

키토산이 백서 태자 두개관세포에 미치는 영향

김정경 · 정현주 · 김영준 · 김옥수

전남대학교 치과대학 치주과학교실 및 치의학연구소

I. 서론

치주치료의 궁극적인 목적은 질환에 의해 손상된 치주조직을 재생시키는 것이라고 할 수 있다. 이는 염증에 이환된 치근면의 신생 백악질의 형성, 신생골의 침착, 이 두 조직간에 기능적으로 배열되는 신생 결합조직 섬유 및 상부 치은조직의 재형성을 의미한다. 그러나 치주조직 치유시 치근백악질, 치주인대, 치조골 및 치은조직으로부터 유래되는 다양한 세포들의 영향을 받아 치유되는 양태가 매우 다르다.²⁾

소실된 치주조직의 회복을 위해 여러 가지 방법으로 창상부분의 세포부착능력을 향상시키기 위한 치근면 처치제의 사용³⁾, 골결손부 재생을 위한 골이식재의 사용^{4,5)}, 특정 세포의 선택적 이주를 이용하는 조직유도 재생술식^{6,7)} 및 골형성단백질과 다양한 성장인자를 이용한 방법 등이 있다^{8,9)}. 그러나 현재까지 제안된 많은 방법들은 그 임상적 결과에 대한 예지성이 낮으며^{4,9)} 특히 골재생 효과에 제한적이다^{4,7)}.

최근에는 세포의 성상을 생물학적으로 조절하는 방법에 대한 연구가 진행되어 폴리펩타이드계 성장인자 (polypeptide growth factors)의 임상적용이 연구되고 있다¹⁰⁾. 또한 생약제, 한약제를 이용한 치주

조직 재생치료법이 연구되고 있다¹¹⁾. 이와 같이 치주조직 재생을 위한 여러 가지 치료법이 제시되고 있으나 아직까지 확실하게 사용되는 방법은 없다. 치주치치 후 치주인대의 신속한 증식과 결손된 골 조직의 재생이 완전히 이루어질 수 있도록 부작용과 독성이 없으면서 치주인대 세포 및 조골세포의 활성을 증가시킬 수 있는 약제의 개발이 필요하다.

최근 이러한 생체 적합성과 항균작용, 창상 치유 촉진 등의 생물학적 작용, 우수한 기계적 특성으로 관심이 증가하고 있는 키토산 (1-4, 2-amino-2-deoxy- β -D-glucan)은 키틴을 강알칼리 처리하여 탈아세틸화시킨 유도체로서, 구조적으로 hyaluronic acid와 유사한 polycationic complex carbohydrate이며 분자량은 800-1,500KD인 생체 분해성 물질이다. 키토산은 지방 흡수를 저해하여 체중 감소에 도움을 주며, 콜레스테롤의 조절, 항미생물 효과, 항암효과, 지혈 효과 등이 있다¹²⁻¹⁶⁾. 키토산은 또한 창상 치유를 촉진시킨다고 알려져 있는데, 이는 키토산이 창상치유 과정에서 세포 이동과 조직의 성숙을 촉진시키기 때문이다¹⁷⁻²⁰⁾.

치의학 분야에서도 키토산에 대한 연구가 진행되고 있다. Klokavold 등²¹⁾은 키토산이 골원성 세포의

교신 저자: 정현주, 광주광역시 동구 학동 5번지 전남대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호: 501-757,
E-mail : hjchung@jnu.ac.kr

분화를 유도하여 골형성을 촉진시킨다고 하였다. Muzzarelli 등²²⁾은 치주질환으로 파괴된 조직, 발치와 및 치근단 절제술 후 골결손부위에 키토산을 적용하였을 때 골형성의 촉진을 보고하였고, Sapelli 등²³⁾은 치주질환, 구개창상 및 발치와의 치유를 증진시키기 위해 키토산을 사용하여 양호한 임상적 결과를 얻었다고 보고하였다. 계 등²⁴⁾은 키토산 제제가 포함된 차폐막이 치주질환으로 파괴된 골조직 재생에 유용하다고 하였고, 김과 정²⁵⁾도 치은섬유아세포에 키토산을 적용시 치은섬유아세포의 부착과 증식 및 alkaline phosphatase activity에 영향을 준다고 하는 등 키토산이 치주조직 재생에 유용한 물질로 이용될 수 있음을 시사하였다.

지금까지의 연구보고로 볼 때 키토산은 창상치유 과정 중에 세포이동과 기질형성을 촉진시키며 골형성 증진의 효과가 있는 것으로 생각된다. 그러나 이들 보고는 동물실험²²⁻²⁴⁾을 통한 키토산의 효과나 치주인대세포²⁶⁾ 또는 치은섬유아세포²⁵⁾에서의 결과로 치조골 형성에 직접적으로 관여하는 조골세포에 대한 키토산의 효과를 보고한 것은 드물다. 이에 본 연구는 키토산이 백서 태자 두개관세포의 활성을 저하시키지 않으면서 조골 작용을 증가시키는 적정농도를 알아보고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 세포배양

1) 백서 태자 두개관세포의 분리 및 배양

백서 태자 두개관세포의 분리는 McCarthy²⁷⁾등의 방법을 변형한 순차소화효소기법을 이용하여 분리 배양하였다. 태령 20-21일째의 백서 태자를 모체로부터 무균적으로 적출하고 태자의 두부로부터 두개관을 절제하여 골막과 연조직을 제거하였다. 절제한 두개관은 수술용 가위로 세절한 후 0.2% collagenase (GibcoBRL, U.S.A.)를 함유한 bone cell buffer (1 M NaCl, 0.3 M HEPES, 0.125 M CaCl₂, 0.5 M Mannitol, 0.1 M K₂HPO₄; pH 7.4) 1.5 ml과 함께 교반하면서 37℃에서 15분간 소화시켰다. 3번의 소화과정중에

