

# Chitosan이 치주인대, 두개관 및 치은섬유아세포의 성상에 미치는 영향

김선희 · 권영혁 · 이만섭 · 박준봉 · 허 익

경희대학교 치과대학 치주과학교실

## I. 서론

치주질환의 치료목적은 더 이상의 부착상실이 일어나는 것을 방지하고, 소실된 조직의 재생을 도모함에 있으며, 치료법으로는 비외과적 시술과 외과적 치주치료를 들 수 있다. 특히 외과적인 치료법에는 과거 질환에 이환된 병소부의 단순제거인 치은절제술을 시작으로, 구강내로 노출된 치근면을 피폐하기 위한 치관변위판막술, 연조직과 치근면의 결합을 용이하도록 치근면을 변화시키는 약제를 이용한 치근면처리법, 치은상피의 근단층 이동방지와 조직증식을 선택적으로 유도하는 조직유도재생술, 결손된 조직내 비계역할을 기대하는 불활성 골전도물질의 삽입, 그리고 골유도 혹은 골형성물질 사용등 여러 다양한 방법들이 소개되었다<sup>1)</sup>. 그러나 병소부의 단순제거는 시술시 건강한 조직도 절제해야 하는 단점이 있고, 인접치아의 지지조직 약화와 노출된 치근면에 상아질과민증등의 합병증이 야기될 가능성도 있다. 따라서 가급적 조직제거가 적으면서 치주낭을 제거할 수 있는 시술 형태로 변형 위드만씨법이 발표되었다. 그러나, Egelberg(1987)<sup>2)</sup>는 문헌적 고찰을 통해 단일시술로 이상적인 치주조직 재생을 얻을

수 있는 방법은 없다고 주장하였다.

근래에는 세포성상을 생물학적으로 조절하는 요소에 대한 연구가 진행되어 폴리펩타이드계 성장인자(Polypeptide Growth Factors, PGF)의 임상도입에 연구 관심이 모아지고 있다. PGF는 자연적으로 발생하는 생물학적 조절자이며, 조직회복과 관련하는 다양한 종류의 세포 증식, 이주, 기질합성을 조절하는 것으로 알려져 조직재생연구에 많이 응용되고 있지만 아직은 그 안정성이 완전히 규명되지는 않았으므로 인체에서의 사용은 허용되지 않고 있다<sup>3)</sup>.

외과적 치료법의 부가적인 방법으로 전신질환자의 이차감염방지나 유년형 치주염이나 급속 진행형 치주염 같은 특정 세균에 의한 치주질환시 경량의 항생제가 장기간 투여되기도 한다. 그 외 약제나 영양제를 전신적으로 투여하여 치주조직의 병적 상태 개선과 파괴된 조직을 재생시키는 방법들도 연구되어, 옥수수로부터 추출한 불검화 정량추출물인 Zea Mays L.이 치주치료에 보조적 가치가 있는 것으로 보고되었다<sup>4)</sup>. 또한 생약제, 한약제 개발에 관한 연구가 활발히 진행되어 tea catechin 추출물, 대조, 골쇄보(Drynariae Rhizoma)등이 치주질환으로 소실된 조직의

재생 치료제로 연구되고 있다.

이상과 같이 여러 치료법이 있으나 아직은 치주조직재생을 위한 확실한 치료법은 없는 상태이며 각종 외과적 수술 후 치조골과 백악질 사이의 결합조직인 치주인대의 신속한 증식과 결손된 골조직의 재생이 완전히 이루어질 수 있도록, 부작용과 독성이 없으면서 치주인대세포 및 조골세포의 활성을 증가시킬 수 있는 약제의 개발이 무엇보다도 필요하다.

본 연구에서 hyaluronic acid와 화학적으로 유사한 chitosan(1-4, 2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glucan)을 연구재료로 선택한 이유는 chitosan이 생체흡수성, 생체적합성<sup>6, 7)</sup> 및 항미생물 작용<sup>8, 9)</sup>을 가지며 풍부한 천연재료인 chitin으로부터 쉽게 유도하여 사용할 수 있기 때문이다. 또한 chitosan이 지혈작용<sup>10-14)</sup>과 창상치유를 촉진하는 작용<sup>15-18)</sup>을 가지며, 골전도성<sup>5, 6, 19-22)</sup>을 갖는다는 보고를 근거로 하였다.

여러 연구들에서 chitosan이 창상치유과정에서 세포의 이동과 조직의 조직화에 영향을 미치며, 골형성을 촉진시킨다는 보고가 있어 왔지만, 세포수준에서 시도된 연구<sup>5)</sup>는 별로 없었다. 본 연구에서는 in vitro상에서 chitosan이 치주인대, 두개관, 치은섬유아세포에 미치는 영향을 세포증식율, 단백질 합성능, 염기성 인산분해효소 활성도를 측정하여 알아보고, 석회화 결절수를 측정하여 chitosan이 골형성에 미치는 영향을 평가하므로써 치주재생술식에서 chitosan의 이용을 모색해 보고자 하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 연구재료

본 연구에 사용된 chitosan은 chitosan 분말을 200 $\mu$ g/ml의 농도로 0.2% acetic acid용액에 녹여 두었다가, 세포배양시 배양액 1ml당 40 $\mu$ g의 농도로 혼합하여 사용하였다.

