

사람치수줄기세포 조건배지와 범람모세포 조건배지가 사람치수줄기세포의 상아모세포 분화에 미치는 영향

¹서울대학교 대학원 치의학과, ²서울대학교 치과대학 구강조직학 교실

최 원 준¹, 박주철^{2*}

서 론

줄기세포는 지속적으로 세포 분열하고 새로운 세포로 분화하여 복잡한 조직이나 기관을 만들어낼 수 있는 능력을 가지고 있다. 구강 조직(예. 상아질, 치수 등)에 손상을 입었을 때 이러한 조직을 하는 치료 전략을 발전시키는데 치수줄기세포의 발견은 큰 역할을 하였다¹⁾. 치수줄기세포는 상아모세포, 연골세포, 지방세포, 신경세포로의 분화 잠재력을 가지고 있어 다양한 조직으로 분화될 수 있고 그 중 상아질-치수와 유사한 조직도 만들어낼 수 있다^{2,3)}. 이러한 치수줄기세포의 치아 조직으로의 분화능력은 상아질-치수 복합체의 재생을 위해 임상적으로 적용하는데 매우 유용할 수 있다. 손상된 상아모세포는 치수줄기세포로부터 분화된 새로운 상아모세포로 대

체되고 손상된 상아질은 새로운 수복 상아질로 대체된다. 이 때 치수줄기세포가 상아모세포로 분화하는데 주위의 성장 인자 등 상아질 기질로 분비되는 물질이 필요하다.

성장 인자는 세포의 성장, 증식 그리고 세포의 분화를 자극하는 물질이다. 이 물질은 단백질이나 스테로이드 호르몬이다. 이 물질은 세포 내외의 수용체에 결합하여 신호 전달을 시작하게 함으로써 세포 작용을 조절하는데 중요한 역할을 한다. 따라서 이러한 분자들은 줄기세포가 어떠한 조직으로 분화할지 줄기세포의 운명을 결정하고, 배아가 조직이나 기관으로 분화하는 것을 조절하는 역할을 한다^{1,6)}. 치수에 남아 있거나 상아질형성에 영향을 주는 성장 인자에는 vascular endothelial growth factor(VEGF), nerve growth factor(NGF), fibroblast growth factor, bone morpho-

* 교신저자

genic protein, transforming growth factor β 등이 알려져 있다⁴⁻⁸⁾.

최근 조건배지를 이용한 많은 연구가 진행되었다. 조건배지에는 다양한 효소, 성장 인자, 호르몬 등 세포가 분비하는 신호 물질을 함유하고 있다. 이 물질들은 세포 성장과 분화, 혈관 생성 등과 같은 역할을 한다⁹⁾. 이러한 물질들을 치수줄기세포에 처리했을 때 상아질-치수 복합체가 생성될 수 있는지 확인하는 것이 중요 할 것이다. 이러한 가능성은 dentin sialophosphoprotein(DSP) mRNA 와 같은 상아모세포 분화 표지자로 확인할 수 있을 것이다⁴⁾. 상아질-치수 복합체가 생성되기 위해서는 상아모세포가 매우 중요한 역할을 하기 때문이다. 또한 Bone sialoprotein(BSP) mRNA의 발현 정도를 확인하여 골모세포로의 분화 정도를 파악한다. 후에 조건배지의 proteomics method를 통해 치수 재생을 촉진할 수 있는 새로운 물질을 발견할 수 있는 기회를 얻게 될 것이다.

이 연구는 사람치수줄기세포에 조건배지를 *in vitro*로 처리하여 사람치수줄기세포의 상아모세포로의 분화를 촉진하는지를 확인해 보고자 한다. 사람치수줄기세포에 사람치수줄기세포 조건배지, 법랑모세포 조건배지 그리고 사람치수줄기세포 조건배지와 법랑모세포 조건배지를 혼합한 조건배지를 처리했을 때 상아모세포로의 촉진 정도를 파악한다. 이를 통해 사람치수줄기세포 조건배지가 법랑모

세포 조건배지를 처리한 사람치수줄기세포를 상아모세포로 분화시키는 능력을 상승시킬 수 있는지 파악하여 사람치수줄기세포가 상아모세포로 분화하기 위한 좋은 조건을 찾아내는데 도움을 주고자 한다.