얻어진 세포현탁액은 버리고 4번째와 5번째의 세포현탁액을 모아서 1000 xg에서 10분간 원심분리한 후 bone cell buffer로 세척하고 다시 원심분리하여 분리된 세포를 수집하여 배양하였다. 수집된 세포들은 75 ml flask에 10% fetal bovine serum (FBS; GibcoBRL, U.S.A.) 및 1% antibiotic-antimycotic solution (GibcoBRL, U.S.A.)이 첨가된 BGJb media (GibcoBRL, U.S.A.)에 배양하였다. 배양액은 3일 간격으로 교환하였으며 배양시 습도는 100%, 온도는 37℃였으며 95%의 공기와 5%의 CO₂를 계속 공급하였다. 실험에는 계대배양 1번째와 2번째 것을 이용하였다.

2) 배양접시내 키토산의 적용

수용성 키토산은 100% 키토산을 탈아세틸화시킨 후 염산과 물을 첨가한 수용액에 키토산 분해 효소를 이용해 분해시켜 정제 과정을 거쳐 건조한 분말 형태로 공급되며 (주)자광으로부터 제공받았다. 분말 형태의 키토산은 3차 증류수에 녹였으며 배지내 최종농도가 각각 0.01 mg/ml ~ 5.0 mg/ml이 되도록 stock solution으로 준비하여 실험에 사용하였다.

2. 세포활성도 평가

계대배양 1세대와 2세대의 골아세포를 0.25% trypsin-EDTA (GibcoBRL, U.S.A.) 용액으로 처리하여 분리한 후 well당 1 x 10⁴개의 세포수가 되게 하여 96 well plate (Nunc, U.S.A.)에 접종한 후 배양하였다. 세포가 약 70%정도의 밀생에 도달되었을 때 2%와 0% fetal bovine serum이 포함된 BGJb 배양액으로 교환하고 해당농도의 키토산을 첨가하였다. 사용된 키토산의 농도는 0, 0.01, 0.1, 1.0, 2.0, 5.0 mg/ml로 하였다. 배양 1일 후와 3일 후에 MTT assay를 시행하였다. 각 well에서 배양액을 제거하고 생리식염수로 2회 세척 후 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay kit (Promega, WI, U.S.A.)를 이용하여 제조사의 지시대로 3-(4,5-dimethyl-thiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 용액 50 µl를 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 반응을 정지시키

기 위하여 여기에 20 μ l의 10% SDS를 첨가한 후 ELISA plate reader (Microplate manager[®] BioRad, U.S.A)로 파장 490 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 해당농도의 키토산에 대한 세포활성도 평가는 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

3. 단백질 함량 측정

백서 태자 두개관세포를 6 well dish에 1×10^5 개의 세포를 분주하였다. 배양 3일과 7일에 배양액을 제거하고 인산완충생리식염수로 2회 세척하였다. 각 well에 200 μ l의 1x cell lysis solution (Cell signaling, U.S.A)를 넣고 5분간 배양한 후 cell scraper를 이용하여 내용물을 얻은 다음 10 μ l를 취하여 단백질양을 Bradford법에 의하여 측정하였다. Protein assay kit 시약 (BioRad, U.S.A.)을 이용하여 UV spectrophotometer (SmartSpec[™], BioRad, U.S.A.) 595nm에서 흡광도를 측정하고 세포내의 단백질 함량을 측정하였다.

4. 염기성 인산 분해 효소 활성도 측정

염기성 인산 분해 효소 활성도 측정은 Cho 등²¹⁾의 방법에 준하여 시행하였다. 백서 태자 두개관세포를 배양한 후 12 well dish에 well당 1×10^5 개의 세포를 분주하였다. 24시간 후 해당 농도의 키토산을 적용하고 3일과 7일간 배양하였다. 배지를 제거한 후 1% TritonX-100으로 세포를 용해시키고 초음파로 분쇄시켰다. 0.4 mM Tris HCl, 2 mM MgCl₂, 4 mM p-nitrophenol phosphate가 함유된 완충용액 50 μ l/well을 가한 후 30분간 반응시키고, 150 μ l의 1N NaOH를 가하여 반응을 중지시킨 후 분해된 p-nitrophenol을 405 nm에서 spectrophotometer (SmartSpec[™], BioRad, CA, U.S.A.)로 비색 정량하였다.

5. 석회화 결절의 측정

석회화 결절 형성에 대한 키토산의 영향을 알아보기 위하여 백서 태자 두개관세포를 12 well plate에 1

$\times 10^5$ 개의 세포가 되게 분주한 후 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic solution, 50 μ g/ml ascorbic acid, 10 mM sodium β -glycerophosphate가 첨가된 BGJb solution에 키토산 최종 농도 0.01 mg/ml, 0.1 mg/ml, 1.0 mg/ml, 2.0 mg/ml가 되도록 처리하고 3일마다 배지를 교환하면서 14일과 21일간 배양하였다. 배양 14일과 21일째에 cell을 4% formaldehyde에 1시간 고정한 후 1% Alizarin red S 염색 용액을 넣어 20분간 반응시켜 석회화 결절을 염색하였다. 염색된 표본들은 CCD camera (Sony, Japan)에서 촬영하고 Optimas image-processing program (Media cybernetics, Carlsbad, CA, U.S.A)을 이용하여 모니터 상에서 석회화 결절 부분의 면적을 측정하였다.

