

## 혈소판유래성장인자를 함유한 Chitosan/Calcium Metaphosphate의 골조직재생효과에 관한 연구

이승열<sup>1</sup> · 설영조<sup>1,2</sup> · 이용무<sup>1</sup> · 이주연<sup>3</sup> · 이승진<sup>3</sup> · 김석영<sup>4</sup>

구 영<sup>1</sup> · 류인철<sup>1</sup> · 한수부<sup>1</sup> · 최상묵<sup>1</sup> · 정종평<sup>1</sup>

<sup>1</sup>서울대학교 치과대학 치주과학교실 및 치학연구소, <sup>2</sup>성균관대학교 의과대학 치과학교실

<sup>3</sup>이화여자대학교 약학대학 물리약학교실, <sup>4</sup>영남대학교 공과대학 재료금속공학부

### I. 서론

치주질환에 의해 상실된 치주조직의 재생을 위하여 골 재생 및 새로운 부착재생에 대한 연구가 이루어져 왔으며, 보다 원활한 재생을 얻기 위하여 차단막이나 이식재의 사용 및 수술기술의 개발을 시도해왔다.

그중에서 가장 흔히 사용되는 치주조직 재생술이 골이식술이라 할 수 있는데, 여기에 이용되는 재료로는 자가골, 동종골, 이종골 및 합성골이 있다. 지금까지 자가골 이식재가 골형성 유도능력이 뛰어나다고 되어있지만, 부가적인 수술부위가 필요하고 충분한 양의 이식재 채취가 어려운 점이 있으며, 동종골 이식재는 질병 전이의 가능성과 골재생전에 흡수가 잘 된다는 단점이 있다<sup>2,4</sup>. 또한 이종골 이식재는 면역반응과 조직거부의 위험 때문에 사용이 회피되고 있다. 이러한 문제들을 보완하여 개발된 인공합성골을 많이 사용하고 있는데<sup>5-13</sup>, 이들은 충분한 양을 얻을 수 있음은 물론 질병의 전염가능성도 매우 적은 것으로 보고되고 있지만, 역시 신부착을 증진시키는 능력이 떨어지고, 입자들이 주로 결합조직에 의해 둘러싸이게 되어 진정한 의미의 골유도성은 부족한 재료로 되어있다<sup>4</sup>. 따라서 위에 열거한 이식재의 단점을 보완할, 골친화성이 보다 우수하고 적절한 시기에 흡수되어 재생골로 치환될 수 있는 흡수성 골이식재가

필요한 상황이다.

최근들어 조직공학적 개념의 조직재생시술방법이 소개되고 있는데, 이는 재생하고자 하는 조직에서 세포를 분리, 배양하고 이를 적절한 생체재료에 접종하여 배양함으로써 인공적으로 조직을 형성하는 기술이다<sup>15</sup>. 이를 위해서는 세포를 접종, 배양할 세포지지체가 필요한데 이는 조직적합성이 뛰어나고 세포접착성이 우수한 생체재료라야 한다. 조직공학기술을 이용한 골 형성에 사용하는 세포들은 골막 유래세포, 골수간질 유래세포, 백서 태자의 두개관 유래세포 등이 있는데, 세포들의 배양과정 중에 세포의 형질유지가 어렵기 때문에 태생 혹은 신생 개체의 골에서 얻은 세포를 배양에 많이 사용하고 있다. 세포지지체를 이용하여 실험실적으로 조직공학적 골 형성을 시도한 여러 연구들이 있는데, clonal osteogenic cell line MC3T3-E1을 3차원구조의 제 1형 교원질 matrix에 접종하고 56일간 배양하여 골양조직의 형성을 유도하였으며<sup>16</sup>, 다공성의 3차원적 poly (lactide/glycolide) /hydroxy apatite(PLGA/HA) polymer matrix에 쥐의 두개관 유래세포를 접종하고 배양하여 골아세포의 증식과 골 형성을 관찰하여 PLGA/HA matrix표면에 부착된 골아세포가 배양과정 중에 그 특징적인 형태를 유지하면서 증충으로 증식하여 골 기질을 형성함을 보고한 바 있다<sup>17</sup>. 또한 3차원구조의 poly (DL-lac-

\* 이 연구는 보건복지부 보건의료기술사업의 지원(HMP-99-E-10-0003)에 의한 것임

tide-co-glycolic acid) foam에 골수간질 유래세포를 접종하고 배양한 경우 골아세포의 염기성인산효소의 활성이 배양기간에 따라 증가하였고 골 기질이 형성되는 것이 관찰되었다<sup>18</sup>. 이외에도 세포가 접종된 세포지지체를 실험동물에 이식함으로써 의도적인 골 형성을 시도하려는 연구들이 계속되어 왔다<sup>19-24</sup>.

한편 치주영역에서도 조직공학적 접근방법으로 성장인자와 차폐막등을 이용하려는 연구들이 있었다. Boyko 등<sup>25</sup>이 최초로 조직공학적인 접근방법으로 치주인대의 재생을 확인한 바 있고, 개의 치주인대를 채취하여 배양한 후 인위적으로 야기한 골 결손부에 재이식하여 조직학적 관찰을 시행하였으며<sup>26</sup>, 치조골에서 배양한 세포를 재이식한 후 신생골 및 신생백악질 형성에 의한 신부착이 보고되었다<sup>27,28</sup>.

조직공학적 골 형성을 위한 3차원적 세포지지체로 많이 연구되어 온 재료중의 하나인 chitosan은 키틴을 고온의 강 염기로 처리하여 만들어진 키틴의 탈중합 및 탈아세틸화된 유도체이다. Chitosan은 생분해성 및 무독성의 천연 생중합체로서<sup>29</sup> 지혈촉진작용<sup>30,31</sup> 및 조직치유증진효과<sup>32</sup>가 있는 것으로 알려져 있다. Chitosan분말을 치주낭 및 발치와에 적용하여 좋은 임상효과를 얻었으며<sup>33</sup>, 토끼의 경골과 양의 대퇴골 파도에 형성된 골 결손부의 치유를 증진하였다고 보고된 바 있다<sup>34,35</sup>. 한편 골 치유효과의 증진을 위해 chitosan을 다른 재료와 혼합하여 이용하려는 시도들이 있었다. Chitosan 접착의 hydroxyapatite와 beta-tricalcium phosphate가 개발되어 치조골결손부의 충전을 위한 골이식재로 성공적으로 사용되었으며<sup>36-38</sup>, chitosan 접착의 hydroxyapatite로 충전된 골 결손부위의 방사선상에서 불투과성 골 회복을 확인하였다는 연구결과도 있다<sup>39</sup>. 또한 Klokkevold 등<sup>40</sup>은 chitosan이 골전구세포의 분화와 유주를 촉진하는 직접적인 작용뿐만 아니라, 골 형성을 방해하는 섬유아세포의 작용을 차단하는 간접적인 작용을 통해서도 골 형성을 촉진하는 효과를 보이는 것으로 보고하고 있다. Chitosan은 또한 여러 약제에 대한 조절성 방출기능이 있는 것으로 알려지고 있는데, 여러 연구자들에 의해서 항생제<sup>41-43</sup>, 성장인자<sup>44</sup>, 항염제<sup>45</sup> 및 여러 고분자약물<sup>46-49</sup> 등을 위한 국소약물송달체계로서 chi-

tosan기질을 이용한 시도들이 있어 왔다. Chitosan이 뛰어난 생접착성을 지니기 때문에 치주 및 구강점막 질환을 위한 약물송달체계로 사용될 수 있음이 보고되었고<sup>50</sup>, minocycline의 투여를 위한 국소약물송달체계로 chitosan 미소캡슐을 이용하여 성인형 치주염 환자에 효과적인 치료결과를 얻은 바 있다<sup>41</sup>.

Chitosan의 골이식재로서의 물성을 증진하고 골친화성 및 골전도성을 촉진시킬 목적으로 혼합하여 사용된 calcium metaphosphate(CMP)는 monocalcium phosphate를 열분해시켜 얻을 수 있는데 이것은 무기질 고분자로서 4개 이상의 동질이상이 있고 모두 [-O-P-O-]를 골격으로 하는쇄상구조를 갖는다. 이중에서쇄상의 길이가 가장 길고 생화학적으로 가장 안정한 β형의 CMP는 열처리 방법에 따라 비정질 혹은 결정질을 얻을 수 있고 제조방법에 따라 생분해 속도를 조절할 수 있다<sup>51,52</sup>. 가도의 골내에 이식한 연구에서 CMP는 파하 및 근조직내에서 서서히 분해되면서 주위조직과 잘 융화되어 그 주위로 골양조직이 침착되는 소견이 관찰되었으며<sup>53</sup>, CMP에는 세포부착이 잘 일어나고, 지지체상에서 세포의 분열도 활발하게 일어나므로 골조직형성을 위한 우수한 지지체가 될 수 있을 것이라는 연구결과도 있다<sup>54</sup>. 또한 Baksh 등<sup>55</sup>도 CMP block이 골형성을 위한 지지체로 성공적으로 이용될 수 있음을 보고하였다.

성장인자는 창상치유과정에서 일어나는 여러가지 세포활동을 자극하여 세포에 대한 이동과 증식, 기질의 합성에 영향을 미치는 생물학적 매개체이다. 이중 혈소판유래성장인자는 높은 양전하를 띠는 2개의 긴 폴리펩타이드사슬이 sulfide bond로 연결된 이중체 단백질로서 분자량이 28-35KDa에 이른다. 2개의 서로 다른 PDGF polypeptide가 존재하며 이들은 서로 다른 유전자로부터 유래되나 56%정도의 유사부분을 보이고, 개별적으로 조절되는 유전형질의 발현에 의해 3가지의 다른 이중체 즉, 동종 이중체인 PDGF-AA, PDGF-BB와 이종 이중체인 PDGF-AB가 존재한다<sup>56-58</sup>. 이들중 PDGF-BB는 섬유아세포의 디옥시리보핵산의 합성을 촉진시킨다고 알려져 있으며<sup>59</sup> PDGF를 IGF-1와 혼합하여 사용한 경우 실험동물에서 신생골 및 신생백악질의 형성이 증가하였다

<sup>60</sup>. 또한 PDGF는 치수, 치은 및 치주인대로부터 유래된 섬유아세포의 증식을 촉진하고<sup>61</sup>, 배양된 쥐의 치주인대세포에 적용시 세포증식, 화학주성, 교원질 합성을 증가시킨다는 연구결과도 있으며<sup>62</sup>, 사람의 치주인대세포에 주된 유사분열촉진인자로 작용하는 것으로 알려져 있다<sup>63</sup>.