실험방법

1. 세포 배양

1.1 사람치수줄기세포(human dental pulp stem cells, hDPSCs)

사람의 매복된 제3대구치에서 사람치수줄기세포를 분리한다. 멸균된 fissure bur로 백악법랑경계 주위를 절단하여 근관과 치수강에서 치수 조직을 겹자로 조심스럽게 제거한다. 이 추출물을 1mm³ 부피로 분쇄하고 100mm 배양 접시에 위치시킨다. 그리고 5% CO₂를 함유한 습윤 환경, 37°C 상태에서 100IU/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, 10% FBS(fetal bovine serum, Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA)를 첨가한 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco BRL)에서 배양한다¹⁰⁾.

1.2 법랑모세포

법랑모세포는 Dr. Toshihiro Sugiyama (Department of Biochemistry, Akita University of Medicine, Japan)가 제공하는 ALCs(ameloblast-lineage cells)를 이용한다¹¹⁾. ALCs는 5% CO₂를 함

유한 습윤 환경, 37°C 상태에서 100IU/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, 5% FBS가 첨가된 MEM(medium essential medium, Gibco BRL) 배지에 10ng/ml EGF(epithelial growth factor, R&D systems, Minneapolis, MN, USA)를 첨가하여 콜라겐이 코팅된 접시에서 배양한다.

2. 조건배지

2.1 사람치수줄기세포 조건배지 (hDPSC-CM)

사람치수줄기세포를 100mm의 콜라겐으로 코팅된 배양 접시에 접종하고 접시에 세포가 90%가 찰 때까지 DMEM 성장배지에서 배양한다. 1일 동안 배양한 후 모은 배지를 구멍 직경이 0.2 μm인 필터 (Nalgene, USA)로 여과한다. 여과한 배지를 사람치수줄기세포 조건배지로 사용한다.

2.2 법랑모세포 조건배지(AM-CM)

ALCs를 100mm의 콜라겐으로 코팅된 배양 접시에 접종하고 접시에 세포가 90%가 찰 때까지 50 μg/ml L-ascorbic acid(vitamin C), 10mM β-glycero-

phosphate를 포함한 DMEM 분화배지에서 배양한다. 분화 시작 일을 0일로 하고 분화 3일째에 PBS(Phosphate buffered saline)로 2회 세척하고 FBS와 EGF가 제거된 분화배지를 첨가하여 4시간 간격으로 3회 상청액을 모은다. 이를 구멍의 직경이 0.2 μm인 필터(Nalgene, USA)로 여과한 후 획득한 조건배지 200ml를 80g의 ammonium sulfate를 저온에서 반응시켜 단백질을 침전시키고, 침전된 조건배지는 PBS에 녹인 후, 저온에서 PBS로 투석하여, 염을 제거한다.

3. RNA 추출 및 realtime PCR

배양한 사람치수줄기세포에 다음과 같이 4가지 군으로 나누어 분화배지(대조군), 사람치수줄기세포 조건배지, 법랑모세포 조건배지, 사람치수줄기세포 조건배지와 법랑모세포 조건배지를 혼합한 조건배지를 첨가한다.

그룹 1~4 모두 분화 시작 0일, 3일, 7일, 10일 후에 총 RNA를 추출한다. 총 RNA는 제조사의 지시에 따라 TRIzol reagent(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 세포로부터 추출한다.