### 2. 세포 배양

#### (1) 치주인대세포의 배양

교정치료를 목적으로 발거한 제1소구치의 치근 중앙 1/3에서 치주인대 조직을 채취하여 300unit/ml penicillin(Gibco, U.S.A.), 300 $\mu$ g/ml streptomycin(Gibco, U.S.A.)과 1.5 $\mu$ g/ml amphotericin-B(Gibco, U.S.A.)가 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, U.S.A.)으로 5회 세척후 배양접시에 넣고 잘게 세절하여 조각편을 35mm 세포배양용 접시에 고르게 분포시킨 다음, 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco, U.S.A.)과 100unit/ml penicillin, 100 $\mu$ g/ml streptomycin(Gibco, U.S.A.)과 0.5 $\mu$ g/ml amphotericin-B가 포함된 DMEM을 넣고, 37°C, 100% 습도, 5% CO<sub>2</sub> 공기혼합 배양기(Vision Scientific Co., Korea)에서 배양하였다. 치주인대세포가 조직 절편으로부터 증식되어 완전히 배양접시를 덮는 단층이 형성되면 0.05% Trypsin/0.02% EDTA로 처리하여 배양접시로부터 세포를 박리하고 1: 3 계대배양하여 이 실험에서는 4-7세대의 세포를 사용하였다.

#### (2) 두개관세포의 배양

100g 웅성 백서에 Pentobarbital Sodium (Tokyo Industrial Chem., Japan) 30mg/kg을 복강내 주사하여 전신마취시킨 후 70% 알콜로 두피를 세척 소독하고 두경부를 탈락시켜 희생시켰다. 외과용 가위로 하악을 상악골에서 분리한 후 두개관을 적출하고 연조직을 완전히 제거한 후 치주인대세포와 같은 조성의 생검배지로 5회 세척한 후 동일한 방법으로 배양하여 4-7세대의 세포를 사용하였다.

#### (3) 치은섬유아세포의 배양

교정치료를 목적으로 내원한 환자로부터 제1소구치 발거시 건강한 치은조직을 채취하여 치주인대세포에서와 같은 조성의 생검배지로

5회 세척한 후 동일한 방법으로 배양하여 4-7 세대의 세포를 사용하였다.

### 3. 연구방법

#### (1) 실험군 설정

배양액 1ml당 40 $\mu$ g의 chitosan이 포함된 배지에서 배양한 세포군을 실험군으로, chitosan이 포함되지 않은 배지에서 배양한 세포군을 대조군으로 하여 비교하였다.

#### (2) 세포증식율 측정

24 well 배양접시(Corning Co., USA)에 각 well당  $2 \times 10^4$ 개의 세포를 분주하고, 실험군에는 1ml당 40 $\mu$ g의 chitosan을 함유한 DMEM을 배양액으로 하고 대조군에는 chitosan이 함유되지 않은 DMEM 표준배양액을 주입하여 배양하였다. 배양 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15일에 배양액을 버리고 0.05% Trypsin/0.02% EDTA (Gibco, USA)로 처리하여 증식된 세포를 배양접시로부터 박리한 다음 hemocytometer를 이용하여 도립현미경(Olympus Co., Japan)하에서 세포수를 측정하였다.

#### (3) 단백질 합성능 측정

24 well 배양접시에 각 well당  $5 \times 10^4$ 개의 세포를 분주하고 세포증식율 측정에서와 같은 조성의 배지에서 배양하였다. 배양 3, 7일에 인산완충생리식염수로 2회 세척하고 0.05% Trypsin/ 0.02% EDTA(Gibco, USA)로 처리하여 증식된 세포를 배양접시로부터 박리한 다음 1,500 rpm으로 6분간 원심분리한 다음 상층액을 제거하고 0.5ml 증류수를 첨가한 다음 초음파분쇄기 (Ultrasonic Dismembrater Model-300, Fisher Scientific, USA)로 분쇄한 다음 다시 원심분리하여 상층액을 채취하고 Bio-rad protein assay용 dye reagent와 반응시켰다. Vortexing하여 실온에서 5분간 방치한 후 UV-VIS spectropho-

tometer(Shimatsu Co., Japan)로 595nm에서 흡광도를 측정하였다. Bovine serum albumin을 1.39mg/ml로 만들어 흡광도를 측정하여 작성한 표준곡선을 기준으로 총단백질량을 산출하였다.

#### (4) 염기성 인산분해효소 활성도 측정

24 well 배양접시에 각 well당  $5 \times 10^4$ 개의 세포를 분주하고 세포측정율에서와 같은 조성의 배지에서 배양하였다. 배양 3, 7일에 인산완충생리식염수로 2회 세척하고 0.05% Trypsin/0.02% EDTA로 처리하여 세포를 박리한 다음 1,500 rpm으로 6분간 원심분리하였다. 상층액은 제거하고 0.5ml 증류수를 첨가하여 초음파분쇄기(Ultrasonic Dismembrater Model-300, Fisher Co., USA)로 분쇄한 다음 300 $\mu$ l를 취하여 염기성 인산분해효소 활성도 측정용 시약(Al.P.K.kit, 경동제약)과 반응시킨 다음 UV-VIS spectrophotometer(Shimatsu Co., Japan)를 이용하여 500nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### (5) 석회화 결절 수 측정