6. 통계학적 분석

실험에서 얻어진 수치는 one-way ANOVA와 사후검정에 Duncan 법을 시행 하였다.

III. 결 과

1. 키토산에 의한 백서 태자 두개관세포의 독성 검사

대조군과 농도별로 키토산을 처리한 각 실험군을 배양 1일, 3일 후에 MTT assay를 시행하였다. 배양 1일, 3일 모두 키토산 농도 2.0 mg/ml 이상에서는 대조군과 비교하여 유의한 활성감소가 나타났다 ($p < 0.05$, Figure 1). Fetal bovine serum 첨가 유무에 의한 세포활성도의 변화를 관찰하였을 때 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

2. 단백질 함량 측정 결과

키토산이 백서 태자 두개관세포의 총 단백질양 형성에 미치는 영향을 조사한 결과, 배양 3일에 대조군은 12.9 μ g/ml 키토산 처리군에서는 농도 0.01 mg/ml에서는 14.2 μ g/ml, 0.1 mg/ml에서는 17.1 μ g/ml, 1.0 mg/ml은 15.8 μ g/ml, 2.0 mg/ml에서는 14.8 μ g/ml 으

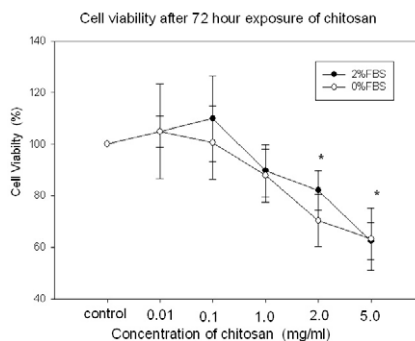
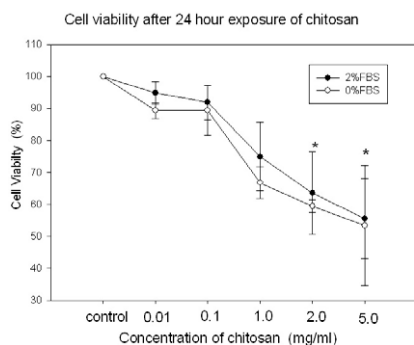


Figure 1. MTT assay for primary rat calvarial cell viability with chitosan.

*: indicates significant difference compared to the control ($p < 0.05$).

Table 1. Effects of chitosan on total protein level in primary rat calvarial cell

| Conc. (mg/ml) | protein ($\mu\text{g/ml}$) | |
|---------------|------------------------------|----------------|
| | 3 day | 7 day |
| control | 12.9 \pm 1.1 | 20.9 \pm 1.0 |
| 0.01 | 14.2 \pm 2.1 | 22.5 \pm 2.3 |
| 0.1 | 17.1 \pm 1.5* | 20.7 \pm 1.7 |
| 1.0 | 15.8 \pm 2.3 | 21.2 \pm 1.3 |
| 2.0 | 14.8 \pm 3.5 | 20.5 \pm 1.4 |

*: indicates significant difference compared to the control ($p < 0.05$).

Table 2. Alkaline phosphatase activity of rat calvarial cells treated with chitosan

| Conc. (mg/ml) | Alkaline phosphatase activity (U/ 10^5 cells) | |
|---------------|---|-------------------|
| | 3 day | 7 day |
| control | 314.9 \pm 29.5 | 434.5 \pm 33.8 |
| 0.01 | 350.6 \pm 43.2 | 575.8 \pm 43.2* |
| 0.1 | 418.7 \pm 34.3* | 615.2 \pm 71.1* |
| 1.0 | 395.4 \pm 30.2* | 556.2 \pm 48.7* |
| 2.0 | 385.6 \pm 47.9 | 482.4 \pm 71.2 |

*: indicates significant difference compared to the control ($p < 0.05$).

로 키토산 농도 0.1 mg/ml에서 대조군에 비하여 총 단백질량이 유의하게 더 많았다 ($p < 0.01$, Table 1). 배양 7일에서도 대조군은 20.9 $\mu\text{g/ml}$ 로 3일에 비하여 더 증가하였으며 키토산 처리군에서도 20.5~22.5 $\mu\text{g/ml}$ 으로 실험군에서 총 단백질량이 많았으나 유의한 차이는 없었다 (Table 1).

3. 염기성 인산 분해 효소 활성도 검사

키토산을 넣지 않은 대조군과 각 해당농도의 키토산을 접종하고 배양한 실험군들의 염기성 인산 분해 효소 활성도를 측정하였다.

배양 3일에 대조군은 314.9 U였고, 키토산 농도 0.01 mg/ml~2.0 mg/ml에서는 350.6 U~418.7 U로

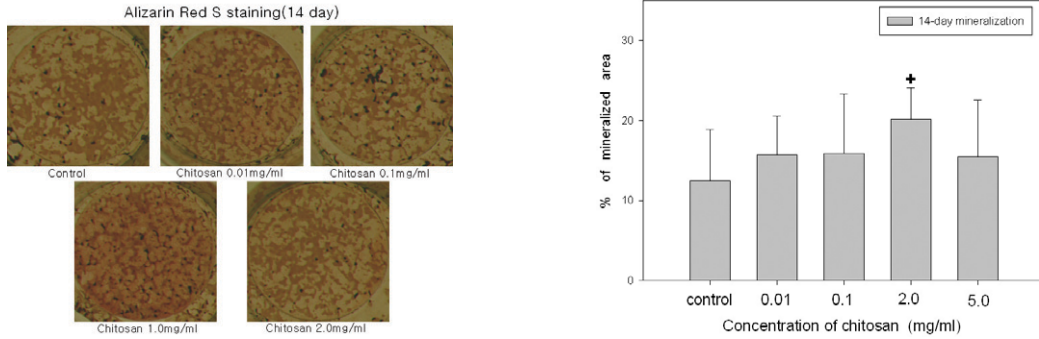


Figure 2. Representative in vitro mineralization data obtained from 14-day cultures of primary rat calvarial cells. +: indicates significant difference from the control ($p < 0.01$).