그룹 1 (대조군)	사람치수줄기세포 + DMEM(10% FBS, 100IU/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin 포함)
그룹 2	사람치수줄기세포 + 사람치수줄기세포 조건배지
그룹 3	사람치수줄기세포 + 법랑모세포 조건배지
그룹 4	사람치수줄기세포 + 법랑모세포 조건배지 + 사람치수줄기세포 조건배지

www.kci.go.kr

2 μ g의 총 RNA를 50 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 20 μ l 반응혼합물에서 0.5 μ g oligo d(T)와 1 μ l(50IU) Superscript III 효소(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 역전사하여 cDNA를 합성한다. 합성한 cDNA를 이용하여 그룹 1~4 모두 상아모세포 표지자인 DSPP primer와 BSP primer 그리고 항존유전자인 GAPDH primer를 첨가한 후 real time PCR을 실시한다.

Real time PCR은 제조사의 지침에 따라 SYBR GREEN PCR Master Mix (Takara Bio Inc. Otsu, Shiga, Japan)를 이용한 ABI PRISM 7500 sequence detection system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)으로 수행한다. PCR은 94 $^{\circ}$ C 상태에서 1분, 95 $^{\circ}$ C 상태에서 15초, 60 $^{\circ}$ C 상태에서 34초 순서로 40회 반복한다. 결과를 항존유전자인 GAPDH로 표준화한다. PCR 결과의 상대적인 차이는 comparative cycle threshold(C_T) method로 계산한다^{12,13)}.

4. 면역형광염색

면역형광염색을 위해 사람치수줄기세포를 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 4% paraformaldehyde에 고정한다. 세포는 1차 anti-CD44 항체(BD Pharmigen, San Jose, CA, USA)와 1차 anti-STRO-1 항체(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 하루 동안

처리한다. 1차 항체를 처리한 후 세포는 PBS로 세척하고 형광 표지된 2차 anti-mouse 항체(Invitrogen)를 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 어둠 속에서 배양한다. 세포의 핵을 확인하기 위해 DAPI(4', 6 diamidino-2-phenylindole, Sigma-Aldrich)를 이용한다. 세척 후에 세포는 공초점 레이저 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 확인한다.

실험결과

1. 줄기세포성 확인

줄기세포 표지자인 CD-44와 STRO-1이 발현되는 것을 면역 형광염색을 통해 확인하여 실험에 사용된 사람치수줄기세포의 줄기세포성을 확인하였다(Figure 1).

2. 사람치수줄기세포 분화에서 사람치수줄기세포 조건배지의 효과

사람치수줄기세포 자신이 분비한 물질이 사람치수줄기세포의 상아모세포 분화에 미치는 영향을 확인하기 위해 realtime PCR을 이용하여 상아모세포 분화 표지자인 DSPP mRNA와 골모세포 분화 표지자인 BSP mRNA의 발현량을 분석해 보았다. DSPP mRNA는 분화 3일 후, 10일 후에 대조군보다 발현량이 증가하였고 분화 10일 후 최대 발현량을 보였다. BSP mRNA는 분화 3일 후, 7일 후, 10일 후 모두 대조군에 비