따라서 이와 같은 효과를 가진 성장인자를 여러 약제에 대한 조절성 방출기능이 있는 것으로 알려진 chitosan에 함유시켜 사용한다면 치주조직 재생의 효과를 증진시킬 수 있을 것이다. 이에 본 연구에서는 골 형성을 위한 3차원적 세포지지체로 많은 연구가 진행된 chitosan과 CMP를 혼합한 후 혈소판유래성장인자를 함유시켜 PDGF-BB loaded chitosan/CMP스펀지를 제작한 후 골이식재 및 골형성을 위한 3차원적 세포지지체로서의 가능성을 평가하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. Chitosan/CMP 및 PDGF-BB loaded chitosan/CMP 스펀지의 제조

무수  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ 를 condensation하여 무결정의  $\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$ 를 얻고 이를 용융하고 냉각시킨 후 분쇄하여 CMP분말을 얻었다. Chitosan 분말(Showa Chemicals, Tokyo, Japan) 5g을 100ml의 1% acetic acid에 용해하여 chitosan 용액을 준비하였다. 3g의 CMP 분말을 100ml chitosan 용액에 혼합한 후 동결건조한 다음 tripolyphosphate와 교차반응을 시키고 다시 동결건조하여 다공성의 3차원적인 구조를 가진 chitosan/CMP 스펀지를 얻었다. 이 스펀지를 PDGF-BB(Genzyme Co, Cambridge, USA)용액에 담그고 하루경과 후 다시 동결건조하여 5 x 5 x 2mm 크기에 200ng의 PDGF-BB가 함유된 chitosan/CMP 스펀지를 제작하였다. 제작된 스펀지는 주사전자현미경(Jeol, USA)을 통해 미세구조를 관찰하였다.

### 2. 스펀지로부터의 PDGF-BB 방출량 측정

Chitosan/CMP 스펀지로부터 PDGF-BB의 방출량

을 측정하기 위해서  $^{125}\text{I}$ -labeled PDGF-BB를 사용하였다. 5  $\mu\text{Ci}$ 의  $^{125}\text{I}$ -labeled PDGF-BB를 non-radioactive PDGF-BB와 혼합하여 최종 radioactivity가 1  $\mu\text{Ci}$ 가 되게 한 후 각 스펀지당 200ng의 농도로 함유시켰다. 각 스펀지를 pH 7.4 phosphate buffer가 담긴 glass vial에 넣고 15rpm, 37°C의 shaking water bath에 둔채로 4주간 보관하며 방출된  $^{125}\text{I}$ -labeled PDGF-BB의 양을 gamma counter(Cobra II, Packard Instrument Company, CT, USA)를 이용하여 측정하였다.

### 3. 골아세포-스펀지 혼합체의 실험실 배양 및 관찰

#### 1) 백서태자 두개관 골아세포의 분리 및 배양

백서태자의 두개관 골아세포의 분리는 Bellows 등<sup>64</sup>이 제안한 기법을 이용하여 분리, 배양하였다. 태령 21일째의 백서태자를 모체로부터 무균적으로 적출하고 태자의 두부로부터 두개관을 절제하여 골막과 연조직을 제거하였다. 절제한 두개관은 수술용 가위로 세절한 후 0.1% collagenase(Sigma, St Louis, MO, USA)와 4mM EDTA에 용해된 0.25% trypsin(Gibco, Grand Island, NY, USA)이 함유된 혼합효소용액 1.5ml와 함께 37°C에서 자석교반기가 들어있는 Reacti-vial(Pierce, Rockford, IL, USA)에서 교반하면서 소화시켰다. 반응 10, 20, 30, 50 및 70분 후에 소화된 세포현탁액을 수집하고 동량의 ice-cold fetal bovine serum(FBS; Gibco)과 혼합하여 반응을 중지시켰다. 반응 50분 및 70분 후에 얻어진 세포현탁액을 모아 10분간 원심한 후 Hank's balanced salt solution(HBSS; Gibco)으로 세척하고 다시 원심하여 분리된 세포를 수집하여 배양하였다. 수집된 세포들은  $4 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>의 밀도로 35mm 조직배양접시에 10% FBS 및 1% antibiotic-antimycotic solution(Gibco)이 함유된  $\alpha$ -minimum essential medium( $\alpha$ -MEM; Gibco)으로 37°C의 온도 및 100% 습도조건에서 95%의 공기와 5% CO<sub>2</sub>를 계속 공급하면서 배양하였다.

## 2) 골아세포의 접종 및 세포-스펀지 혼합체의 실험실적 배양

원배양된 세포가 단일층의 밀생 배양상태가 되면 4mM EDTA에 용해된 0.25% trypsin-용액으로 세포를 탈리시킨 후 세포 부유액을 모아 10분간 원침하여 세포를 수집하였다. 수집된 세포는 혈구계산기로 수를 측정한 후 15% FBS, 1% antibiotic-antimycotic solution, 10mM Na  $\beta$ -glycerol phosphate(Sigma), 50  $\mu$ g/ml l-ascorbic acid(Sigma) 및  $10^{-7}$ M dexamethasone(Sigma)이 함유된  $\alpha$ -MEM으로  $5 \times 10^7$  cells/ml의 세포농도로 희석하였다. 30분전에 배지로 미리 습윤시킨 chitosan/CMP 스펀지 및 PDGF-BB loaded chitosan/CMP 스펀지를 24-well plates(Nunc, Rochester, NY, USA)에 넣고, 희석하여 준비된 20  $\mu$ l의 세포부유 농축액을 스펀지 상부에 떨어뜨려 스며들게 하는 방법으로 스펀지당  $10^6$  cells의 골아세포를 접종하였다. 골아세포가 스펀지에 잘 부착할 수 있도록 하기 위해 세포가 접종된 스펀지를 3시간 동안 조직배양기에서 전배양하고 1ml의 배지를 각 well에 첨가한 후 배양하였다. 배지는 배양 전기간 동안 매 2-3일 간격으로 교환하였다.

## 3) 세포증식률 측정

배양 1, 7, 14, 28일째에 각 well로부터 배지를 제거하고 배양된 세포-스펀지 혼합체를 수집하여 HBSS로 가볍게 세척하여 부착하지 않은 세포들을 제거한 후 4mM EDTA에 용해된 1ml의 0.25% trypsin으로 5분간 반응시켜 스펀지에 부착된 세포를 탈리시켰다. 이후에 HBSS를 이용하여 스펀지로부터 제거되지 않고 남아있는 세포들을 2회 더 세척하여 모은 후 trypsin/HBSS에 부유된 세포현탁액을 원침하여 세포들을 모아서 hemo cytometer를 이용하여 생활력이 있는 세포의 수를 측정하였다.

## 4) 염기성 인산효소(alkaline phosphatase, ALPase)의 활성 측정

각 스펀지에 접종, 배양된 골아세포들의 염기성 인산효소활성을 배양 1, 7, 14, 28일에 각각 측정하였다. 스펀지에서 분리된 세포들을 모아 0.5ml의 증류

수를 가한 수 1분간 얼음 위에서 초음파분쇄하고, 0.1ml의 세포 분쇄액을 0.1ml의 0.1M glycine-NaOH buffer, 0.1ml의 15mM para-nitrophenol phosphate(PNPP), 생리식염수에 용해한 0.1%의 Triton X-100 및 0.1ml의 증류수와 혼합하고 30분간 37°C에서 반응시켰다. 반응 후에 2.5ml의 0.1N NaOH를 첨가하고 얼음 위에서 방치하여 반응을 중지시키고 ELISA reader로 405nm에서 흡광도를 측정하는 방법으로 용액내에 생산된 para-nitrophenol(PNP)의 양을 정량하였다.

## 5) 배양된 세포-스펀지 혼합체의 조직학적 관찰

각 기간별로 배양된 세포-스펀지 혼합체를 광학현미경 및 주사전자현미경하에서 조직학적 관찰을 시행하였다. 각 배양기간별로 배양된 세포-스펀지 혼합체를 수집하여 세척한 후 glutaraldehyde로 고정하고 파라핀으로 포매하여 조직블록을 제작하였다. 준비된 조직블록으로부터 5  $\mu$ m의 두께로 절편을 얻어 hematoxylin-eosin 염색법으로 염색하여 광학현미경(Olympus BH-2, Olympus Optical Co., Osaka, Japan)으로 조직학적 관찰을 시행하였다. 또한 배양된 세포-스펀지 혼합체내에서 세포의 부착 및 증식과 형성된 조직의 3차원적 형태를 관찰하기 위하여 주사전자현미경하에서의 관찰을 시행하였다.

## 4. 백서 두개골 결손부에의 스펀지 이식 및 조직학적, 조직계측학적 관찰

### 1) 골 결손부의 형성 및 스펀지의 이식

평균체중이 250g 정도인 Sprague-Dawley 백서 36마리를 준비하고 ketamine(Ketarar 유한양행)을 30mg/kg의 용량으로 복강내 주사하여 마취를 유도하였다. 백서 두부의 털을 깎은 후 0.5% chlorhexidine으로 수술부위를 소독하였다. 수술중의 편리와 안정을 위해 백서의 머리를 두부고정기에 고정하고 전두골 앞쪽에서 후두골 후방부위까지 직선의 절개를 가한 후 피부 및 골막을 젖혀 두개골을 노출시켰다. 노출된 두개골의 정중부에 양측의 측두골을 포함하여 8mm 직경의 trephination drill(3i Implant

Innovation, Palm Beach Gardens, FL, USA)을 이용하여 뇌 손상을 주지 않도록 유의하면서 원형의 골 결손부를 형성하였다<sup>65</sup>. 형성된 골 결손부에 제작된 chitosan/CMP 스펀지 및 PDGF-BB loaded chitosan/CMP 스펀지를 1 x 1 x 1 mm의 크기로 세절하여 이식하고 골막과 피부를 각각 5-0 흡수성 봉합사와 4-0 수술용 silk(Ethicon, Somerville, NJ, USA)를 이용하여 봉합하였다. 대조군은 골결손부에 아무런 이식재도 이식하지 않고 봉합하였다. 각 실험군에 백서 6마리씩 할당하고 이식 2주 및 4주 후에 백서를 희생하여 치유과정을 조직학적으로 관찰하였다.