배양접시에 백서 두개관세포를  $4 \times 10^5$ 개씩 분주하고 10% Fetal bovine serum, 100unit/ml penicillin, 100 $\mu$ g/ml streptomycin, 50 $\mu$ g/ml ascorbic acid, 10mM/ml Na- $\beta$ -glycerophosphate,  $10^{-8}$ M dexamethasone이 포함된 DMEM 배지에서 배양한 세포군을 대조군으로, DMEM배지 ml당 40 $\mu$ g의 chitosan이 함유된 배지에서 배양한 세포군을 실험군으로 하여 11일간 배양한 후, 배지를 제거하고 1.5% glutaraldehyde 용액으로 2시간 동안 고정하여, 칼슘 침착부위를 확인하기 위해 Alizarin red S용액으로 염색한 후 0.1M 인산완충생리식염수로 여러번 세척하고 2% Light Green SF로 대조염색하여 도립현미경하에서  $1.5 \times 1.5\text{cm}^2$  격자내에 염색된 석회화 결절수를 측정하였다.

#### 4. 통계분석

세포증식율, 단백질 합성능, 염기성 인산분해효소 활성도 및 석회화 결절수에 있어서의 chitosan 투여군의 유의성을 평가하기 위해 Student t-test( $P<0.01$ )를 실시하였다.

### III. 연구 성적

#### 1. 세포증식율 측정

대상 세포를 chitosan을 넣지 않은 대조군과

ml당  $40\mu\text{g}$ 을 접종 배양한 실험군으로 하여 증식된 세포수를 측정 비교하였다.

초기 접종 세포수  $2 \times 10^4 \text{cells/ml}$ 에서 치주 인대세포의 경우 배양 2일에는 대조군과 실험군에서 각각  $6.63 \times 10^4 \text{cells/ml}$ ,  $8.42 \times 10^4 \text{cells/ml}$ , 5일에는 각각  $11.75 \times 10^4 \text{cells/ml}$ ,  $12.80 \times 10^4 \text{cells/ml}$ 으로 실험군에서 더 높게 나타났다. 9일에는 각각  $21.32 \times 10^4 \text{cells/ml}$ ,  $18.43 \times 10^4 \text{cells/ml}$ 으로 실험군에서 더 낮게 나타났다(표 1, 그림 1).

두 개 관세포의 경우 배양 2일 ( $3.6 \times 10^4 \text{cells/ml}$ ,  $4.4 \times 10^4 \text{cells/ml}$ ) 9일 ( $17.2 \times$

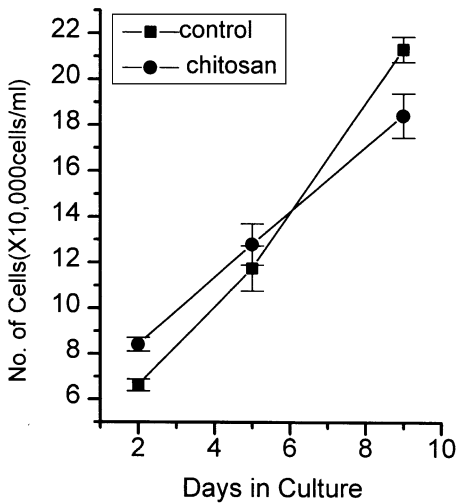


그림 1 The effect of chitosan on the proliferation of juman periodontal ligament cell

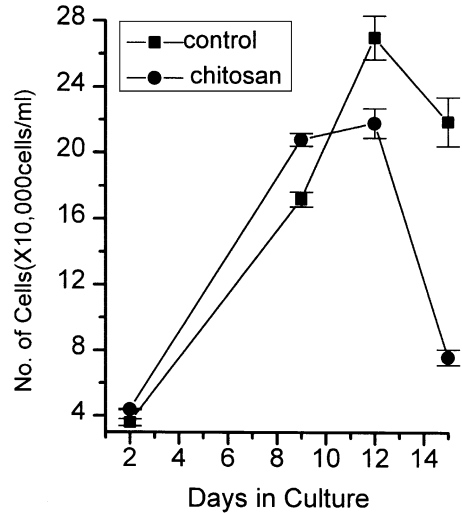


그림 2 The effect of chitosan on the proliferation of rat calvaria cell

표 1 Effect of Chitosen on the Proliferation of Human Periodontal Ligament Cell

Group	Number of Cells( ×10,000cells/ml)		
	2day	5day	9day
control	6.63 ± 0.252	11.75 ± 0.988	21.32 ± 0.548
chitosan	8.42 ± 0.305*	12.80 ± 0.905	18.43 ± 1.948*

Values are mean±S. E., n=3

Number of intial inoculated cell :  $2 \times 10^4 \text{cells/ml}$

\* : Statistically significant difference from control group ( $P<0.01$ ).

표 2 Effect of Chitosan on the Proliferation of Rat Calvaria Cell

Group	Number of Cells(×10,000cells/ml)			
	2day	9day	12day	15day
control	3.6±0.212	17.2±0.448	27.0±1.310	21.9±1.491
chitosan	4.4±0.035*	20.8±0.395*	21.8±0.901*	7.6±0.473*

Values are mean±S. E., n=3

\* : Statistically significant difference from control group (P<0.01).