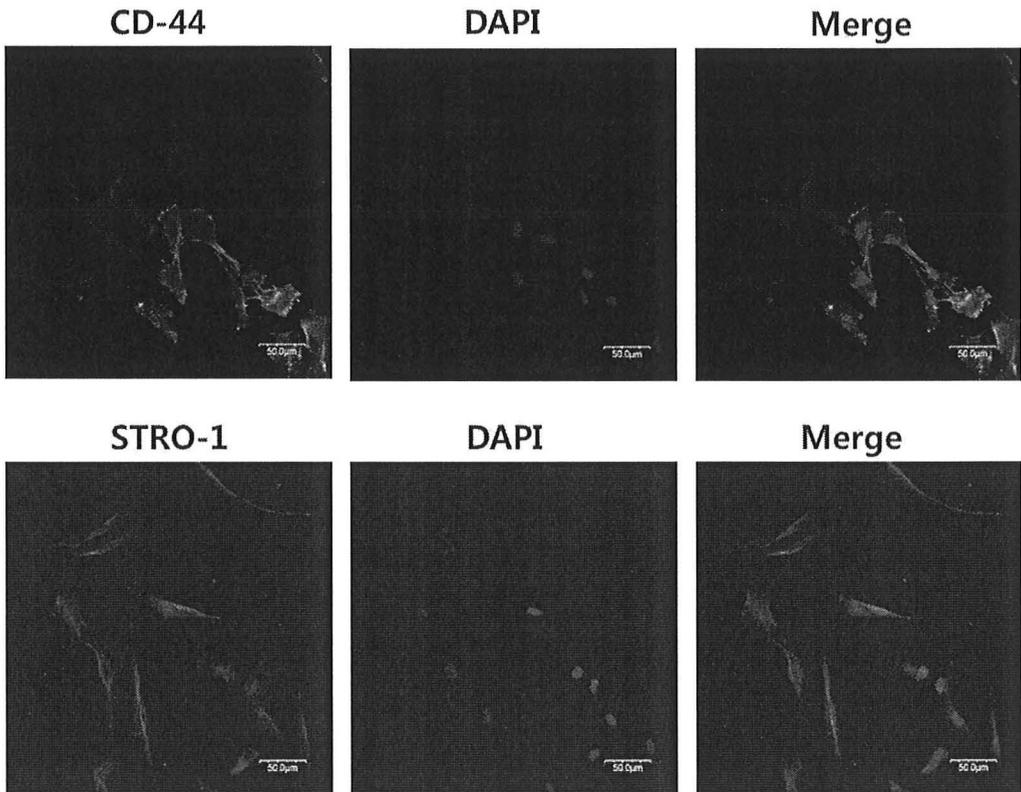


Figure 1. Immunofluorescence

Nuclei of hDPSCs were stained with DAPI. To investigate the stemness of hDPSCs, hDPSCs were immunostained with anti-CD-44 and anti-STRO-1 antibodies, both stem cell marker. Human DPSCs expressed CD-44 and STRO-1.

해 감소하였다(Figure 2, 3).

3. 사람치수줄기세포 분화에서 법랑모세포 조건배지의 효과

법랑모세포가 분비하는 물질이 사람치수줄기세포의 상아모세포 분화에 미치는 영향을 확인하기 위해 realtime PCR을 이용하여 상아모세포 분화 표지자인 DSPP mRNA와 골모세포 분화 표지자인 BSP mRNA의 발현량을 분석해

보았다. DSPP mRNA는 분화 3일 후, 7일 후, 10일 후 모두 대조군보다 더 많이 발현되었고 분화 10일 후 최대 발현량을 보였다. BSP mRNA는 분화 3일 후, 7일 후에 대조군보다 증가했으나 10일 후 감소하였다(Figure 2, 3).