## 2) 조직표본의 제작 및 관찰

희생된 백서의 두부를 인접조직과 함께 절제한 후 중성 10% 포르말린 용액으로 고정하였다. 고정된 조직은 5% trichloroacetic acid로 탈회한 후 파라핀으로 포매하고 5  $\mu$ m 두께의 절편을 얻어 Masson trichrome 염색법으로 염색하여 조직학적 관찰을 시행하였다. 조직계측학적 관찰을 위해서 광학현미경으로 관찰된 영상을 영상분석 system(Image Acess Application, Bildanalys System AB, Stockholm, Sweden)이 내장된 컴퓨터의 화면에 video camera를 이용하여 재현한 후 재생된 신생골의 면적을 정량적으로 측정하였다.

## 5. 통계적 분석

통계적 분석을 위해서 모든 측정은 각 군당 6개체 이상 시험하였고, 각 측정값은 평균값  $\pm$  표준편차로 나타내었다. SPSS 8.0(SPSS, U.S.A.)을 이용하여 통계분석을 하였으며, 각 군간의 통계적 유의성 검정을 위해서 5% 및 1%의 유의수준으로 ANOVA를 시행하였고, 사후분석은 Tukey의 방법으로 실시하였다.

## III. 연구결과

### 1. 제조된 스펀지의 형태 및 물리적 특성

제조된 chitosan/CMP 및 PDGF-BB loaded chi-

tosan/CMP 스펀지를 주사전자현미경으로 관찰하였다(figure 1). 제조된 스펀지는 3차원구조의 다공성의 스펀지구조를 보이고 있었으며 평균 소공의 크기가 100-200  $\mu$ m 정도였다. 이 스펀지들은 건조된 상태에서는 부서지는 경향이 있으나 배지나 혈액으로 젖게 된 후에는 부드러워지고 약간 늘어나는 경향을 보였다.

### 2. 스펀지로부터의 PDGF-BB 방출량

스펀지로부터의 PDGF-BB 방출량은 1일째에 그 양이 가장 많았으며, 1주경과시까지 계속적인 방출을 보이다가 그 이후부터는 방출량이 줄어들었다(Figure 2). 200ng의 PDGF-BB를 함유한 스펀지의 경우 1일째에 약 100ng이 방출되었으며 그 후 일주일까지 하루에 5ng의 방출을 관찰할 수 있었다. 1주가 경과한 후부터는 방출량이 감소하였지만 2주후에도 하루에 1-2ng의 PDGF-BB가 방출되었다.

### 3. 골아세포-스펀지 혼합체의 실험실 배양결과

#### 1) 세포증식률

Chitosan/CMP 및 PDGF-BB loaded chitosan/CMP 스펀지에 접종되어 배양된 골아세포는 hemocytometer의 관찰에서 생활력이 확인되었고, 세포수 측정결과 배양기간이 경과함에 따라 배양 28일까지 지속적으로 증식하였다(Table 1, Figure 3). 접종후 배양 1일째에 chitosan/CMP 및 PDGF-BB loaded chitosan/CMP 스펀지에 부착되어 자라고 있는 골아세포의 수는 각각  $2.96 \times 10^4$  및  $4.22 \times 10^4$  cells/sponge로 나타났고, 이후 배양기간에 따라 지속적으로 증식하여 배양 28일째에  $10.64 \times 10^4$  및  $15.11 \times 10^4$  cells/sponge까지 증가하였다. 골아세포는 배양14일까지는 계속적인 증가경향을 보이다가 이후부터는 증식도가 떨어지면서 28일까지 성장속도가 둔화되는 경향을 보이고 있었으며 PDGF-BB loaded chitosan/CMP 스펀지의 경우에서 더 큰 증식률을 보였다.

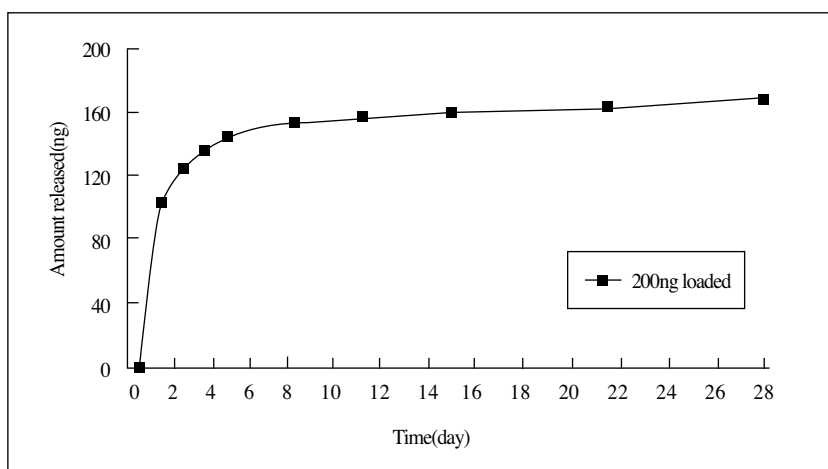


Figure 2. Release kinetics of <sup>125</sup>I-labeled PDGF-BB from chitosan/CMP sponge

Table 1. Cell proliferation in chitosan/CMP and PDGF-BB loaded chitosan/CMP sponge

Day	Number of cells(× 10 <sup>4</sup> /sponge)	
	chitosan/CMP sponge	PDGF-BB loaded chitosan/CMP sponge
1	2.96±0.73	4.22±0.91 <sup>#</sup>
7	7.36±2.30 <sup>**</sup>	9.84±0.96 <sup>**#</sup>
14	9.98±1.38 <sup>**</sup>	13.59±1.88 <sup>**##</sup>
28	10.64±1.96 <sup>**</sup>	15.11±0.95 <sup>**##</sup>

<sup>\*\*</sup>: P<0,01, as compared with 1 day in each group

<sup>#</sup>: P<0,05 and <sup>##</sup>: P<0,01, as compared with chitosan/CMP sponge

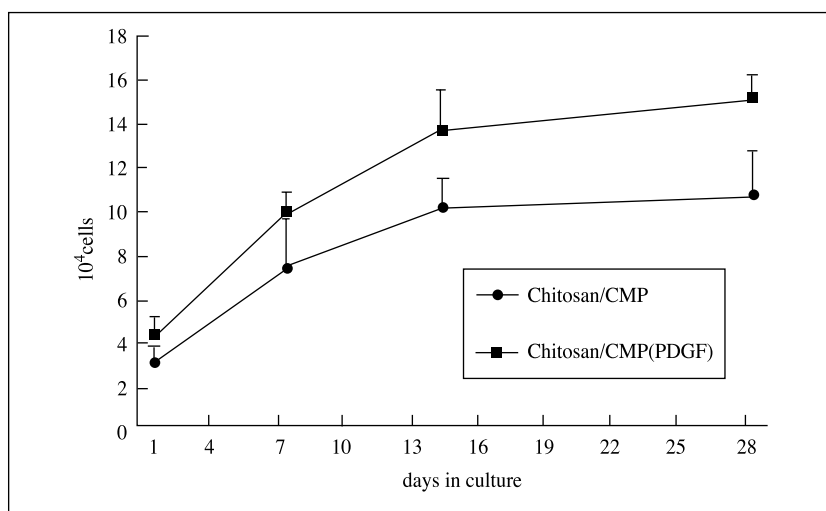


Figure 3. Cell proliferation in chitosan/CMP and PDGF-BB loaded chitosan/CMP sponge

## 2) 접종된 골아세포의 염기성 인산효소의 활성

Chitosan/CMP 및 PDGF-BB loaded chitosan/CMP 스펀지에 접종되어 배양된 골아세포의 염기성 인산효소의 활성은 배양 14일까지는 기간의 경과에 따라 지속적으로 증가하였으나 그 이후에는 증가량이 적었으며, 특히 PDGF-BB loaded chitosan/CMP 스펀지에 접종한 경우는 14일 이후에는 염기성 인산효소의 활성이 증가하지 않았다(Table 2, Figure 4). 배양 1일째에 골아세포의 염기성 인산효소의 활성은 chitosan/CMP 및 PDGF-BB loaded chitosan/CMP 스펀지에서 각각 3.71 및 4.92nM / 30min /  $10^4$  cell로 나타났고 이후 배양기간경과에 따라 지속적으로 증가하여 배양 14일째에는 7.19 및 8.01nM / 30min /  $10^4$

cell 까지 증가하였다. 전 배양기간동안, 염기성 인산효소의 활성은 PDGF-BB loaded chitosan/CMP 스펀지에 접종된 골아세포가 chitosan/CMP 스펀지에서 보다 높은 경향을 보였으나 배양 1일째를 제외하고는 통계적 유의성은 없었다.

## 3) 배양된 세포-스펀지 혼합체의 조직학적 소견

광학현미경과 주사전자현미경 관찰결과 각 스펀지에 접종된 골아세포는 스펀지 기질에 잘 부착하여 있었고 스펀지 전체에 비교적 골고루 분포되어 있었다(Figure 5, 6). 배양 14일째에는 부착된 세포의 수가 7일째에 비해 많아졌으며 방추형의 골아세포들이 중층으로 증식하면서 자라고 있음이 확인되었고

Table 2. ALPase activities of cells in chitosan/CMP and PDGF-BB loaded chitosan/CMP sponge

Day	ALPase activity(nM of PNP/30min/ $10^4$ cells)	
	chitosan/CMP sponge	PDGF-BB loaded chitosan/CMP sponge
1	3.71 $\pm$ 0.87	4.92 $\pm$ 0.52 <sup>#</sup>
7	5.61 $\pm$ 1.39 <sup>*</sup>	6.95 $\pm$ 1.22 <sup>**</sup>
14	7.19 $\pm$ 1.33 <sup>**</sup>	8.01 $\pm$ 2.17 <sup>**</sup>
28	7.84 $\pm$ 0.98 <sup>**</sup>	7.90 $\pm$ 1.77 <sup>**</sup>