표 3 Effect of Chitosan on the Proliferation of Human Gingival Fibroblast

Group	Number of Cells(×10,000cells/ml)		
	1 day	3 day	7 day
control	3.31±0.188	9.75±0.125	11.25±0.562
chitosan	1.94±0.188	8.69±0.563	9.69±0.469

Values are mean±S. E., n=3

표 4 Effect of Chitosan on the Protein Level in Human Periodontal Ligament Cell

Group	protein(μg/ml)	
	3 day	7 day
control	8,876±0.257	30,513±3,578
chitosan	16,729±1,453*	6,101±0.332*

Values are mean±S. E., n=3

\* : Statistically significant difference from control group (P<0.01).

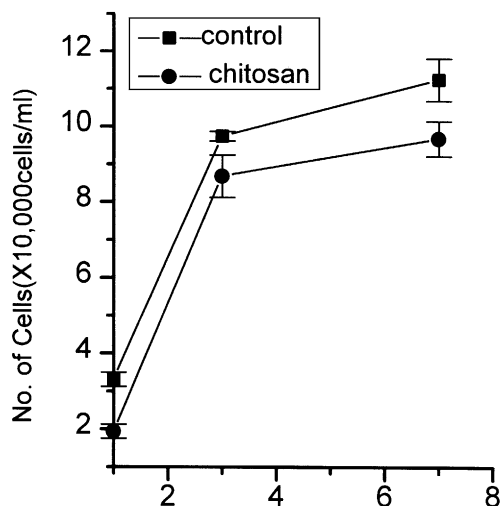


그림 3 The Effect of Chitosan on the Proliferation of Human Gingival Fibroblast.

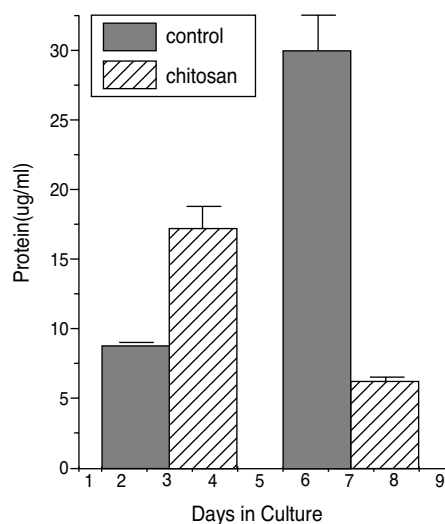


그림 4 Effect of chitosan on the protein level in human periodontal ligament cell

10<sup>4</sup>cells/ml, 20.8×10<sup>4</sup>cells/ml)에는 실험군에서 더 높게 나타났으나, 배양 12일(27.0×10<sup>4</sup>cells/ml, 21.8×10<sup>4</sup>cells/ml), 15일(21.9×10<sup>4</sup>cells/ml, 7.6×10<sup>4</sup>cells/ml)에는 대조군에서보다 실험군에서 더 낮은 증식율을 보였다(표 2, 그림 2)

치은섬유아세포의 경우에는 배양 1일(3.31×10<sup>4</sup>cells/ml, 1.94×10<sup>4</sup>cells/ml), 3일(9.75×10<sup>4</sup>cells/ml, 8.69×10<sup>4</sup>cells/ml), 7일(11.25×10<sup>4</sup>cells/ml, 9.69×10<sup>4</sup>cells/ml)에 걸쳐 전반적으로 대조군에서보다 실험군에서 세포증식율이 더 낮은 것으로 나타났으나 통계학적인 유의성은 없었다(P< 0.01)(표 3, 그림 3)

## 2. 단백질 합성능 측정

치주인대세포의 경우, 배양 3일에는 대조군과 실험군에서 각각 8.88μg/ml, 16.73μg/ml로 실험군에서 총단백질양이 더 많았고, 배양 7일에는 각각 30.51μg/ml, 6.10μg/ml으로 실험군에서 총단백질양이 더 적었다(표 4, 그림 4).

두개관세포의 경우 배양 3일에는 대조군, 실험군에서 각각 19.89μg/ml, 20.60μg/ml으로 실험군에서 더 많았지만, 배양 7일에는 각각 20.81μg/ml, 14.05μg/ml로 실험군에서 더 낮게 나타났다(표 5, 그림 5)

치은섬유아세포의 경우에는 배양 3일(23.16μg/ml, 24.12μg/ml), 배양 7일(25.35μg/ml, 23.93μg/ml)에 걸쳐서 두 군간의 총단백질양에 있어서의 차이는 통계학적으로 유의하지 않았다 (P< 0.01)(표 6, 그림 6)

## 3. 염기성 인산분해효소 활성도 측정

대상 세포를 chitosan을 넣지 않은 대조군과 1ml당 40μg을 접종 배양한 실험군으로 하여 염기성 인산분해효소 활성도를 측정하였다.

치주인대세포의 경우, 배양 3일에 대조군과 실험군 각각 1.41IU, 2.11IU, 배양 7일에는 각각 1.98IU, 5.55IU로 실험군에서 효소 활성도가 유의하게 높게 나타났다(P<0.01)(표 7, 그림 7).

두개관세포는 배양 3일에는 대조군, 실험군

표 5 Effect of Chitosan on the Protein Level in Rat Calvaria Cell

Group	protein(μg/ml)	
	3 day	7 day
control	19,891±0.985	20,808±1.816
chitosan	20,597±1.984	14,054±0.236*

Values are mean±S. E., n=3

\* : Statistically significant difference from control group (P<0.01).