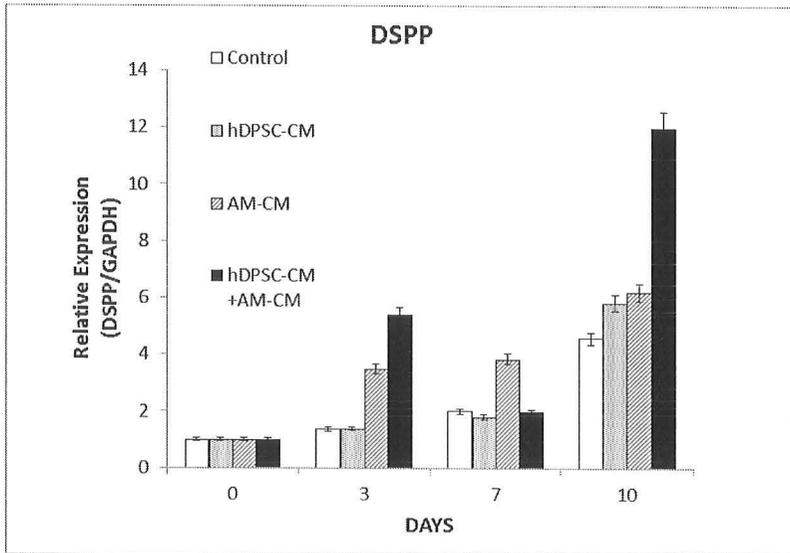


Figure 2. Effects of hDPSC-CM, AM-CM and combination of hDPSC-CM and AM-CM on the DSPP mRNA expression. Each of hDPSC-CM and AM-CM enhanced DSPP mRNA expression. The combination of hDPSC-CM and AM-CM had a synergic effect.

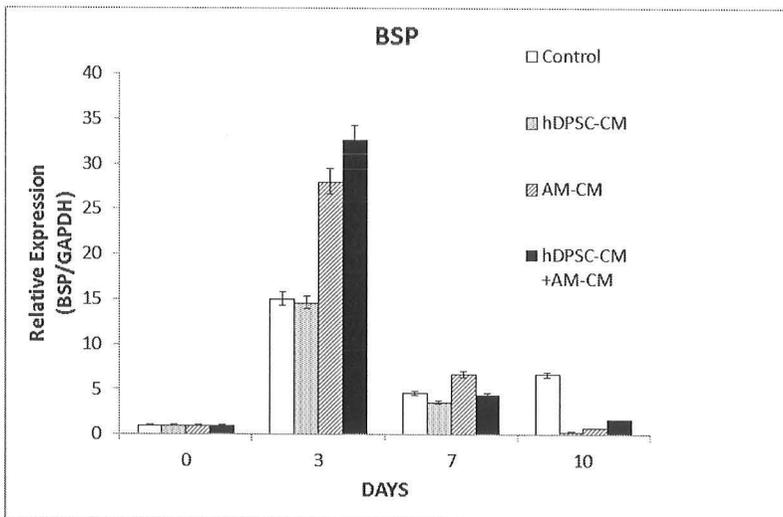


Figure 3. Effects of hDPSC-CM, AM-CM and combination of hDPSC-CM and AM-CM on the BSP mRNA expression. Both hDPSC-CM and AM-CM reduced BSP mRNA expression.

www.kci.go.kr

4. 사람치수줄기세포 분화에서 사람치수줄기 세포 조건배지와 법랑모세포 조건배지를 혼합한 조건배지의 효과

사람치수줄기세포 자신이 분비한 물질이 법랑모세포가 분비한 물질의 효과를 상승시키는지 확인하기 위해 realtime PCR을 이용하여 상아모세포 분화 표지자인 DSPP mRNA와 골모세포 분화 표지자인 BSP mRNA의 발현량을 분석해 보았다. DSPP mRNA는 분화 3일 후, 10일 후 모두 대조군보다 증가하였고, 분화 3일 후부터 10일 후까지 증가하는 양상을 보였다. 이 결과는 사람치수줄기세포 조건배지와 법랑모세포 조건배지를 각각 따로 처리하였을 때보다도 더 증가하였다. BSP mRNA는 분화 3일 후에 대조군보다 증가했으나 7일 후, 10일 후에는 감소하였다(Figure 2, 3).

고 찰

상아질 형성은 치아 발생 기간 동안에 신경 능선 세포에서 기원한 외배엽성중간엽 세포라고 불리는 배아의 결합조직으로부터 분화된 상아모세포에 의해 조절된다. 이러한 상아모세포의 분화는 상피-중간엽 상호작용에 의해 이루어진다^{15,16}. 치아 상피에서 법랑모세포의 유도 과정은 외배엽성중간엽 세포에서 상아모세포로 분화하는데 필수적이다¹⁷. 치아

발생 중에 치아 상피 근처의 치수 세포는 상아모세포로 분화하고 치수 근처의 상피세포는 법랑모세포로 분화한다¹⁸. 상아모세포와 법랑모세포가 분화할 때 그 사이에 얇고 구멍이 뚫린 여과지를 통해서도 상아모세포와 상호작용이 가능한 것을 볼 때 상아모세포의 분화 과정에서 필요한 물질들이 확산 가능하고, 잘 녹는 성질을 가지고 있다고 생각된다¹⁷.