\*: P<0.05 and \*\*: P<0.01, as compared with 1 day in each group

<sup>#</sup>: P<0.05, as compared with chitosan/CMP sponge

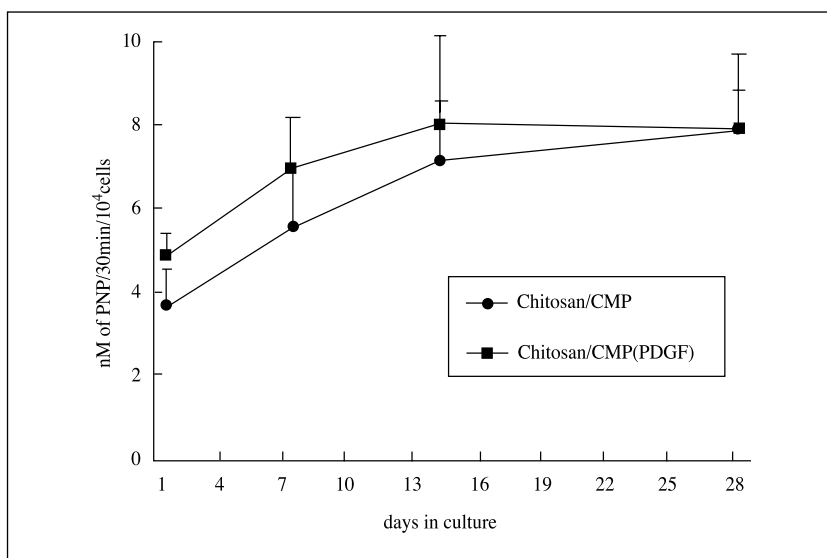


Figure 4. ALPase activities of cells in chitosan/CMP and PDGF-BB loaded chitosan/CMP sponge

Table 3. Area of new bone in rat calvarial defect

weeks	area of new bone( $\times 10^{-3}/\text{mm}^2$ )		
	control	chitosan/CMP sponge	PDGF-BB loaded chitosan/CMP sponge
2	139.33 $\pm$ 41.06	269.83 $\pm$ 78.43**	456.00 $\pm$ 65.89***
4	251.67 $\pm$ 92.03	518.17 $\pm$ 100.30**	706.33 $\pm$ 146.94***

\*\* : P < 0.01, as compared with control at each period

# : P < 0.05 and ## : p < 0.01 as compared with chitosan/CMP sponge

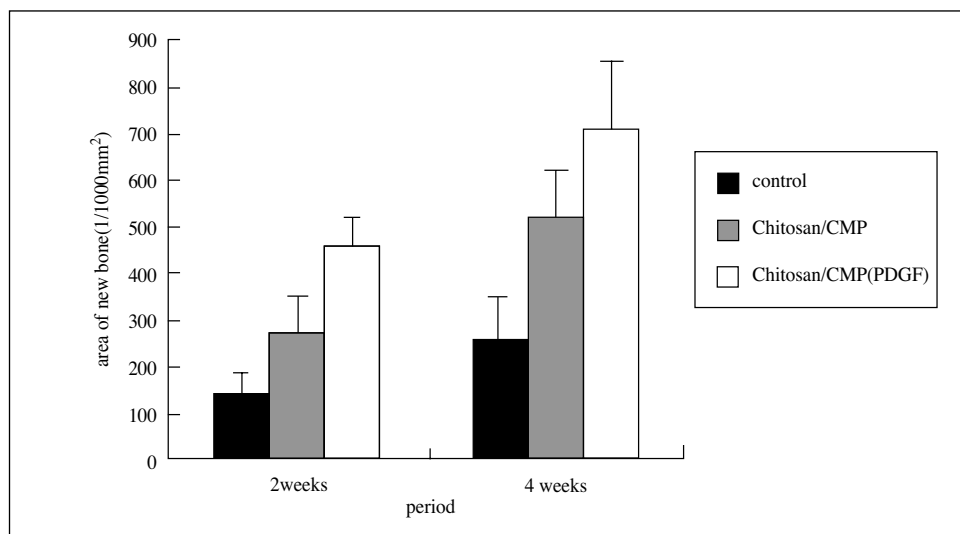


Figure 11. Area of new bone in rat calvarial defect

(Figure 7), PDGF-BB loaded chitosan/CMP 스펀지에서 상대적으로 더 많은 세포가 관찰되었다. 또한 이 시기에 이미 스펀지의 분해가 시작되었음을 알 수 있었다. 배양 4주째에는 스펀지의 분해가 상당히 진행되어 있었고, 스펀지에 부착된 세포들이 골질을 형성해가는 것이 관찰되었다(Figure 8).

#### 4. Chitosan/CMP 및 PDGF-BB loaded chitosan/CMP 스펀지가 백서 두개골 결손부 치유에 미치는 영향

백서의 두개골 결손부에 각 스펀지를 이식하고 2주 및 4주 경과 후의 조직학적 치유양상을 관찰하였다.

수술 2주 후 소견을 보면(Figure 9), 대조군의 골결

손부에서는 얇고 성근 결합조직으로 치유되고 있었으며, 결손부 말단에 아주 소량의 신생골이 나타나고 있을 뿐 별다른 신생골 재생의 소견을 보이고 있지 않았다. Chitosan/CMP 스펀지 이식군에서는 결손부 말단으로부터 신생골이 어느정도 자라나고 있었으며 이식된 스펀지는 이 시기에 이미 분해가 시작되었음이 관찰되었다. PDGF-BB loaded chitosan/CMP 스펀지 이식군에서는 결손부 말단으로부터 신생골이 활발히 자라나고 있었다.

수술 4주후의 소견을 보면(Figure 10), 대조군에서는 결손부 말단에 국한하여 일부 신생골들이 나타나는 것이 관찰된 반면, chitosan/CMP 스펀지 이식군에서는 결손부 말단에서부터 결손부 중심을 향하여 신생골들이 자라나고 있었으며 이식된 스펀지들은 분해가 계속 진행되고 있었다. PDGF-BB loaded chi-



tosan/CMP 스펀지 이식군에서는 결손부 말단으로부터 신생골이 활발히 자라나고 있었으며 결손부 내부에서도 두경막측으로부터 다양한 크기의 신생골들이 나타나고 있었고, 골양조직이 더 두텁게 형성됨이 관찰되었다.

조직계측학적 관찰결과(Table 3, Figure 11), 수술 2주 및 4주 후의 결과에서 모두 스펀지 이식군에서 대조군에 비해 높은 신생골 형성이 나타나는 것으로 계측되었으며, PDGF-BB loaded chitosan/CMP 스펀지 이식군에서 PDGF-BB unloaded chitosan/CMP 스펀지 이식군에 비해 유의하게 높은 신생골 형성이 관찰되었다.

#### IV. 총괄 및 고찰

본 연구에서는 골이식재 및 골 형성을 위한 3차원적 세포지지체로서의 가능성을 평가하기 위하여 chitosan/CMP 및 PDGF-BB loaded chitosan/CMP 스펀지를 제작하였다. Chitosan은 생분해성 및 무독성의 천연 생중합체로서<sup>29</sup> 지혈촉진작용<sup>30,31</sup> 및 조직치유증진효과<sup>32</sup>가 있는 것으로 알려져 있으며 3차원적 골형성 지지체로 연구된 바도 있다<sup>66</sup>. 또한 치유효과의 증진을 위해 chitosan을 다른 재료와 함께 혼합하여 이용하려는 시도들이 있었는데, chitosan 접착의 hydroxyapatite와 beta-tricalcium phosphate가 골이식재로서 유용하게 이용될 수 있을 것으로 제안된 바 있다<sup>36-39</sup>. 본 연구에서도 chitosan의 골대체 이식재로서의 물성을 증진하고 골친화성 및 골전도성을 촉진시킬 목적으로, 골형성을 위한 지지체로 성공적으로 이용될 수 있다고 보고된 바 있는<sup>55</sup> CMP를 혼합하여 사용하였다.

성장인자는 창상치유과정에서 일어나는 여러가지 세포활동을 자극하여 세포에 대한 이동과 증식, 기질의 합성에 영향을 미치는 생물학적 매개체로서, 그 농도에 비례하여 골세포의 화학조성과 증식을 증가시키는 것으로 알려져 있다<sup>63</sup>. 하지만 생체내에서의 분해속도가 빨라서 일정시간동안 적정농도를 유지하기가 어렵기 때문에 이전의 연구들에서는 고농도를 사용하였으며, 개에서의 연구를 통해 PDGF-BB의

반감기가 4.2시간이며 96%이상의 성장인자가 96시간 이내에 분해되었다고 보고된 바 있다. 따라서 효과적인 치료농도의 유지를 위해서는 PDGF-BB의 조절성 방출이 요구되며, 본 연구에서는 항생제나 성장인자등의 조절성 방출기능이 있는 것으로 알려진 chitosan에 함입시켜서 사용하였다. 예비실험결과 200ng PDGF-BB loaded chitosan/CMP 스펀지의 경우, 비록 24시간 이내에 비교적 많은 양인 50%의 PDGF-BB가 방출되긴 했지만, 2주가 경과한 후에도 1-2ng의 방출량을 유지함으로써 골재생을 촉진하기 위한 적절한 농도라고 생각되어 이 농도의 PDGF-BB가 함유된 스펀지를 제작하였다.

조직공학적 골 형성을 시도한 연구들에서는 골막 유래세포, 골수간질 유래세포, 태생 혹은 신생 백서의 두개관 유래세포 및 clonal osteogenic cell line 등 여러 가지 다양한 골형성세포들을 배양하여 이용하고 있다. 인공적 배양을 통한 골 형성을 위해서는 골아세포나 골세포들의 형질유지가 필수적인데 성장한 개체에서 얻은 세포들은 실험실적 배양조건하에서 이들의 고유한 형질을 장기간 유지하기가 매우 어렵기 때문에 많은 연구들<sup>17,66</sup>에서 태생 혹은 신생 개체에서 얻은 골세포들을 이용하고 있다. 이러한 이유에서 본 연구에서도 백서 태자의 두개관에서 분리, 배양한 골아세포를 적용하였다.

배양 중에 세포지지체에 접충한 골아세포의 형질유지 및 골 기질의 형성을 위한 또다른 중요한 인자로서 배지의 조성성분을 고려하여야 하는데, 이 연구에서는 골기질의 형성을 위하여 ascorbic acid,  $\beta$ -glycerophosphate 및 dexamethasone이 첨가된 배지를 사용하였다. Bellows 등<sup>64</sup>은 쥐의 태자 두개관 세포를 배양하여 골결절을 형성하기 위한 세 가지 조건을 제시하였는데, 단일층으로 성장하고 있는 세포들이 중층의 결절상으로 입체적인 배열이 가능하도록 장기간 배양하여야 하며, 교원질이 침착될 수 있도록 하기 위하여 배지에 ascorbic acid가 함유되어 있어야 하고, 유기인산의 제공원을 위해  $\beta$ -glycerophosphate를 배지에 첨가하여야 한다고 하였다. Dexamethasone은 골아세포의 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있고<sup>67</sup> PDGF와 함께 사용할 경우 치주

인대조직과 골조직형성을 증가시킨다고 보고된 바도 있다<sup>68</sup>. 하지만 dexamethasone이 PDGF의 작용을 억제시킨다는 연구결과도 있어<sup>69</sup> 본 연구에서 사용된 배지속에 첨가된 dexamethasone이 PDGF의 작용에 어떠한 영향을 미쳤다고 단언하기는 힘들었다.