키토산 농도 0.1 mg/ml와 1.0 mg/ml에서 대조군에 비해 효소 활성도가 유의하게 높게 나타났다 (Table 2, $p < 0.05$).

배양 7일에 대조군은 434.5 U였고, 키토산 농도 0.01 mg/ml ~ 2.0 mg/ml에서는 482.4 U ~ 615.2 U로 모든 군에서 배양 3일째에 비하여 효소 활성도가 증가하였다. 키토산 농도 0.01 mg/ml ~ 1.0 mg/ml까지 대조군에 비해 효소 활성도가 유의하게 높게 나타났다 (Table 2, $p < 0.05$).

4. 석회화 결절 형성율의 측정

백서 태자 두개관세포를 석회화 결절 형성용 배지

에서 배양하고 배양 14일과 21일에 alizarin red S로 염색을 실시하고 석회화 결절 형성 면적을 측정하였다. 결절은 원형으로 주위에 세포가 밀집되어 있었고 결절 중앙쪽으로 진한 적색으로 염색되어 있었다.

배양 14일에 대조군의 석회화 결절의 형성 비율은 12.5%, 키토산 0.01 mg/ml은 15.7%, 0.1 mg/ml은 15.9%, 1.0 mg/ml은 20.2%, 2.0 mg/ml은 15.5%로 키토산 1.0 mg/ml를 투여한 군에서 대조군보다 높은 석회화 결절 형성율을 보였다 ($p < 0.01$, Figure 2).

배양 21일 석회화 결절 형성 비율은 14일에 비하여 더 증가하는 경향을 보였다. 대조군의 석회화 결절의 형성율은 19.1%, 키토산 0.01 mg/ml은 25.2%, 0.1 mg/ml은 28.7%, 1.0 mg/ml은 27.8%, 2.0 mg/ml은

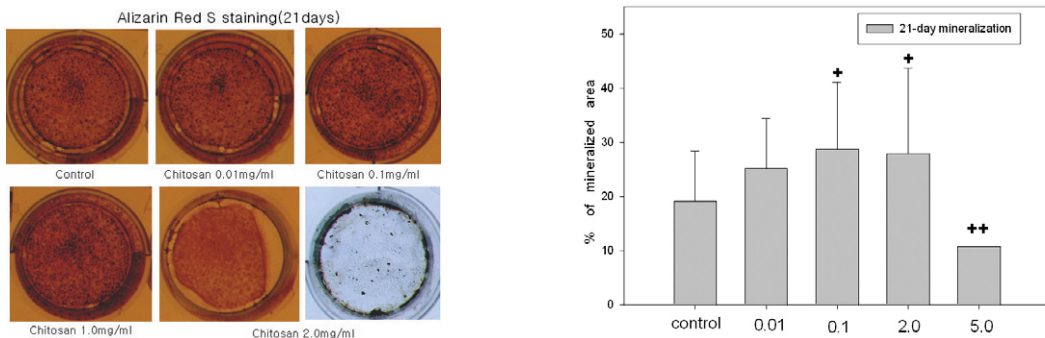


Figure 3. Representative in vitro mineralization data obtained from 21-day cultures of primary rat calvarial cells. +: indicates significant difference from the control ($p < 0.01$). ++: indicates significant difference from other groups ($p < 0.01$).

10.7%로 키토산 0.1 mg/ml와 1.0 mg/ml를 투여한 군에서 대조군보다 높은 석회화 결절 형성율을 보였고, 키토산 2.0 mg/ml군은 다른군에 비해 유의하게 낮았다 ($p < 0.01$, Figure 3).

IV. 고찰

치주질환은 부착치은의 소실과 함께 치주낭을 형성하고 지지조직인 치은결합조직, 백악질, 치주인대 그리고 치조골의 파괴를 수반하며 임상적으로 증상이 뚜렷하지 않음으로 인해 내원시 대부분 중증이상으로 진행되는 것이 일반적이다²⁸⁾.

치조골내에서는 조골세포와 파골세포가 동시에 존재하며 조골세포의 작용이 증가하거나 파골세포의 작용 능력이 감소하는 경우 신생골의 형성이 시작된다^{29, 30)}. 치조골은 치주질환으로 인하여 소실되기도 하고 임플란트 시술시 많은 양의 골조직이 필요하기 때문에 조골기능을 경우에 따라서 증강하여야 할 필요가 있다. 이를 위해서는 외과적 시술 후 골아세포가 치조골을 형성하는데 영향을 미칠 수 있는 미세환경을 개선하고 부작용과 독성이 없으면서 조골세포의 활성을 증가시킬 수 있는 약제 혹은 방법의 개발이 필요하다.

키토산 (1-4, 2-amino-2-deoxy- β -D-glucan)은 풍부한 천연재료인 키틴으로부터 쉽게 유도하여 사용할 수 있으며 생체흡수성 및 생체적합성 그리고 항미생물 작용을 가지고 있다. 또한 키토산은 지혈작용과 창상치유 촉진작용이 있고 골전도성이 있는 등 손상된 치주조직의 재생, 특히 골조직 재생에 효과가 있을 것으로 생각된다. 그러나 키토산을 이용한 치주조직 재생 연구는 부족하며 특히 골아세포의 활성에 영향을 주는 적절한 키토산의 농도 역시 연구자들간에 이견이 있다^{14, 25, 26, 31-33)}. 이에 본 연구에서는 지금까지의 문헌들을 참고로 백서 태자 두개관세포에 다양한 범위의 키토산 농도를 적용하고 세포의 활성에 영향을 주는 적절한 키토산의 농도를 알아보고자 하였다.