조건배지는 secretome이라고도 한다. 이는 세포에서 분비하는 신호 물질을 포함하는 단백질들을 말하는데 세포를 배양하면서 얻어진 조건배지를 이용하여 생물학적 표지자를 발견하기 위한 실험에 많이 이용되고 있다⁹. 치매 세포의 조건배지도 치수줄기세포의 분화와 증식에 필요한 여러 물질들을 함유하고 있다는 연구도 있다¹⁵.

우리가 사용한 사람치수줄기세포는 제 3 대구치의 치수에서 얻은 추출물을 배양하여 사용하였다. 그 이유는 치아의 중간엽 줄기세포의 회복을 가능하게 하기 때문이다. 줄기세포의 세포 표면에는 CD44, STRO-1을 발현하고 있는데 이는 줄기세포의 표지자로 이용된다²¹. 면역형광을 이용하여 이 실험에 사용한 사람치수줄기세포가 줄기세포성을 갖고 있다는 것을 확인하였다.

Dentin sialophosphoprotein(DSPP)는 치아의 발생과 석회화에 관여하는 단백질 중에 하나로 상아모세포에서 많이 발현되고 상아모세포 분화 표지자로 사

용될 수 있다^{4,20}). DSPP는 다른 기관에서도 발견되지만 적은 수준이다. DSPP는 뼈에서보다 상아질에서 400배 이상 존재한다^{17,19}). Bone sialoprotein(BSP)은 뼈, 상아질, 백악질 등에도 발견되지만 상아질에서 보다 뼈에서 10배 이상 존재한다¹⁷).

상피세포와 중간엽세포의 상호 작용이 필수적이라는 것을 생각해 볼 때 사람치수줄기세포를 상아모세포로 분화시키는데 법랑모세포가 분비한 물질을 첨가시키면 분화가 더욱 촉진될 것이다. 이런 관점에서 전법랑모세포 조건배지와 apical bud cells(ABCs)로부터 얻은 조건배지는 *in vitro*, *in vivo*에서 모두 사람치수줄기세포를 상아모세포로 분화를 유도, 촉진한다는 것이 밝혀졌다¹⁷). 이 실험에서도 법랑모세포 조건배지를 사람치수줄기세포에 처리했을 경우 DSPP mRNA의 발현량이 증가하고 BSP mRNA의 발현량은 억제되는 것으로 보아 상아모세포의 분화를 일으킨다고 생각된다. 법랑모세포 조건배지를 만들 때 사용한 ameloblast-lineage cell은 법랑모세포의 특성을 가지고 있으며 법랑모세포로서의 실험적 도구로 유용하다¹¹).

사람치수줄기세포 조건배지는 자신이 분화할 때 분비하는 여러 신호 물질을 함유하는 것으로 사실 사람치수줄기세포 조건배지 없이 사람치수줄기세포 자신이 분화(대조군)할 때도 똑같은 신호 물질

이 분비되고 세포 분화를 일으킨다. 어떻게 보면 사람치수줄기세포가 분화할 때 자신이 분비한 물질을 추가적으로 첨가한 결과와 같다. 하지만 사람치수줄기세포 조건배지는 자가 유도 방식으로 세포 성장과 분화에 영향을 주는 잘 녹는 물질들을 분비하고 이것들은 사람치수줄기세포의 상아모세포 분화에 영향을 준다²²). 법랑모세포 조건배지와 사람치수줄기세포 조건배지를 동시에 처리해 주었을 때는 DSPP mRNA의 발현량이 증가하였는데 특히 분화 10일 후에 DSPP mRNA의 발현량이 상당히 증가하였다. 이를 통해 사람치수줄기세포 조건배지는 상아모세포로 분화를 촉진하는 작용을 한다는 것을 알 수 있다. 세포의 분화는 증식 과정은 거친 후 분화가 일어나는데 사람치수줄기세포 조건배지는 증식 과정에 법랑모세포 조건배지는 분화 과정에 영향을 주었을 것으로 생각된다.