본 연구에서 골아세포-스펀지 혼합체의 실험실적 배양결과, 배양기간의 경과에 따라 골아세포-스펀지 혼합체에서 골아세포의 증식과 염기성 인산효소의 활성증가가 확인되었다. 어떤 특정조직을 인공적으로 형성하기 위해서는 그 조직을 형성할 수 있는 특정세포가 그들의 고유의 형태와 형질의 변화 없이 세포지지체에 잘 부착되어 자랄 수 있어야하며, 특히 골아세포는 부착의존성 세포이고 3차원적으로 긴밀한 세포 상호간의 밀착이 있어야 골 형성을 시작할 수 있다고 알려져 있다<sup>64</sup>. 따라서 다공성의 3차원적 구조를 가지고 있어서 실제 생체 골조직내의 구조적 환경과 유사한 조건을 제공할 수 있고 골아세포들이 3차원적으로 배열하여 공간적인 성장을 할 수 있도록 스펀지가 고안되었으며, 배양된 세포-스펀지 혼합체의 조직학적 관찰결과 골아세포들이 스펀지 기질에 잘 부착하여 그 고유의 세포형태로 증충을 이루며 성장하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 골 형성을 위한 골아세포의 중요한 초기 형질발현인자로 알려져 있는<sup>70</sup> 염기성 인산효소의 활성이 증가한 것으로 보아 세포지지체에 접종된 골아세포들이 배양기간동안 골기질을 형성할 수 있는 그 고유의 생화학적 형질을 잘 유지하고 있다고 생각된다. 한편 PDGF-BB loaded chitosan/CMP 스펀지의 경우 chitosan/CMP 스펀지에 비해 골아세포의 증식정도와 염기성 인산효소의 활성이 상대적으로 큰 것으로 관찰되었는데, 이는 스펀지로부터 방출된 PDGF-BB가 골아세포의 이동과 증식에 영향을 미친 것으로 해석된다.

이전의 연구들<sup>66,71</sup>에서는 배양결과 골아세포들이 주로 세포가 접종된 스펀지의 상부를 중심으로 부착, 증식하는 것으로 관찰되고 있는데 이러한 양상은 스펀지 상부 쪽이 접종된 골아세포가 증식하는데 있어 더 양호한 환경이기 때문으로 보여진다. 즉 스펀지 상부에 골아세포부유액을 떨어뜨리는 방법으로 세

포를 접종하였기 때문에 스펀지 상부에서 골아세포의 밀도가 높고, 세포-스펀지 혼합체가 배양용기내의 배지에서 부유하여 배양되기 때문에 하부보다는 상부에서 더 많은 산소침투가 이루어질 수 있다. 따라서 스펀지의 상부 쪽이 세포의 증식과 조직형성에 더 양호한 조건이 되었을 것으로 생각된다. 본 연구에서도 스펀지 내부보다는 상부쪽에서 많은 세포증식이 관찰되었다. 하지만 이전의 연구들에 비해서 상대적으로 스펀지 전체에 더 골고루 세포의 부착과 증식이 일어나는 것이 관찰되었으며, 특히 spinner flask에서 배양된 경우는 오히려 스펀지 내부에서 더 많은 세포의 부착, 증식을 관찰할 수 있었다. 이는 spinner flask 배양의 경우, 스펀지 표면의 세포들이 배지에 의해서 씻겨 나갈 수 있는 등의 이유로 스펀지 내부에서의 세포증식조건이 상대적으로 나쁘지 않기 때문으로 생각된다. 조직공학적 측면에서 세포지지체에의 부착의 중요성을 감안할 때 스펀지상부에서의 골아세포의 부착과 증식도 그 의미를 부여할 수 있지만, 스펀지 전체에의 균일한 세포부착이란 측면에서 볼 때 이 연구에서 사용된 스펀지는 이전의 연구들에서 사용된 재료들에 비해서 장점을 가지고 있다고 할 수 있다.

또한 최근에는 세포지지체에 접종하는 세포의 수나 배양환경의 변화에 따른 결과를 비교한 연구들이 있었다. 접종시의 환경을 static과 dynamic의 두 가지로 나누고 배양시의 환경을 static, dynamic과 bioreactor의 세가지로 구분하여 실험한 결과<sup>72</sup> dynamic 상태에서 접종 후 bioreactor에서 배양한 경우에서 가장 좋은 결과를 얻었고, 접종시의 세포밀도에 따른 골조직 형성 변화를 관찰한 결과  $10^6$  cells/cm<sup>3</sup> 이상에서는 유의할 만한 차이를 나타내지 않았다고 보고되었다<sup>73</sup>. 본 연구에서는 스펀지마다  $10^6$ 개의 세포를 접종하였으며 static한 상태와 spinner flask에서 각각 배양을 실시하였다.

실험실적으로 어떠한 골조직을 형성한다고 하더라도 결국은 생체내에 이식되어야하기 때문에 골 형성에 사용되는 세포지지체 역시 기본적으로는 골조직내에서 생체친화성, 골전도성 및 생분해성에 대한 평가가 이루어져야 할 것이다. 이를 위해 본 연구에

서는 제작된 chitosan/CMP 및 PDGF-BB loaded chitosan/CMP 스펀지를 백서의 두개골 결손부에 이식하고 치유반응을 관찰함으로써 기본적인 골이식재로서의 가치를 평가하였다. 백서 두개골 결손부에서 이식된 각 스펀지의 조직학적 치유과정 관찰결과, 이들 두 스펀지는 별다른 이물반응이나 심한 염증반응 없이 분해되면서 신생골 형성을 촉진함이 관찰되었다. 따라서 이 재료가 골 형성을 위한 세포지지체로서의 요건을 충족할 뿐 아니라 골이식재로서도 기본적인 조건을 갖추고 있다고 할 수 있을 것이다. 또한 PDGF-BB loaded chitosan/CMP 스펀지를 이식한 경우 PDGF-BB unloaded chitosan/CMP 스펀지에 비해 골양조직이 더 두텁게 형성되었으며, 조직계측학적 분석결과 신생골 형성의 양도 더 많았는데, 이로 보아 chitosan/CMP 스펀지는 성장인자를 이용한 국소 약물송달장치로서의 역할도 수행할 수 있음을 알 수 있었다.

조직공학과 관련하여 몇몇 성장인자의 사용과 골 이식재 및 차폐막등의 사용에 관한 연구 등이 있긴 하지만, 치주영역에서의 조직공학적 접근방법의 시도는 아직 미미한 상황이다. 치주인대세포 및 치조골세포의 분리배양 후 재이식을 시도한 연구들<sup>25-28</sup>이 일부 시도되었지만, 이들 연구에서는 세포지지체에 대한 충분한 고려는 없이 단순히 배양한 세포를 그대로 이식하는 정도였다. 실험실적으로 세포를 배양하여 조직을 형성하고 이를 생체내에 재이식하여 치주조직을 재생하려는 시도가 이제는 필요할 때이다. 이를 위해서는 치주조직재생에 관여하는 각 세포들의 역할에 대한 정확한 이해가 필요하며, 또한 세포지지체의 형태나 표면변화에 의한 세포부착증대에 관하여 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## V. 결론

골이식재 및 골 형성을 위한 3차원적 세포지지체로 새롭게 개발된 chitosan/CMP 스펀지 및 PDGF-BB loaded chitosan/CMP 스펀지의 골형성능력을 연구하였다. PDGF-BB loaded chitosan/CMP 스펀지로 부터의 PDGF-BB 방출량은 1일째에 그 양이 가장 많

았으며, 2주후까지도 하루에 1-2ng의 PDGF-BB가 지속적으로 방출되었다. 골아세포가 접종된 스펀지의 배양결과 골아세포수와 염기성 인산효소의 활성은 접종후 배양시간경과에 따라 2주까지 지속적으로 증가하였는데 PDGF-BB loaded chitosan/CMP 스펀지가 PDGF-BB unloaded chitosan/CMP 스펀지에 비해서 높았다. 배양된 골아세포가 접종된 스펀지의 조직학적 관찰결과, 골아세포는 스펀지에 잘 부착하여 중층의 형태로 성장하였으며, 그 양은 PDGF-BB loaded chitosan/CMP 스펀지에서 더 많았다. 백서 두개골결손부에 이식된 스펀지는 별다른 이물반응 없이 분해되었으며 이식하지 않은 대조군에 비해 유의하게 높은 신생골 형성 효과를 나타내었다. PDGF-BB loaded chitosan/CMP 스펀지를 이식한 경우 골양조직이 더 두텁게 형성되었으며, 조직계측학적 분석결과 신생골 형성의 양도 더 많았다

본 연구의 결과, PDGF-BB loaded chitosan/CMP 스펀지가 골이식재로서 뿐만 아니라, 골 형성에 적용되는 골아세포의 배양을 위한 3차원적 세포지지체로 이용되어 골재생술식에 유용한 재료로 활용될 수 있음이 확인되었다.