키토산의 농도와 투여 방법은 연구자마다 다양하다. Klokkevold 등¹⁴⁾은 0.2% acetic acid에 2 mg/ml 농도로, Lahiji 등³²⁾은 2% acetic acid에 4 mg/ml 농도로

키토산을 만든 후 미량 피펫을 이용하여 배양 접시 바닥에 줄을 그듯이 위치시키고 소독 후 세포 배양 hood에서 acetic acid를 휘발시켜 실험에 이용하였다. 그러나 이 방법은 준비과정이 복잡하며 또한 잔존하는 산도 (acidity)를 제거하기 위하여 0.5 M의 NaOH로 세척과정이 필요하며 세포 배양용 접시가 염기성으로 변화되지 않도록 다시 Hank's balanced salt solution으로 세척하여 pH를 7.4로 조정하는 등 그 과정이 번거로우며 세척 과정 중에 키토산이 희석될 우려가 있다. 한편 백 등³⁴⁾은 수용성 키토산 0.01 mg/ml ~ 2.0 mg/ml를 사용하였는데 이 방법은 그 과정이 번거롭지 않으며 필요에 따라서는 여러 번 키토산을 배양 접시에 적용할 수 있으며 정확한 양의 조절도 가능하다. 이에 본 연구에서는 여러 가지 점을 고려하여 키토산은 수용성 키토산으로, 분말 형태의 것을 3차 증류수에 녹여 사용하였다.

본 연구에서는 키토산이 백서 태자 두개관세포의 증식과 단백질 형성에 미치는 영향에 대하여 관찰하였다. 키토산이 세포의 증식에 미치는 영향을 관찰한 실험에서, Mori 등³³⁾은 섬유아세포에 키토산을 적용시 저농도 (5~50 μ g/ml)에서는 섬유아세포의 증식을 억제하지는 않지만 고농도 (500 μ g/ml)에서는 섬유아세포의 증식을 억제시킴을 보고하였다. 본 실험에서는 배양 1일째 키토산 농도 1.0 mg/ml 이상에서는 0.01 mg/ml군과 비교하여 유의한 활성감소가 나타났으며 배양 3일에는 2.0 mg/ml 이상의 농도에서 0.01 mg/ml군과 비교하여 활성감소가 유의하게 나타났다. Lahiji 등³²⁾은 골아세포에 4.0 mg/ml 키토산을 적용 후 7일에 세포의 활성을 관찰하였을 때 키토산으로 피복 처리된 경우가 키토산 처리가 안된 것에 비하여 골아세포의 밀도(density)가 높았다고 하였다. 이 결과는 본 실험의 세포 활성이 감소한 2.0 mg/ml보다 상당히 높은 농도에서도 세포 활성을 보였는데 이는 키토산 적용 방법, 관찰기간 및 사용한 세포 등, Lahiji 등³²⁾이 사용한 실험 방법의 차이에 의한 것으로 생각된다. 그러나 Mori 등³³⁾ 및 Lahiji 등³²⁾의 결과로 볼 때 적절한 농도의 키토산은 세포의 활성을 증진시켜 창상 치유를 촉진시킬 것으로 사료된다.

키토산을 적용시 세포의 형태변화도 관찰되는데, Lahiji 등³²⁾은 키토산을 골아세포에 적용시 세포의 형태가 방추형이 아닌 구형이었고 그 형태가 7일간 유지되었다고 하였다. 본 실험에서도 키토산 농도 0.01 mg/ml에서부터 백서 태자 두개관세포는 키토산 적용 24시간부터 그 형태가 구형인 것이 관찰되었는데, 2.0 mg/ml, 5.0 mg/ml에서 특히 현저하였으며 3일째에도 세포의 형태가 그대로 유지되었으며 특히 5.0 mg/ml에서는 세포들이 응어리져 있는 형태를 보여 Lahiji 등³²⁾의 결과와 유사하였다 (data unshown).

키토산이 백서 태자 두개관세포의 총 단백질양 형성에 미치는 영향을 조사한 결과, 3일째 대조군은 12.9 $\mu\text{g/ml}$, 키토산 처리군에서는 14.2 $\mu\text{g/ml}$ ~ 17.1 $\mu\text{g/ml}$ 로 키토산 농도 0.1 mg/ml에서 대조군에 비하여 총 단백질양이 유의하게 더 많았다. 배양 7일에서도 대조군은 20.9 $\mu\text{g/ml}$ 로 2일째에 비하여 더 증가하였으며 키토산 처리군에서도 20.5 ~ 22.5 $\mu\text{g/ml}$ 로 실험군에서 총 단백질양이 많았으나 유의한 차이는 없었다. 키토산에 의한 단백질 합성능을 측정한 김 등²⁶⁾의 실험에서는 0.2 mg/ml의 키토산을 적용한 결과, 단백질 합성능은 초기 3일에서는 대조군에 비해 유의하게 더 많지만 7일에서는 대조군보다 더 낮게 나타난다고 하였다. 본 실험에서 배양 3일의 총 단백질양은 대조군에 비하여 키토산 농도 0.1 mg/ml에서는 유의하게 많았으며 다른 농도에서도 대조군보다 총 단백질 양이 더 많은 경향을 보여 김 등²⁶⁾의 결과와 유사하였다. 배양 7일에서의 총 단백질양에서도 대조군, 키토산 적용군 모두 3일에 비하여 그 양이 증가하였으며 대조군보다 키토산 적용군들이 그 양이 많은 경향을 보였으나 유의한 차이는 없었다. 이상의 연구 결과, 키토산 0.01 mg/ml ~ 2.0 mg/ml 농도에서는 백서 태자 두개관세포의 증식을 억제시키지 않음을 시사한다.