치수 재생에 있어서 상아질의 합성은 중요한 의미를 지닌다. 또한 치수가 자극을 받았을 때 3차 상아질을 합성하여 일종의 치유과정을 거친다. 결론적으로 법랑모세포 조건배지와 사람치수줄기세포 조건배지를 혼합하여 사람치수줄기세포에 처리했을 경우 사람치수줄기세포가 상아모세포로 분화하는데 유용하고 치수 재생에 도움을 줄 것이다.

참고문헌

1. Luciano Casagrande, Mabel M. Conrdeiro, Silvia A. Nor, Jacques E. Nor, Dental pulp stem cells in regenerative dentistry, *Odontology*, 2011, 99:1-7
2. Koichiro Iohara, Li Zheng, Masataka Ito 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, 24:2493-2503
3. S. Gronthos, M. Mankani, J. Brahimi et al., Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo, *PNAS*, 2000 Dec 5;97(25):13625-13630
4. K. Iohara, M. Nakashima, M. Ito et al. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2, *J Dent Res*, 2009, 83(8):590-595
5. Szilvia Arany, Souichi Koyota, Toshihiro Sugiyama, Nerve growth factor promotes differentiation of odontoblast-like cells, *Journal of Cellular Biochemistry*, 2009, 106:539-545
6. Leticia Grando Mattuella, Leticia Westphalen Bento, Jose Antonio Poli de Figueiredo et al., Vascular Endothelial Growth Factor and Its Relationship With the Dental Pulp, *JOE*, 2007, 33:524-530
7. Hirotaka Ishimatsu, Chiaki Kitamura, Takahiko Morotomi et al., Formation of dentinal bridge on surface of regenerated dental pulp in dentin defects by controlled release of fibroblast growth factor-2 from gelatin hydrogels, *JOE*, 2009, 35:858-865
8. Richard D. Finkelman, Subburaman Mohan, John C. Jennings et al., Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II, and TGF- β in human dentin, *Journal of bone and mineral research*, 1990 Jul, 5(7):717-23
9. Paul Dowling, Martin Clynes, Conditioned media from cell lines: A complementary model to clinical specimens for the discovery of disease-specific biomarkers, *Proteomics*, 2011, 11:794-804
10. Hyun-Sung Jung, Dong-Seol Lee, Ji-Hyun Lee et al. Dire-

- cting the differentiation of human dental follicle cells into cementoblasts and/or osteoblasts by a combination of HERS and pulp cells, *J Mol Hist*, 2011, 42:227-235
11. Akira Nakata, Takashi Kameda, Hirokazu Nagai et al., Establishment and characterization of a spontaneously immortalized mouse ameloblast-lineage cell line, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 308:834-839
 12. Dong-Seol Lee, Jong-Tae Park, Hyun-Man Kim et al., Nuclear factor I-C is essential for odontogenic cell proliferation and odontoblast differentiation during tooth root development, *Journal of biological chemistry*, 2009, 284(25):17293-17303
 13. Kenneth J. Livak and Thomas D. Schmittgen, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2 Method, *METHODS* 2001, 25:402-408
 14. Mizuno M, Imai T, Fujisawa R, Tani H, Kuboki Y, Bone Sialoprotein (BSP) is a crucial factor for the expression of osteoblastic phenotypes of bone marrow cells cultured on type I collagen matrix, *Calcif Tissue Int*, 2000, 66(5):388-396
 15. Jinhua Yu, Zhihong Deng, Junhan Shi et al., Differentiation of dental pulp stem cells into regular-shaped dentin-pulp complex induced by tooth germ cell conditioned medium, *Tissue engineering*, 2006 Nov;12(11):3097-3105
 16. Victor E. Arana-Chavez, Luciana F. Massa, Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine, *Int J Biochem Cell Biol*, 2004 Aug, 36(8):1367-1373
 17. Ji-Hyun Lee, Dong-Seol Lee, Han-Wool Choung et al., Odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells induced by preameloblast-derived factors, *Biomaterials*, 2011, 32(36):9696-9706
 18. Thimios A. Mitsiadis, Daniel Graf, Cell fate determination during tooth development and regeneration, *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2009 Sep, 87(3):199-211
 19. Shigeki Suzuki, Taduru Sre-