표 6 Effect of Chitosan on the Protein Level in Human Gingival Fibroblast

Group	protein(μg/ml)	
	3 day	7 day
control	23,157±0.259	25,347±0.141
chitosan	24,122±0.330	23,934±0.188

Values are mean ±S. E., n=3

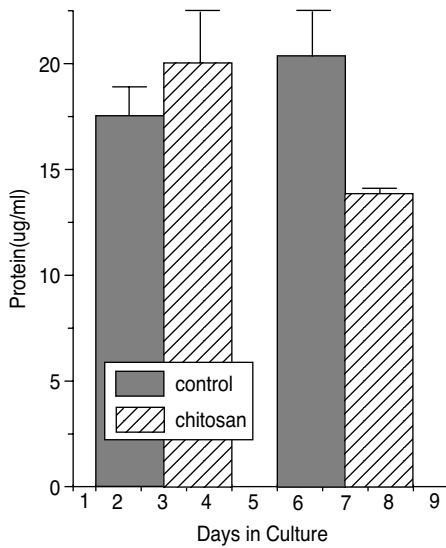


그림 5 Effect of chitosan on the protein level in rat calvaria cell

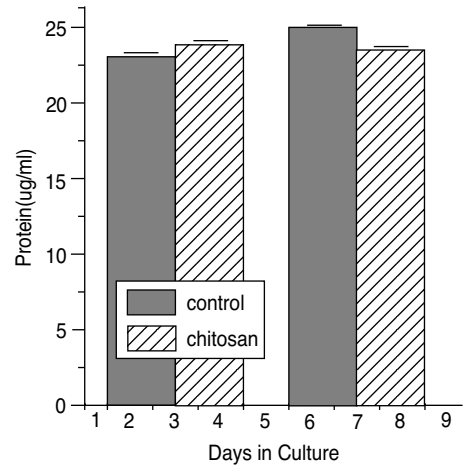


그림 6 Effect of chitosan on the protein level in human fibroblast

표 7 Effect of Chitosan on Alkaline Phosphatase Activity in Human Periodontal Ligament Cell

Group	ALP activity (IU)	
	3 day	7 day
control	1,414±0.496	1,984±0.123
chitosan	2,114±0.139*	5,547±0.135*

Values are mean±S. E., n=3

\* : Statistically significant difference from control group (P<0.01).

표 8 Effect of Chitosan on Alkaline Phosphatase Activity in Rat Calvaria Cell

Group	ALP activity (IU)	
	3day	7 day
control	3,346±0.2	5,232±0.04
chitosan	6,232±0.48*	5,492±0.17

Values are mean ± S. E., n=3

\* : Statistically significant difference from control group (P<0.01).

각각 3.35IU, 6.23IU로 실험군에서 유의성있게 높게 나타났으며, 배양 7일에는 각각 5.23IU, 5.49IU로 실험군에서 더 효소 활성도가 높았으

나 통계학적인 유의성은 없었다(표 8, 그림 8). 치은섬유아세포의 경우, 배양 3일(2.09IU, 1.86IU), 배양 7일(3.64IU, 4.26IU)에 걸쳐서

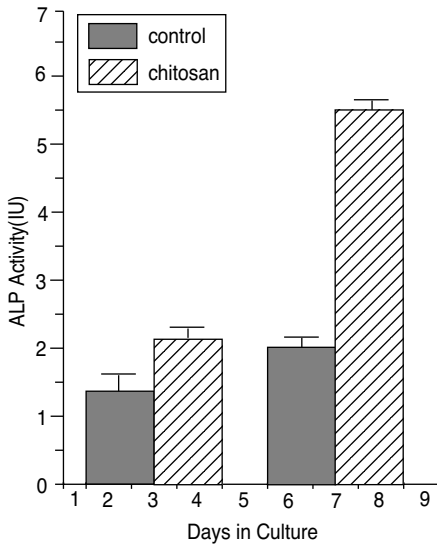


그림 7 Effect of chitosan on alkaline phosphatase activity in human periodontia ligament cell

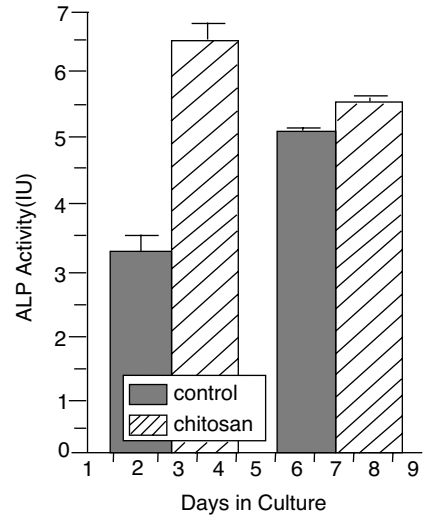


그림 8 Effect of chitosan on alkaline phosphatase activity in rat calvaria cell

표 9 Effect of Chitosan on Alkaline Phosphatase Activity in Human Gingival Fibroblast

Group	ALP activity (IU)	
	3 day	7 day
control	2,087 ± 0.232	3,640 ± 0.488
chitosan	1,855 ± 0	4,260 ± 0.179