키토산이 골아세포에 미치는 영향을 관찰한 연구들을 보면, Klokkevold 등¹⁴⁾은 쥐에서 채취한 미분화 간엽세포가 키토산을 처리하였을 때 조골세포로 분화하여 석회화되는 양상을 보고하였다. 그는 이 연구에서 키토산이 직접적으로 조골세포의 골생성을 촉진하고 간접적으로는 섬유아세포를 억제함으로써

골생성에 저해되는 인자를 억제하여, 결과적으로 조골세포로의 분화와 골형성을 촉진한다고 하였다. 김 등²⁶⁾도 골아세포의 증식 및 염기성 인산분해효소 활성도에 영향을 미쳐 골형성을 촉진할 것이라고 하였다. 본 실험에서도 백서 태자 두개관세포의 조골세포로의 분화를 관찰하기 위하여 염기성 인산 분해효소 활성도 및 석회화 결절 형성 면적을 측정하였다. 염기성 인산 분해 효소는 유기인산 에스테르를 가수분해하여 석회화가 이루어지는 부위에서 국소적으로 인산이온의 농도를 증가시키는 효소로 세포 외기질에 calcium phosphate를 침착시킴으로서 석회화를 유도하는 기능을 가진다^{33, 35)}. 그래서 염기성 인산 분해 효소의 활성도가 증가한다는 것은 석회화가 촉진됨을 의미한다. 백서 태자 두개관세포의 경우 배양 3일에 대조군에 비하여 키토산 적용군에서 더 높은 활성도를 보였으며 특히 0.1 mg/ml과 1.0 mg/ml에서 대조군에 비해 더 유의하게 높은 활성도를 보였다. 배양 7일에서도 대조군에 비하여 키토산 적용군에서 더 높은 활성도를 보였으며 특히 0.01 mg/ml에서 1.0 mg/ml까지의 농도에서 대조군에 비해 더 유의하게 높은 활성도를 보였다($p < 0.05$). 이는 배양 7일까지도 백서 태자 두개관세포에서 키토산에 의한 석회화 과정이 진행중임을 추정할 수 있다.

본 연구의 석회화 결절 형성능력을 측정한 결과, 키토산을 투여한 군에서 14일의 키토산 농도 1.0 mg/ml에서는 대조군과 비교하여 더 많은 석회화 결절을 형성하였으며 21일에서는 키토산 0.1 mg/ml와 1.0 mg/ml 투여군에서도 대조군과 키토산 2.0 mg/ml군보다 더 높았다 ($p < 0.01$). 이는 키토산 농도 0.1 mg/ml와 1.0 mg/ml에서 골 형성이 증진된다는 것을 시사한다.

키토산에 의한 치은 섬유아세포의 영향을 보면, 김과 정²⁵⁾은 키토산 적용시 세포활성은 증가하지만 세포의 부착은 대조군에 비해 감소하였다고 하였고 김 등²⁶⁾도 섬유아세포의 증식이 억제되지만 단백질 합성능은 대조군과 차이가 없다고 하는 등 키토산이 치은 조직에는 별 다른 역할을 하지 않는 것으로 생각된다. 그러나 키토산은 창상치유를 촉진시키는 역할이 있고 동물의 wound dressing material로 사용되고 있다^{17, 18)}. Ueno 등¹⁹⁾은 초기 창상치유에 중요한

역할을 하는 osteopontin이 키토산 처리된 다형핵 백혈구에서 증가였고, Ueno 등²⁰⁾의 계속된 연구에서 키토산이 L929 mouse 섬유아세포의 세포외기질 합성을 직접적으로 증진시키지는 않았지만, 키토산에 의해 자극된 macrophage에 의한 성장인자 합성 증가와 그에 따른 섬유아세포의 세포외기질 합성이 증가되어 창상치유가 촉진될 것이라고 하는 등 섬유아세포의 기능향상이 키토산에 의해 자극된 주변 조직 세포에 의하여 영향을 받을 것으로 추정된다. 따라서 키토산에 의한 치은 섬유아세포의 영향을 주변의 치주인대 세포 및 골아세포와 함께 그 역할을 규명할 필요가 있을 것이다.

본 연구결과 백서 태자 두개관세포에 키토산 농도 0.1 mg/ml과 1.0 mg/ml을 적용시 세포의 활성 및 증식을 억제시키지는 않았으며 초기 단백질 합성과 염기성 인산 분해 효소활성을 증진시킴을 알 수 있었다. 또한 키토산 농도 0.1 mg/ml과 1.0 mg/ml에서 석회화 결절 면적율이 대조군에 비해 유의한 증가를 보였다. 이는 적절한 농도의 키토산은 골세포에 대한 세포 친화성이 있으며 골재생을 증진시킬 수 있음을 의미한다. 향후 백서 태자 두개관세포에 키토산을 적용시 조골세포로의 분화 과정에 대한 계속적인 연구가 필요하며 또한 골형성에 중요한 세포외기질 단백질 분비에 미치는 영향 및 그 기전에 대한 연구가 필요하리라 사료된다.