- enath, Naoto Haruyama et al., Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization, *Matrix Biol.*, 2009 May, 28(4):221-229
20. William T. Butler, Jan C. Brunn, Chunlin Qin, Dentin extracellular matrix (ECM) proteins: comparison to bone ECM and contribution to dynamics of dentinogenesis, *Connect Tissue Res*, 2003, 44 Suppl 1:171-178
21. G. Bluteau, H-U. Luder, C. De Bari, T. A. Mitsiadis, Stem cells for tooth engineering, *European cells and materials*, 2008, 16:1-9
22. Na Ryoung Kim, Dong Hee Lee, Sug-Joon Ahn et al., The differentiation-inducing effect of conditioned media obtained from dental pulp cells, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2009 May, 107(5):e54-59

- ABSTRACT -

The effects of conditioned media obtained from human dental pulp stem cells and ameloblasts on odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells

Wonjun Choi¹, Joo-Cheol Park²

¹The Graduate School and ²Department of Oral Histology, School of Dentistry, Seoul National University

The differentiation ability of dental pulp stem cells(DPSCs) is clinically very useful for the regeneration of dentin-pulp complex. It is important to confirm that dentin-pulp complex is made when DPSCs differentiate with conditioned media(CM) including the signal molecules such as various enzymes, growth factors, hormones and so on. We can identify the odontogenic differentiation of DPSCs using an odontogenic marker such as dentin sialophosphoprotein(DSPP) mRNA. Because the role of odontoblasts is very important to develop dentin-pulp complex. This research is going to confirm whether treatments of conditioned media(CM) facilitate odontoblasts differentiation of human DPSCs *in vitro*. When human dental pulp stem cell CM (hDPSC-CM), ameloblast CM(AM-CM), the mixture of AM-CM and hDPSC-CM are treated to hDPSCs, we examine the capacity of odontogenic differentiation of hDPSCs.

Human DPSCs was explanted from human third molars. We cultured to differentiate hDPSCs with hDPSC-CM, AM-CM, the mixture of hDPSC-CM and AM-CM. Human DPSCs cultured without CM were control. They were divided into 4 groups. We differentiated hDPSCs for 0, 3, 7, 10 days and operated real time PCR using DSPP mRNA promoter as an odontogenic marker and BSP mRNA promoter as an osteogenic marker. Expression of DSPP mRNA on differentiation of hDPSCs with the mixture of hDPSC-CM and AM-CM increased than

control after 3, 10 days and increased than on differentiation of hDPSCs with hDPSC-CM, AM-CM respectively. Expression of BSP mRNA increased than control after 3 days but decreased after 7, 10 days.

Dentin formation is important meaning on pulp regeneration. When pulp exposes stimuli, pulp develops reparative dentin, which means a sort of regeneration. Conclusively, the mixture of hDPSC-CM and AM-CM improves the ability of odontogenic differentiation of hDPSCs and helpful to regenerate pulp.

Keywords: Dental pulp stem cell, ameloblast, odontoblast, conditioned media, odontogenic differentiation