Values are mean ± S. E., n = 3

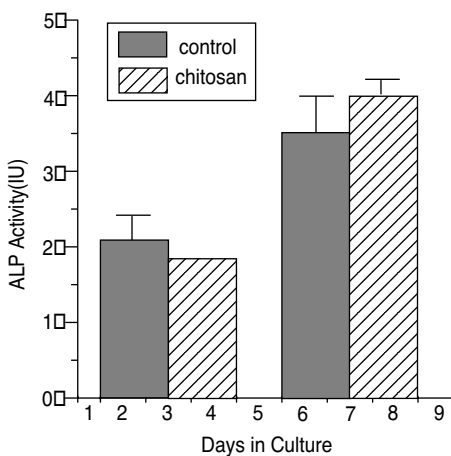


그림 9 Effect of chitosan on alkaline phosphatase activity in Human fibroblast

두 군간에 유의성 있는 차이가 없었다 ( $P < 0.01$ ) (표 9, 그림 9)

#### 4. 석회화 결절 수 측정

두개관세포를 결절형성용 배지에서 배양하고 배양 11일에 Alizarin red S 염색을 실시 결절수를 측정하여 chitosan을 투여하지 않은 군과 투여한 군간에 비교하였다. 결절은 원형으로 주위에 세포가 밀집되어 있고, 결절 중앙 부위가 진하게 농염되고 주위로 연하게 염색되는 양상을보였다. chitosan을 투여하지 않은 군에서는 6개, 투여한 군에서는 10개로, chitosan을 투여한 군에서 유의성있게 많았다



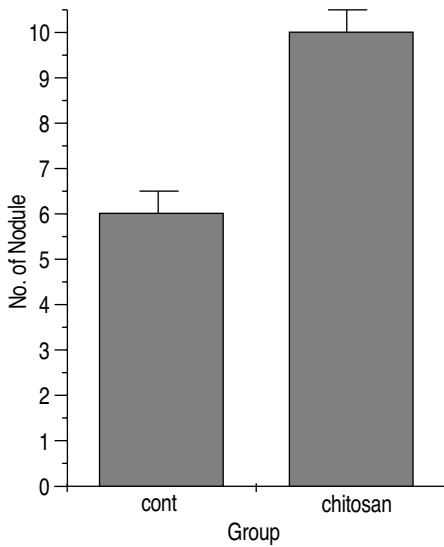


그림 10 Effect of chitosan on formation of mineralized nodule in rat calvaria cell

( $P<0.01$ )(그림 10).

#### IV. 총괄 및 고찰

치주조직은 경조직인 치근표면의 백악질, 치아를 지지하는 치조골과 두 조직을 연결 고정하는 치주인대 그리고 이를 파괴하는 치은등 각기 다른 구조를 갖는 4가지 조직으로 구성되어 있고, 교합력이 항상 가해지기 때문에 생물학적으로 특수한 형태와 기능을 가지고 있다. 결손부 치유과정에 가장 많이 관여하는 치주인대 내에는 다양한 세포가 존재하므로 다른 연조직에 비해 상대적으로 치유과정이 복잡한 양상을 갖게 된다. 치주조직의 이상적인 치유에는 치아와 치조골을 연결하는 치주인대의 재형성이 필수적이므로 치주인대세포가 치면으로 우선 부착하는 것이 절대적으로 요구되며 연이어 조골세포의 증식이 필요하다.

치주질환의 치료법으로는 우선 비외과적 시술을 시도함이 원칙이고, 일차적 치료에도 불

구하고 치주질환이 호전되지 않거나 지지골의 파괴가 현저할 경우, 재발된 경우에는 외과적 치주치료를 시도하게 된다. 특히 외과적인 치료법으로는 과거에는 질환에 이환된 병소부를 단순제거하는 치은절제술을 이용하였다. 그러나 각화치은양이 부족하거나 골내낭이 존재할 경우에는 적용할 수 없으며, 어느 정도는 건강한 정상조직의 제거도 감수해야 하며, 인접 치아의 지지조직 약화와 노출된 치근면에 의해 지각과민증이 유발되는 등의 단점이 제기 되었다. 따라서 가급적 조직제거가 적으면서 치주낭을 제거할 수 있는 시술 형태로 변형 위드만씨법이 발표되었다<sup>1)</sup>. Lasho등(1983)<sup>23)</sup>은 치석제거술이나 치근면 활택술만으로는 치주질환에 노출된 치근면으로부터 모든 치태나 치석을 제거할 수 없다고 하였으며, 치근면으로부터 독성물질을 제거하고 노출된 치근면을 깨끗이 하며, 치근면을 탈회시켜 상아질이나 백악질의 콜라겐 기질을 노출시켜 치근면과 결합조직간의 부착을 촉진하는 약제에 대한 관심이 높아졌다. 치근면 처리에 이용되는 약제에는 구연산, 염산테트라사이클린, fibronectin등이 있으며, 아직은 여러 학자들간에 논란의 여지가 있기는 하지만, 치근면처리가 치유과정에 효과를 갖는다는 견해가 일반적으로 인정되고 있다. 치주조직의 치유형태는 치주외과 처치후 창상치유 부위로 이주되는 세포형에 따라 결정되므로, 치유과정중 치은섬유아세포와 치은결합조직세포가 치근면에 접촉하는 것을 막는 동시에 노출된 치근면에 인접한 창상부위로 치주인대세포와 치조골세포가 선택적으로 이주, 증식하도록 하는 연구가 진행되어 조직유도재생술이 도입되어 이용되고 있다<sup>24-26)</sup>.