V. 결론

키토산은 지혈작용, 창상치유 촉진작용 및 골전도성등의 효과로 보아 손상된 치주조직의 재생, 특히 골조직 재생에 효과가 있을 것으로 생각된다.

그러나 키토산을 이용한 치주조직 재생 연구는 아직 부족하며 특히 골아세포의 활성에 영향을 주는 적절한 키토산의 농도 역시 연구자들간의 이견이 있다. 이에 본 연구에서는 백서 태자 두개관세포에 키토산 농도 0.01 mg/ml, 0.1 mg/ml, 1.0 mg/ml, 2.0 mg/ml 및 5.0 mg/ml로 24, 72시간 배양하여 세포의 활성도를 측정하였다. 백서 태자 두개관 골아세포에서의 골기질 형성능력을 알아보기 위하여 세포에 키토산

농도 0.01 mg/ml~2.0 mg/ml를 적용하고 염기성 인산 분해 효소 활성도와 석회화 기질 형성 능력을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 백서 태자 두개관세포에 키토산 자극시 배양 24 시간과 72시간에서 농도 0.01 mg/ml~1.0 mg/ml은 대조군과 유사한 세포활성을 보였으나 농도 2.0 mg/ml 이상에서는 세포 활성이 유의하게 감소하였다 ($p<0.05$).
2. 키토산이 백서 태자 두개관세포의 총 단백질량 형성에 미치는 영향을 조사한 결과, 3일에 대조군은 12.9 $\mu\text{g/ml}$, 키토산 처리군에서는 14.2 $\mu\text{g/ml}$ ~15.8 $\mu\text{g/ml}$ 였으며 농도 0.1 mg/ml에서 대조군에 비하여 총 단백질량이 유의하게 더 많았다 ($p<0.05$). 배양 7일에서도 대조군은 20.9 $\mu\text{g/ml}$, 키토산 처리군에서는 20.5 $\mu\text{g/ml}$ ~22.5 $\mu\text{g/ml}$ 으로 실험군에서 총 단백질량이 더 많은 경향을 보였으나 유의하지 않았다.
3. 배양 3일에 염기성 인산 분해효소 활성도는 키토산 농도 0.1 mg/ml와 1.0 mg/ml에서 대조군에 비해 효소 활성도가 유의하게 높게 나타났으며 ($p<0.05$), 배양 7일에도 키토산 농도 0.01 mg/ml - 1.0 mg/ml에서 대조군에 비해 효소 활성도가 유의하게 높게 나타났다 ($p<0.05$).
4. 석회화 결절 형성율을 측정한 결과 키토산을 투여한 군에서 농도 0.1mg/ml, 1.0 mg/ml에서 대조군과 비교하여 더 많은 석회화 결절을 형성하였으나 ($p<0.01$), 2.0 mg/ml에서는 대조군과 유사한 정도의 석회화 결절을 형성하였다.

이상의 결과 0.1 mg/ml, 1.0 mg/ml의 키토산을 적용시 세포 활성도의 저하 없이 백서 태자 두개관세포의 석회화를 촉진시키는 것으로 나타났으며, 치조골 결손부 재생 술식에 키토산의 임상적 응용이 가능하리라 생각된다.

VI. 참고문헌

1. Iglhaut J, Aukhil I, Simpson DM, Johnston MC,

- Kock G: Progenitor cell kinetics during tissue regeneration in experimental periodontal wounds. *J Periodont Res* 1988;23:107-117.
2. McCulloch CAG, Bordin S: Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. *J Periodont Res* 1991;26:144-154.
3. Ripamonti U, Petit JC, Lemmer J, Austin JC: Regeneration of the connective tissue attachment on surgically exposed roots using a fibrin-fibronectin adhesive system. *J Periodont Res* 1987;22:320-326.
4. Mellonig JT: Decalcified freeze-dried bone allograft as an implant material in human periodontal defects. *Int J Periodont Restorative Dent* 1984;4:41-55.
5. Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J: New attachment formation as a result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 1984;11:494-503.
6. Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring T, Wentrom J: New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports. *J Clin Periodontol* 1986;13:604-616.
7. Lynch SE, Williams RC, Polson AM: A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. *J Clin Periodontol* 1989;16:545-548.
8. Reddi AH and Cunningham NS: Initiation and promotion of bone differentiation by bone morphogenic proteins. *J Periodont Res* 1994;29:225-235.
9. Terranova VP, Wikesjo UME: Extracellular matrix and polypeptide growth factors as a mediators of functions of cell of the periodontium. *J Periodontol* 1987;58:371-380.
10. 이광수, 홍성우, 유경태, 유형근, 김윤철, 신형식: 홍화씨 성분 분리 추출물이 치주인대세포와 조골모유사세포의 광물화에 미치는 영향. 대한 치주과학회지 1998;28:745-754.
11. Aspinall GO: Chitin and chitosan. In: The polysaccharides. New York: Academic press, 1983:386.
12. Brandenburg G, Leibbroch LG, Shuman R, Malette WG, Qiugley H: Chitosan: A new topical agent for diffuse capillary bleeding in brain tissue. *Neurosurg* 1984;15:9-13.
13. Klokkevold PR, Lew DS, Ellis DG, Bertolami CN: Effect of chitosan on lingual hemostasis in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg* 1991;49:858-863.
14. Muzzarelli RA, Baldassarre M, Conti F, Ferrara P, Biagini B: Biological activity of chitosan. *Biomaterials* 1988;9:247-252.
15. Sanford PA: Chitosan: Commercial uses and potential applications. In Chitin and Chitosan (Skjak-Braek G, Anthonsen T, Sanford P, edo). London: Elsevier Applied Science 1989:51-70.
16. Prudden JF, Migel P, Hanson P, Friedrich L, Balassa L: The discovery of a potent pure chemical wound-healing accelerator. *Am J Surg* 1970;119:560-564.
17. Okamoto Y, Minami S, Matsushashi A: Application of polymeric N-acetyl-D-Glucosamine glucosamine (chitin) to veterinary practice. *J Vet Med Sci* 1993;55:743-747.
18. Ueno H, Murakami M, Okumura M, Kadosawa T, Uede T, Fujinaga T: Chitosan accelerates the production of osteopontin from polymorphonuclear leukocytes. *Biomaterials* 2001;22:1667-1673.
19. Ueno H, Nakamura F, Murakami M, Okumura M, Kadosawa T, Fujinaga T: Evaluation effects of chitosan for the extracellular matrix production by fibroblasts and the growth factors production by macrophages. *Biomaterials* 2001;22:2125-2130.
20. Klokkevold PR, Vandemark L, Kenney EB, Bernard GW: Osteogenesis enhanced by chi-