## VI. 참고 문헌

1. Aukhil I, Simpson M, Schaberg TV : An experimental study of new attachment procedure in beagle dogs, J Perio Res 1983;18:643-654.
2. Mellonig JT, Bowers GM, Bright RW, Lawrence JT : Clinical evaluation of freeze-dried bone allograft in periodontal osseous defects, J Periodontol 1976;47:125-131.
3. Reynolds MA, Bowers GM : Fate of demineralized freeze-dried bone allografts in human intrabony defects, J Periodontol 1996;67:150-157.
4. Schallhorn RG : Present status of osseous grafting procedure, J Periodontol 1977;48:570-576.
5. Stahl SS, Froum SJ, Tarnow DP : Human clinical and histologic responses to the placement of HTR polymer particles in 11 intrabony lesion, J

- Periodontol 1990;61:269-274.
6. Yukna RA : Clinical evaluation of HTR polymer bone replacement grafts in human mandibular Class II molar furcations. J Periodontol 1994;65:342-349.
  7. Froum SJ : Human histologic evaluation of HTR polymer and freeze-dried bone allograft. A case report. J Clin Periodontol 1996;23:615-620.
  8. Louse F, Borghetti A : Clinical evaluation of natural coral implantation in osseous periodontal defects. Results after one year. J Parodontol 1991;10:69-76.
  9. Yukna RA : Clinical evaluation of coralline carbonate as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects. J Periodontol 1994;65:177-185.
  10. Carranza FA Jr, Kenny EB, Lekovic V, Talamante E, Valencia J, Dimitrijevic B : Histologic study of the healing of human periodontal defect after placement of porous hydroxy apatite implants. J Periodontol 1987;58:682-688.
  11. Baldock WT, Hutchens LH, McFall WT, Simpson DM : An evaluation of tricalcium phosphate implants in human periodontal osseous defects of two patients. J Periodontol 1985;56:1-7.
  12. Stahl SS, Froum SJ : Histologic evaluation of human intraosseous healing response to the placement of tricalcium phosphate ceramic implants. J Periodontol 1986;57:211-217.
  13. Zamet JS, Dabar UR, Griffiths GS, Bulman JS, Bragger U, Burgin W, Newman HN : Particulate bioglass as a grafting material in treatment of periodontal intrabony defects. J Clin Periodontol 1997;24:410-418.
  14. Garrett S : Periodontal regeneration around natural teeth. Ann Periodontol 1996;1:621-666.
  15. Vacanti CA, Vancanti JP : Bone and cartilage reconstruction with tissue engineering approaches. Otolaringol Clin North Am 1994;27:263-276.
  16. Casser-Bette M, Murray AB, Closs EI, Erfle V, Schmidt J : Bone formation by osteoblast-like cells in a three-dimensional cell culture. Calcif Tissue Int 1990;46:46-56.
  17. Laurencin CT, Attawia MA, Elgendy HE, Herbert KM : Tissue engineered bone regeneration using degradable polymers : The formation of mineralized matrices. Bone 1996;93S-99S
  18. Ishaug SL, Crane GM, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, Mikos AG : Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. J Biomed Mater Res 1997;36:17-28.
  19. Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI : Heterotopic osteogenesis in porous ceramic induced by marrow cells. J Orthop Res 1989;7:568-578.
  20. Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI : The origin of bone in composite grafts of porous calcium phosphate ceramic loaded with marrow cells. Clin Orthop Rel Res 1991;274-283.
  21. Nakahara H, Bruder SP, Goldberg VM, Caplan AI : In vivo osteochondrogenic potential of cultured cells derived from the periosteum. Clin Orthop 1990;259:223-232.
  22. Nakahara H, Goldberg VM, Caplan AI : Cultured-expanded human periosteal-derived cells exhibited osteochondral potential in vivo. J Orthop Res 1991;9:465-476.
  23. Puelacher WC, Vacanti JP, Ferraro NF, Schloo B, Vacanti CA : Femoral shaft reconstruction using tissue-engineered growth of bone. Int J Maxillofac Surg 1996;25:223-228.
  24. Breitbart AS, Grande DA, Kessler R, Ryaby JT, Fitzimmons RJ, Grant RT : Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured periosteal cells. Plast Reconstr Surg 1998;101:567-576.
  25. 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 Clin Periodontol* 1981;16:73-88.
26. van Dijk LJ, Schakenraad JM, van der Voort HM, Herkstroter FM, Busscher HJ : Cell-seeding of periodontal ligament fibroblast. A novel technique to create new attachment, A pilot study. *J Clin Periodontol* 1991;18:196-199.
  27. Lang H, Schuler N, Arnhold S, Nolden R, Mertens T : Formation of differentiated tissues in vivo by periodontal cell populations cultured in vitro. *J Dent Res* 1995;74:1219-1225.
  28. Lang H, Schuler N, Nolden R : Attachment formation following replantation of cultured cells into periodontal defects. A study in minipigs. *J Dent Res* 1998;77:393-405.
  29. Sanford PA : Chitosan: Commercial uses and potential applications. IN: Skjak-Braek G, Anthonsen T, Sanford P, eds. *Chitin and chitosan*. pp 51-70, Elsevier Applied Science, London, 1989.
  30. Kind GM, Bind SD, Staren ED, Templeton AJ, Economou SG : Chitosan: Evaluation of a new hemostatic agent. *Curr Surg* 1990;47:37-39.
  31. Klokkevold PR, Lew DS, Ellis DG, Bertolami CN : Effect of chitosan on lingual hemostasis in rabbit. *J Oral Maxillofac Surg* 1991;49:858-863.
  32. Muzzarelli RA, Baldassarre V, Conti F, Ferrara P, Biagini B : Biological activity of chitosan. *Biomaterials* 1988;9:247-253.
  33. Sapelli PL, Baldassarre V, Muzzarelli RA, Emanuelli M : Chitosan in dentistry. *Chitin in Nature and Technology* 1986;507-512.
  34. Muzzarelli RA, Mattioni-Belmonte M, Tietz C, Biagini R, Ferioli G, Brunelli MA, Fini M, Giardino R, Ilari P, Biagini G : Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. *Biomaterials* 1994;13:1075-1081.
  35. Muzzarelli RA, Zucchini C, Ilari P, Pugnali A, Mattioni-Belmonte M, Biagini G, Castaldini C : Osteoconductive properties of methylpyrrolidinone chitosan in an animal model. *Biomaterials* 1993;14:925-929.
  36. Ito M, Yamagishi T, Yagasaki H, Kafrawy AH : In vitro properties of a chitosan-bonded bone-filling paste : studies on solubility of calcium phosphate compounds. *J Biomed Mater Res* 1996;32:95-98.
  37. Ito M, Miyazaki A, Yamagishi T, Yagasaki H, Hashem A, Oshida, Y : Experimental development of a chitosan-bonded beta-tricalcium phosphate bone filling paste. *Biomed Mater Eng* 1994;4:439-449.
  38. Ito M : In vitro properties of a chitosan-bonded hydroxy apatite bone filling paste. *Biomaterials* 1991;12:41-45.
  39. Kawakami T, Antoh M, Hasegawa H, Yamagishi H, Ito M, Eda S : Experimental study on osteoconductive properties of a chitosan-bonded hydroxy apatite bone filling paste. *Biomaterials* 1992;13:759-763.
  40. Klokkevold PR, Vandemark L, Kenny EB, Bernard GW : Osteogenesis enhanced by chitosan(poly-N-acetyl glucosamin) in vitro. *J Periodontol* 1996;67:1170-1175.
  41. Yeom HR, Park YJ, Lee SJ, Rhyu IC, Chung CP, Nisengard RJ : Clinical and microbiological effects of minocycline-loaded microcapsules in adult periodontitis. *J Periodontol* 1997;68:1102-1109.
  42. Chandy T, Sharma CP : Chitosan matrix for oral sustained delivery of ampicillin. *Biomaterials* 1993;14:939-944.
  43. Giunchedi P, Genta I, Conti B, Muzzarelli RA, Conte U : Preparation and characterization of ampicillin loaded methylpyrrolidinone chitosan

- and chitosan microspheres. *Biomaterials* 1998;19:157-161.
44. Berscht PC, Nies B, Liebendorfer A, Kreuter J : Incorporation of basic fibroblast growth factor into methylpyrrolidone chitosan fleeces and determination of the in vitro release characteristics. *Biomaterials* 1994;15:595-600.
  45. Jameela SR, Kumary TV, Lal AV, Jayakrishnan A : Progesterone-loaded chitosan microspheres: a long acting biodegradable controlled delivery system. *J Controlled release* 1998;52:17-24.
  46. Polk A, Amsden B, De Yao K, Peng T, Goosen MF : Controlled release of albumin from chitosan-alginate microcapsule. *J Pharm Sci* 1994;83:178-185.
  47. Jameela SR, Misra A, Jayakrishnan A : Cross-linked chitosan microspheres as carriers for prolonged delivery of macromolecular drug. *J Biomater Sci Polym Ed* 1994;6:621-632.
  48. Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jato JL, Alonso MJ : Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene block copolymer nanoparticles as novel carriers for protein and vaccines. *Pharm Res* 1997;14:1431-1436.
  49. Aiedeh K, Gainsaid E, Orienti I, Zecchi V : Chitosan microcapsules as controlled release systems for insulin. *J Microcapsul* 1997;14:567-576.
  50. Needleman IG, Smale FC, Martin GF : An investigation of bioadhesion for periodontal and oral mucosal drug delivery. *J Clin Periodontol* 1997;24:394-400.
  51. Kim S : Bioresorbable calcium metaphosphate ceramics : I. Preparation and preliminary in vitro study. *Biomaterials Research* 1998;2:48-52.
  52. Lee J, Kim S : In transction of 5th World Biomaterials Congress, Toronto, May 1996, University of Toronto Press, Toronto,1996:53.
  53. Lee YM, Kim SY, Shin SY, KU Y, Rhyu IC, Chung CP : Biocompatibility and bone conductivity of porous calcium metaphosphate blocks. *J Kor Acad Periodontol* 1998;28:559-566.
  54. Seol YJ, Lee JI, Lee YM, Lim YT, Kim SY, Ku Y, Rhyu IC, Hahm BD, Han SB, Choi SM, Chung CP : Biological activities of calcium polyphosphate. *J Kor Acad Periodontol* 2000;30:213-228.
  55. Baksh D, Kim S, Davies JE : Three-dimensional matrices of calcium polyphosphates support bone growth in vitro and in vivo. *J Mater Sci Mater Med* 1998;9:743-748.
  56. Graves DT, Cochran DL : Mesenchymal cell growth factor. *Crit Rev Oral Biol Med* 1990;1:17-36.
  57. Graves DT, Cochran DL : Periodontal regeneration with polypeptide growth factors. *Curr opin Periodontol* 1994;178-186.
  58. Hammacher A, Hellman U, Johnson A : A major part of PDGF purified from human platelets is a heterodimer of one A and one B chain. *J Biol Chem* 1988;263:16493-16498.
  59. Centrella M, McCarthy TL : Platelet derived growth factor enhances deoxyribonucleic acid and collagen synthesis in osteoblast enriched cultures from fetal rat parietal bone. *Endocrinol* 1989;125:13-19.
  60. Lynch SE, Williams RC, Polson AM, Howel TH, Reddy MS, Zappa UE, Antoniadis HN : A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. *J Clin Periodontol* 1989;16:545-548.
  61. Rutherford RB, Trillsmith MD, Ryan HE, Charette MF : Synergistic effects of dexamethasone on platelet derived growth factor mitogenesis in vitro. *Arch Oral Biol* 1992;37:139-145.
  62. Matsuda N, Lin WL, Kumar M, Cho MI, Genco RJ : Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cell to polypeptide growth factors in vitro. *J*

