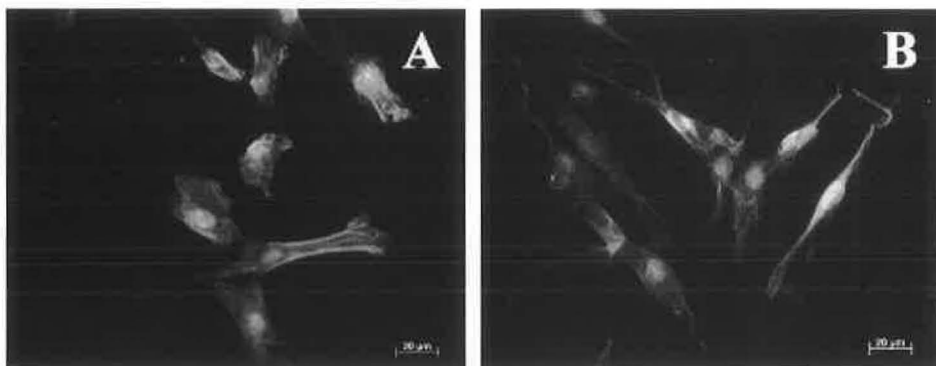


Fig. 2

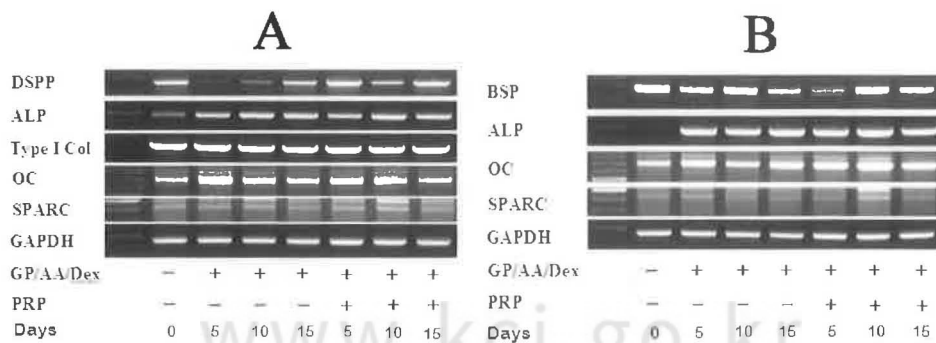


Fig. 3

- ABSTRACT -

The effect of PRP on the differentiation and mineralization of DPSCs and PDLSCs

**Ka-young Lee, Ji-young Park, Sang-won Moon, Jong-Tae Park,
Dong-seol Lee, Heung-Joong Kim, Joo-Cheol Park**

Oral Biology Research Institute, Chosun University and The second stage of BK21

I. INTRODUCTION

Tissue engineering using stem cell has been studied extensively in attempt to regenerate the lost tooth and/or damaged periodontal tissue. Although Platelet rich plasma (PRP) isolated from the blood has been applied to the implant surgery, the studies about the direct role of the PRP on the cell are not sufficient. To use PRP in clinic successfully, evaluation about effect of PRP on the cytological level is required.

II. PURPOSE

The purpose of this study was to investigate the roles of PRP during the differentiation of dental pulp stem cells (DPSCs) and periodontal ligament stem cells (PDLSCs) at cytologic and histologic level.

III. MATERIALS AND METHOD

1. Cell isolation & primary culture

Dental pulp cells and periodontal ligament cells were isolated from the exfoliated third molar of human who dose not have any systemic disease, respectively. The cells were divided into two groups ; PRP was added in one group experimental and was not added in the other group as a control. And the cells were cultured for 15 days.

2. PRP preparation.

After taking blood from the 5 rats (male, 6 weeks old), PRP was isolated from the blood with thrombin by the centrifugation method.

3. Immunofluorescence

Axioscope multi fluorescence microscopic observation was performed using STRO-1 antibody which is mesenchymal stem cell marker to identify the stem cells in the culture.

4. Alizarin-Red S staining

At the time of 0, 5, 10 and 15 days after the cell culture, the Alizarin Red-S staining was performed to evaluate the mineralization.

5. RT-PCR Analysis

At the time of 0, 5, 10 and 15 days after the cell culture, total RNA was isolated using Trizol reagent and the first strand cDNA was synthesized. And PCR was performed with the specific primers of DSPP, BSP, ALP, type I collagen, osteocalcin, osteonectin and GAPDH to evaluate the differentiation.

IV. RESULT

1. Analysis of Immunofluorescence

Several stem cells specific to STRO-1 antibody were observed through the FITC in DPSC and PDLSC.

2. Analysis of Alizarin Red-S staining

No mineralization was observed before the cultured 15 days in both control-DPSC group and PRP-DPSCs group. However, at the cultured 15 days, mineralization was observed in the PRP-PDLSCs group.

3. RT-PCR

- 1) In PRP-DPSCs group, expression of DSPP were increased compared to those of control group.
- 2) In PRP-PDLSCs group, expression of DSPP, ALP, osteocalcin were almost same compared to those of control group.

V. Conclusion

The result may suggests the functional role of PRP in the differentiation and mineralization of DPSCs by the increase of DSPP.