- tosan in vitro. *J Periodontol* 1996;67:1170-1175.
21. Muzzarelli RA, Biagini G, Pugnaroni A, Baldassarre V: Reconstruction of periodontal tissue with chitosan. *Biomaterials* 1993;14:39-43.
 22. Sapelli PL, Baldessare V, Muzzarelli RA, Emanuelli M: Chitin in Nature and Technology. In *Chitosan in dentistry*. 1986:507-512.
 23. 계승범, 손성희, 최상묵: Chitosan과 chitosan-cellulose를 이용한 차폐막의 골조직 재생유도능력에 관한 연구. *대한치주과학회지* 1998;28:611-630.
 24. 김옥수, 정현주: 키토산이 치은섬유아세포에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 2002;32:235-247.
 25. 김선희, 권영혁, 이만섭, 박준봉, 허익: Chitosan이 치주인대, 두개관 및 치은섬유아세포의 성장에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 1998;28:17-35.
 26. McCarthy TL, Centrella M, Canalis E: Further biochemical and molecular characterization of primary rat parietal bone cell culture. *J Bone Min Res* 1988;3:401-408.
 27. Gillett R, Johnson NW: Bacterial invasion of the periodontium in a case of juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol* 1982;9:93-101.
 28. Melcher AH: On the repair potential of periodontal tissue. *J Periodontol* 1976;47:256-260.
 29. Casser-Bette M, Murray AB, Closs EI, Erfle V, Schmidt J: Bone formation by osteoclast-like cells in a three-dimension cell culture. *Calcif Tissue Int*. 1990;46:46-56.
 30. Lee YM, Park YJ, Lee SJ, Ku Y, Han SB, Klokkevold PR, Chung CP: Tissue engineered bone formation using chitosan/tricalcium phosphate sponges. *J Periodontol* 2000;71:410-417.
 31. Lahiji A, Sohrabi A, Hungerford D, Frinzoza C: Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. *J Biomed Mater Res* 2000;51:586-595.
 32. Beertsen W, van den Bos T: Calcification of dentinal collagen by cultured rabbit periosteum: the role of alkaline phosphatase. *Matrix* 1989;9:159-171.
 33. Anderson HC: Mechanism of mineral formation in bone. *Lab Invest* 1989;60:320-330.
 34. 백정원, 이현정, 유윤정, 조규성, 김종관, 최성호: 키토산이 치주인대 섬유아세포에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 2001;31:823-832.
 35. Mori T, Okumura M, Matsuura M: Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro. *Biomaterials* 1997;18:947-951.

Effect of chitosan in primary rat calvarial cell

Jeong-Kyung Kim, Hyun-Ju Chung, Young Joon Kim, Ok-Su Kim

Dept. of Periodontology, College of Dentistry and Dental Science Research Institute, Chonnam National University

The effect of chitosan, a carbohydrate biopolymer extracted from chitin, on periodontal regeneration is of particular interest. The purpose of this study was to evaluate the effect of chitosan on primary rat calvarial cells in vitro, with special focus on their proliferative properties by cell activity and the amount of total protein synthesis. The experimental groups were cultured with chitosan in concentration of 0.01, 0.1, 1.0, 2.0 and 5.0 mg/ml for MTT assay. In the experimental groups, cells were cultured with chitosan in concentration of 0.01, 0.1, 1.0 and 2.0 mg/ml. Each group was characterized by examining alkaline phosphatase activity at 3 and 7 days and the ability to produce mineralized nodules of rat calvarial cells at 14 and 21 days.

The results were as follows:

1. The cell activity was not reduced in the concentration of 0.01~1.0 mg/ml whereas the cell activity was reduced in the concentration of 5.0 mg/ml than the control at day 1 and 3 ($p < 0.05$).
2. Primary rat calvarial cells treated with chitosan in the concentration 0.01 mg/ml and 0.1 mg/ml showed more protein synthesis than the control at day 3 ($p < 0.01$). But primary rat calvarial cells treated with chitosan showed more protein synthesis than in control but they didn't have statistically difference among groups at day 7.
3. At 3 and 7 days, alkaline phosphatase activity was significantly increased in the concentration of 0.01 mg/ml, 0.1 mg/ml and 1.0 mg/ml ($p < 0.05$).
4. The percentage of mineralized bone nodule was more in the concentration of chitosan 0.1 mg/ml and 1.0 mg/ml than the control.

These results suggested that chitosan has a positive effect on the bone formation of primary rat calvarial cells in the concentration of 0.1 mg/ml and 1.0 mg/ml.