- Periodontol 1992;63:515-525.
63. Oates TW, Rouse CA, Cochran DL : Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro. J Periodontol 1993;64:142-148.
  64. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JNM, Antosz ME : Mineralization bone nodules formed in vitro enzymatically released rat calvaria cell populations. Calcif Tissue Int 1986;38:143-154.
  65. Schmitz JP, Hollinger JO : The critical sized defect as an experimental model for cranio-mandibulofacial nonunions. Clin Orthop 1986;205:299-308.
  66. Lee YM, Park YJ, Lee SJ, Ku Y, Han SB, Choi SM, Klokkevold PR, Chung CP : Tissue engineered bone formation using chitosan/tricalcium phosphate sponges. J Periodontol 2000;71:410-417.
  67. Canalis R : Effect of glucocorticoid on type I collagen synthesis, alkaline phosphatase activity, and deoxyribonucleic acid content in cultured rat calvaria. Endocrinol 1983;112:931-939.
  68. Rutherford RB, Rysin ME, Kennedy JE, Tucker MM, Charette MF : Platelet derived growth factor and dexamethasone combined with collagen matrix induce regeneration of the periodontium in monkeys. J Clin Periodontol 1993;20:537-544.
  69. Lee JM, Suh JY, Kim SJ, Choi JI : The effects of combination of PDGF-BB and dexamethasone on differentiation of MC3T3-E1 cells. J Kor Acad Periodontol 2000;30:27-37.
  70. Boskey AL : Current concepts of the physiology and biochemistry of calcification. Clin Orthop 1981;157:225-257.
  71. Park YJ, Lee YM, Sheen SY, Chung CP, Lee SJ : Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration. Biomaterials 2000;21:153-159.
  72. Burg KJL, Holder WD, Culbertson CR, Beiler RJ, Greene KG, Loeb sack AB, Roland WD, Eiselt P, Mooney DJ, Halberstadt CR : Comparative study of seeding methods for three-dimensional polymeric scaffolds. J Biomed Mater Res 2000;51:642-649.
  73. Holy CE, Shoichet MS, Davies JE : Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds : Investing initial cell seeding density and culture period. J Biomed Mater Res 2000;51:376-382.

## 사진부도 설명

- Figure 1. Scanning electron micrograph of PDGF-BB loaded chitosan/CMP sponge x100. The sponge exhibits a 3-dimensional porous structure and the pore size is 100-200  $\mu\text{m}$ .
- Figure 5. Scanning electron micrograph of osteoblastic cells cultured for 1 day. A: Seeded cells (arrow) attach to the PDGF-BB loaded chitosan/CMP sponge (S). x400, B: early stage of cell attachment x5000 (Arrow indicates cell process, S sponge), C: late stage of cell attachment x3500.
- Figure 6. Cross sectional views through three-dimensional cultures of osteoblastic cells cultured for 7 days. Seeded cells (arrow) well attach to the sponges (S). A: chitosan/CMP sponge, hematoxylin and eosin stain, original magnification x100, B: PDGF-BB loaded chitosan/CMP sponge, hematoxylin and eosin stain, original magnification x100.
- Figure 7. Cross sectional views through three-dimensional cultures of osteoblastic cells cultured for 14 days. Seeded cells (arrow) firmly attach and proliferate to form multilayer of cells on the sponges (S). A: chitosan/CMP sponge, hematoxylin and eosin stain, original magnification x100, B: PDGF-BB loaded chitosan/CMP sponge, hematoxylin and eosin stain, original magnification x100.
- Figure 8. Cross sectional views through three-dimensional cultures of osteoblastic cells cultured for 28 days. Seeded osteoblastic cells form nodules of bone-like matrix on the sponges. A: chitosan/CMP sponge, hematoxylin and eosin stain, original magnification x100, B: PDGF-BB loaded chitosan/CMP sponge, hematoxylin and eosin stain, original magnification x100, C: Scanning electron micrograph of mineralized matrix on the PDGF-BB loaded chitosan/CMP sponge x200, D: Scanning electron micrograph of mineralized matrix on the PDGF-BB loaded chitosan/CMP sponge x800. (Arrow indicates mineralized matrix, S sponge)
- Figure 9. Histologic findings of calvarial defect sites at 2 weeks. A: Ungrafted control, figure illustrates one side of defect. Defect is filled with loose fibrous connective tissue, and there is no significant sign of new bone formation. Masson trichrome stain, original magnification x10. B: Defect grafted with chitosan/CMP sponge, figure illustrates one side of defect. Osseous tissues are growing from the edges of the defect. Masson trichrome stain, original magnification x10. C: Defect grafted with PDGF-BB loaded chitosan/CMP sponge, figure illustrates one side of defect. Significant regenerated new bone infiltrates from the edges of the defect. Masson trichrome stain, original magnification x5. (Arrow indicates original border of defect, NB new bone, OB calvarial bone, S sponge)
- Figure 10. Histologic findings of calvarial defect sites at 4 weeks. A: Ungrafted control, figure illustrates one side of defect. Limited bone repair localized to the defect border. Masson trichrome stain, original magnification x10. **B:** Defect grafted with chitosan/CMP sponge, figure illustrates one side of defect. The bone regeneration is increasing from the defect border. Masson trichrome stain, original magnification x10. **C:** Defect grafted with PDGF-BB loaded chitosan/CMP, figure illustrates one side of defect. The bone regeneration is increasing from the defect border, the amount of regenerated bone is larger than that of chitosan/CMP sponge. Masson trichrome stain, original magnification x10. (Arrow indicates original border of defect, NB new bone, OB calvarial bone, S sponge)