골조직은 일생동안 지속적으로 재생되는 대사조직이다. 골대사과정은 동일조직내에서 파골세포에 의한 골흡수와 조골세포에 의한 골형성이 상호 보조적 혹은 상호 견제적인 현상으로 동시에 발견되는 결합현상이라 할 수

있다. 무엇보다도 치주질환의 최종적인 결과는 치조골소실로 인한 치아발거이므로 치료에 있어서 소실된 치조골 회복은 매우 중요하다. 골형성을 향상시키는 화학물질에 관한 연구에서 최근 Polypeptide Growth Factor에 대한 관심이 높은 데, Piche와 Graves(1989)<sup>27)</sup>는 골세포 배양시 Platelet-Derived Growth Factor(PDGF)를 첨가한 경우 세포 증식이 촉진되었다고 하였으며, Lynch등은 PDGF나 Insulin-like Growth Factor(IGF-I)를 단독으로 치주결손부에 적용시켰을 때 생체내에서 신생 치조골과 백악질형성을 자극할 수 있으며 이들을 혼용시 그 효과가 상승하였다고 보고하였다. 또 Lynch등(1991)<sup>28)</sup>은 titanium implant주위에 PDGF와 IGF-I를 처리하면 implant 주위에 치조골이 빠르게 형성됨을 보고하였다.

chitin과 chitosan은 cellulose 다음으로 가장 풍부한 천연 생체중합체다. chitosan은 작은 새우, 게, 바닷가재 등과 같은 무척추동물의 외골격과 곰팡이의 세포벽 및 곤충의 표피의 중요한 구조 성분인 chitin을 강알칼리로 처리하여 결사슬을 탈아세틸화시켜서 제조한다. chitosan(1-4, 2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glucan)은 구조적으로 hyaluronic acid와 유사한 polycationic complex carbohydrate로서, 분자량은 800-1,500Kd이다<sup>5)</sup>. chitosan은 대식세포의 증식을 촉진시킴에도 불구하고 독성이 없고 생체적합성, 생물분해성을 가지며, lysozyme에 의해서 점차 해축(depolymerization)되어 6개월 이내에 완전 흡수된다<sup>6)</sup>. 이는 D-glucosamine의 단일중합체가 아니라 40%이상의 N-acetyl-D-glucosamine residues를 포함하는 공중합체다<sup>7, 11)</sup>.

이 연구에서 배양 초기에는 chitosan투여군에서 대조군에 비해 세포증식이 더 많았으나, 치주인대세포는 9일, 두개관세포는 12일부터는 세포증식이 대조군에 비해 적었다. 또한 충단백질량은 치주인대, 두개관세포 모두 배

양 3일에는 chitosan투여군에서 충단백질량이 더 많았으나 7일에는 더 적었다(표, 그림 1, 2, 4, 5). 이런 결과로부터 chitosan이 치주인대세포와 두개관세포의 세포증식을 억제한다고 결론내리기는 어렵고, 투여하는 chitosan의 농도와 투여방법에 따른 연구가 더 필요할 것이라 생각된다. Klokkevold등(1997)<sup>5)</sup>은 여러 번의 예비실험을 거쳐, 0.2% acetic acid 1ml당 2mg의 chitosan을 녹여서 제조한 chitosan용액 200 $\mu$ l가 세포 성장에 적절한 농도라고 보고, 200 $\mu$ l chitosan용액을 미량피펫으로 배양접시 바닥에 줄을 긋듯이 위치시켜 환기구에 두어 acetic acid를 휘발시켜 chitosan이 균일하게 분포되도록 하였다. 본 실험전의 예비실험에서 Klokkevold등의 실험<sup>5)</sup>과 같은 식으로 실험하였을 때는 세포가 chitosan 주위에는 전혀 자라지 않아서 chitosan 농도를 낮추어 0.2% acetic acid 1ml당 200 $\mu$ g을 녹여서, 배양액 1ml당 40 $\mu$ g이 포함되게 섞어서 실험하였다.

한편, 치은섬유아세포는 배양 1, 3 및 7일에 걸쳐서 chitosan투여군에서 증식이 억제된 것으로 나타났으나 통계학적인 유의성은 없었다(표, 그림 3). 이와 관련된 연구로 Van der Lei와 Wildevuur(1989)<sup>17)</sup>의 연구를 보면, chitosan용액에 담궈서 화학적으로 처리한 혈관 이식재는 섬유증식은 억제하고, 동맥벽을 재생시키는데 잠정기질로 기능하는 얇은 혈병층이 형성되도록 하여 정상적인 조직이 재생되도록 하는 반면, chitosan으로 처리하지 않은 혈관이식재는 주위에 섬유성 결합조직 즉 반흔으로 둘러싸여 있었음을 알수 있다. 또, Klokkevold등(1997)<sup>5)</sup>은 모든 대조군은 7일 이내에 세포가 밀생상태에 도달하였으나 chitosan으로 처리한 배양접시에서 배양한 세포군은 밀생상태에 도달하지 않은 것으로 보아, 명백히 chitosan은 섬유아세포의 부착과 증식에 대해 억제효과를 갖는다고 하였다. 이번 실험에서는 유의성 있는 결과를 얻지 못했지

만, 일반적으로 chitosan은 섬유증식을 억제하고 organized tissue reconstruction을 촉진하므로써 창상치유를 향상시키는 것으로 생각된다.