# 사진부도 (I)

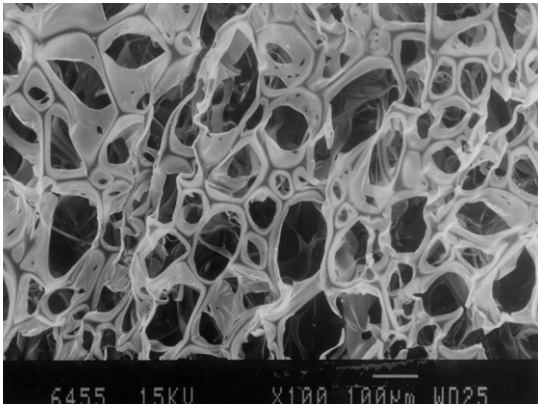


Figure 1

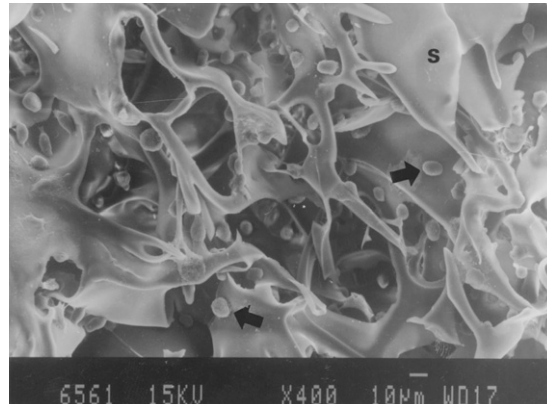


Figure 5A

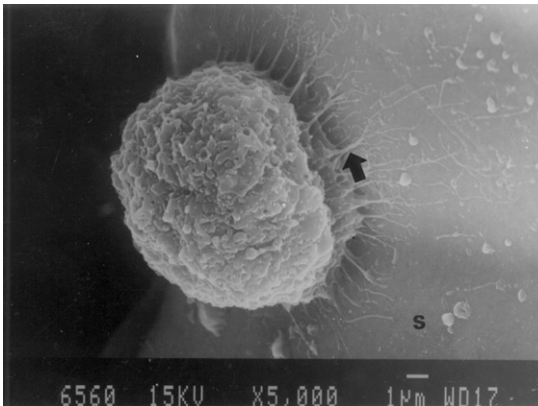


Figure 5B

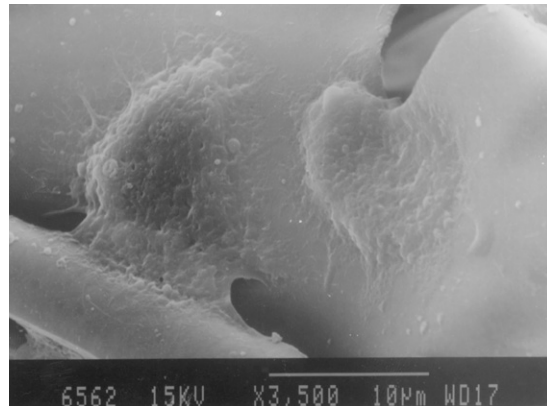


Figure 5C



Figure 6A



Figure 6B

## 사진부도 (II)

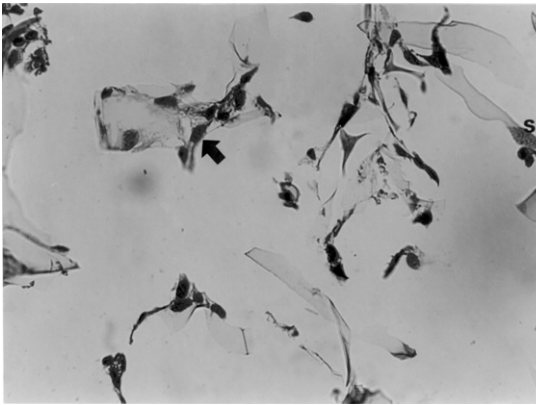


Figure 7A

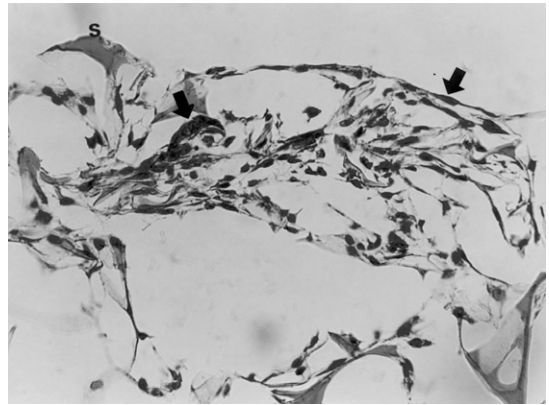


Figure 7B

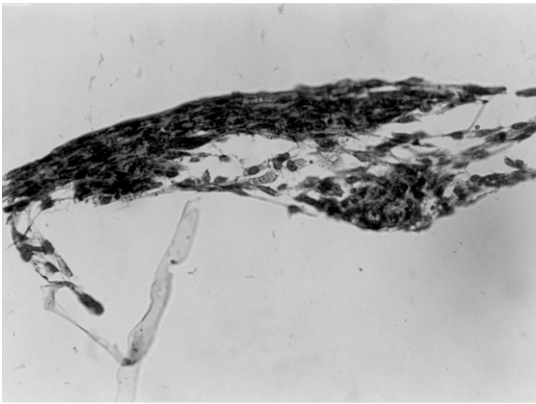


Figure 8A

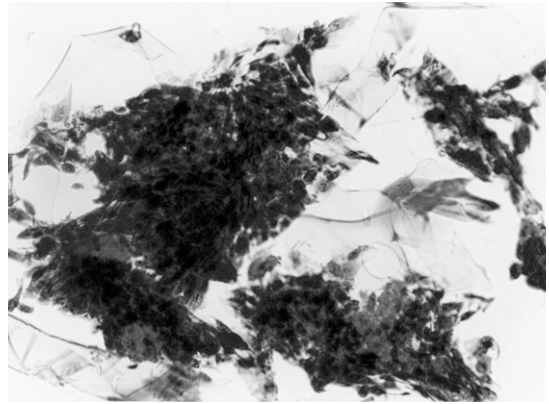


Figure 8B

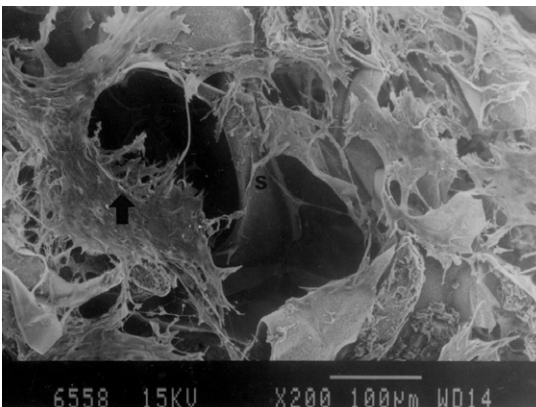


Figure 8C

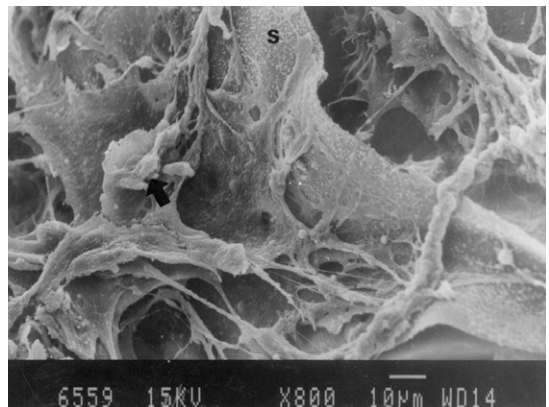


Figure 8D

### 사진부도 (Ⅲ)

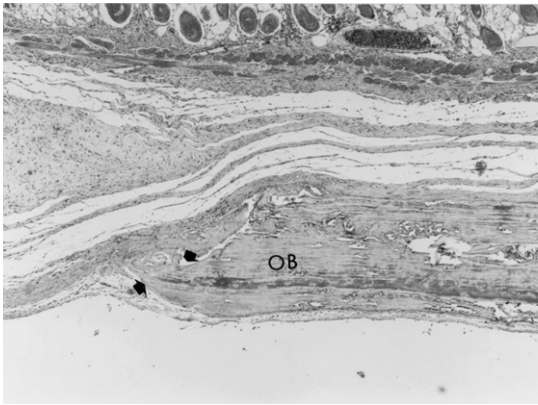


Figure 9A



Figure 9B

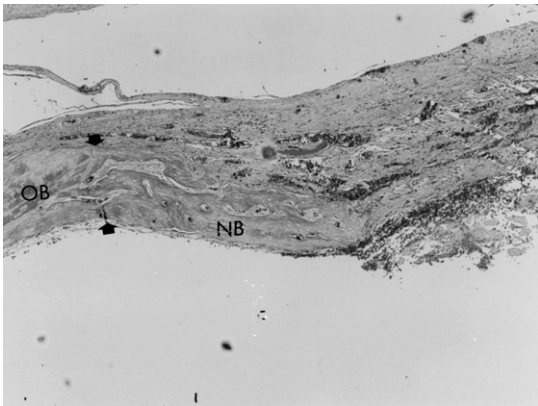


Figure 9C

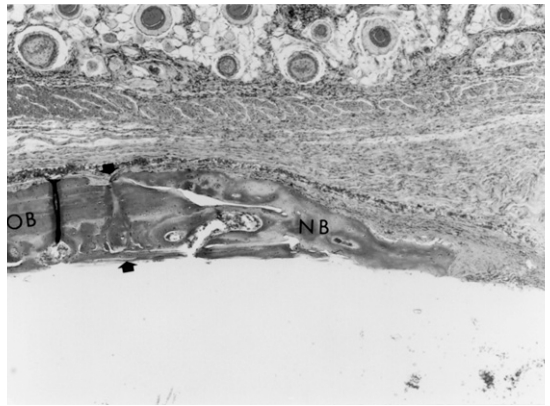


Figure 10A

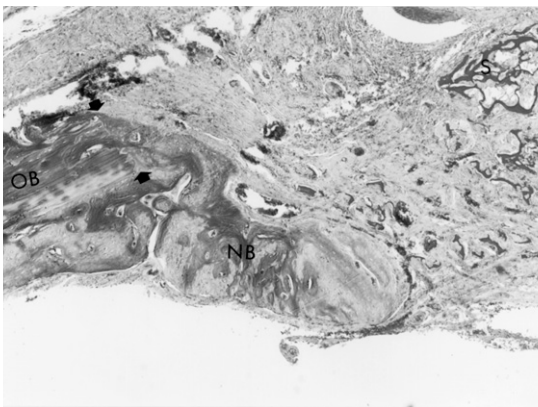


Figure 10B

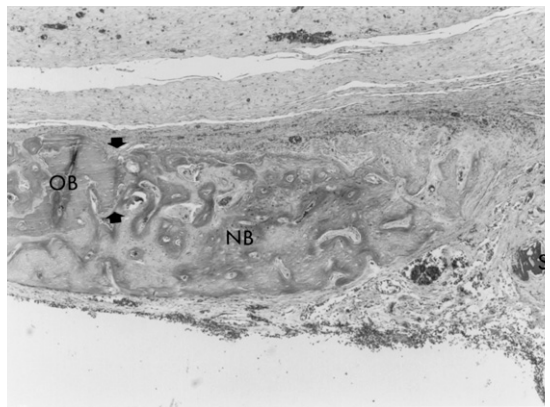


Figure 10C

## The Effect of Platelet Derived Growth Factor-BB Loaded Chitosan/Calcium Metaphosphate on Bone Regeneration

Seung-Yeol Lee<sup>1</sup>, Yang-Jo Seol<sup>1,2</sup>, Yong-Moo Lee<sup>1</sup>, Ju Yeon Lee<sup>3</sup>, Seung Jin Lee<sup>3</sup>, Sukyoung Kim<sup>4</sup>,  
Young Ku<sup>1</sup>, In-Chul Rhyu<sup>1</sup>, Soo-Boo Han<sup>1</sup>, Sang-Mook Choi<sup>1</sup>, Chong-Pyoung Chung<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Periodontology and Dental Research Institute, College of Dentistry, Seoul National University

<sup>2</sup>Department of Dentistry, College of Medicine, Sungkyunkwan University

<sup>3</sup>Department Industrial Pharmacy, College of Pharmacy, Ewha Womans University

<sup>4</sup>School of Materials and Metal Engineering, College of Engineering, Yeungnam University

Chitosan is a biodegradable natural polymer that has been demonstrated its ability to improve wound healing, and calcium metaphosphate(CMP) is a unique class of phosphate minerals having a polymeric structure. In this study, chitosan/CMP and platelet derived growth factor(PDGF-BB) loaded chitosan/CMP sponges were developed, and the effect of the sponges on bone regeneration and their possibility as scaffolds for bone formation by three-dimensional osteoblast culture were examined.

PDGF-BB loaded chitosan/CMP sponges were prepared by freeze-drying of a mixture of chitosan solution and CMP powder, and soaking in a PDGF-BB solution. Fabricated sponge retained its 3-dimensional porous structure with 100-200  $\mu$ m pores. The release kinetics of PDGF-BB loaded onto the sponge were measured in vitro with <sup>125</sup>I-labeled PDGF-BB. In order to examine their possibility as scaffolds for bone formation, fetal rat calvarial osteoblastic cells were isolated, cultured, and seeded into the sponges. The cell-sponge constructs were cultured for 28 days. Cell proliferation, alkaline phosphatase activity were measured at 1, 7, 14 and 28 days, and histologic examination was performed. In order to examine the effect on the healing of bone defect, the sponges were implanted into rat calvarial defects. Rats were sacrificed 2 and 4 weeks after implantation and histologic and histomorphometrical examination were performed.

An effective therapeutic concentration of PDGF-BB following a high initial burst release was maintained throughout the examination period. PDGF-BB loaded chitosan/CMP sponges supported the proliferation of seeded osteoblastic cells as well as their differentiation as indicated by high alkaline phosphatase activities. Histologic findings indicated that seeded osteoblastic cells well attached to sponge matrices and proliferated in a multi-layer fashion. In the experiments of implantation in rat calvarial defects, histologic and histomorphometric examination revealed that chitosan/CMP sponge promoted osseous healing as compared to controls. PDGF-BB loaded chitosan/CMP sponge further enhanced bone regeneration.

These results suggested that PDGF-BB loaded chitosan/CMP sponge was a feasible scaffolding material to grow osteoblast in a three-dimensional structure for transplantation into a site for bone regeneration.

---

Key Words : chitosan/calcium metaphosphate sponge, platelet derived growth factor, three dimensional scaffold, bone regeneration