치은섬유아세포의 증식속도는 치주인대세포, 두개관세포보다 더 빠른 것으로 나타났는데, 이런 우리의 결과는 일반적으로 창상치유과정의 조직내에서 치은섬유아세포가 치근면에 먼저 부착하여 치근흡수를 야기하게되는 기전을 뒷받침하는 결과라 여겨진다.

이 연구에 나타난 염기성 인산분해효소 활성도의 측정 결과, 치주인대세포의 경우에는 배양 3, 7일에 chitosan투여군에서 대조군보다 더 높게 나타났는데(표, 그림 7), 이는 chitosan이 염기성 인산분해효소 활성도를 증가시킨다고 한 Namita등(1988)의 연구를 뒷받침한다<sup>6)</sup>. 조골세포와 유사한 치주인대세포의 특징으로 염기성 인산분해효소 활성도가 높고, 전체 교원질의 95%이상이 제1형 교원질로 구성되고 부갑상선 호르몬에 대한 반응으로 cyclic AMP가 증가하고, osteonectin과 biglycan과 같은 골관련단백질을 생합성한다는 점을 들 수 있다. 그러나 조골세포의 marker가 아직 밝혀지지 않았고, 염증성 인산분해효소 활성도를 포함해서 다른 요소들도 조골세포임을 증명하는 결정적인 특징이라고는 할 수 없다. 현재로서는 in vitro 실험에서 치주인대세포로부터 석회화 결절 형성을 유도하는 것이 치주인대세포가 조백악세포와 조골세포로 분화하여 각각 백악질과 치조골의 재생에 관여한다는 결정적인 증거가 될 수 있다<sup>29-31)</sup>. Arceo등(1991)<sup>29)</sup>은 in vitro 실험에서 치주인대세포가 같은 환자로부터 채득한 치은섬유아세포보다 더 높은 염기성 인산분해효소 활성도를 보이며 석회화 결절을 형성함을 확인하고, in vitro에서 치주인대세포는 어떤 약제가 석회화를 기시하고 촉진시킬수 있는 지를 결정하는 데 이용될 수 있다고 하였다.

인등(1996)<sup>32)</sup>은 치주인대세포와 치은섬유아세포의 혼합배양에서 치주인대세포의 혼합비율이 감소함에 따라 염기성 인산분해효소 활성도(ALPase)는 비례적으로 감소하였고 이러한 결과로 미루어보아 ALPase 활성도는 치은섬유아세포의 영향없이 치주인대세포의 절대양의 차이에 의해서 영향을 받는 것으로 생각되며, 결절이 형성되기 시작하면서 이 효소가 감소하는 것으로 보아 ALPase 활성도는 결절형성 초기에 주로 관여하는 것으로 여겨진다고 하였다. 염기성 인산분해효소는 유기인산 에스테르를 가수분해하여 석회화가 이루어지는 부위에서 국소적으로 인산이온의 농도를 증가시키는 효소로서, 세포외기질에 calcium phosphate를 침착시킴으로써 석회화를 유도하는 기능을 갖는다. De Bernard(1982)는 염기성 인산분해효소가 석회화가 이루어지는 부위에서 국소적으로 인산이온 농도를 증가시켜 단백질을 인단백으로 전환시키고 이것이 칼슘결합 성향을 가지므로 인단백질이 석회화의 핵으로서의 역할을 한다고 하였다<sup>33-35)</sup>. 그러므로 염기성 인산분해효소 활성도를 증가시킨다는 것은 석회화를 촉진하는 것으로 볼 수 있다. 한편 두개관세포의 경우에는 배양 3, 7일에 chitosan투여군에서 염기성 인산분해효소 활성도가 더 높았으나 배양 7일에는 두 군간의 차이가 통계학적인 유의성이 없었는데, 이는 이미 7일 이전에 석회화 결절이 형성되어, 염기성 인산분해효소는 결절형성 초기에 주로 관여하므로 배양 7일에는 그 활성도가 낮게 나타난 것으로 추정할 수 있다.

chitosan이 골재생에 미치는 영향에 관한 in vivo실험을 살펴보면, Kawakami등(1991)<sup>19)</sup>은 쥐를 대상으로 Ito등(1991)<sup>22)</sup>의 방법에 의해 제조한 chitosan-bonded hydroxyapatite self-hardening paste에 대한 피하조직의 반응을 연구한 실험에서, 주위 조직에 대해 이물질임에도 불구하고 무해하였으며 석회화되지는

않았지만 주위육아조직에 균일한 골양기질이 형성되었음을 관찰하였다고 하였으며, 1992년에는 이전의 연구 결과를 바탕으로, 이 paste를 골결손부에 적용한다면 골전도가 일어날 수도 있을 것이라는 생각에서, 토끼를 대상으로 하여 골막을 제거한 후 경골 표면에서 직접 1.5g 정도의 quick-hardening paste를 적용시켰을 때 방사선사진상에서 골양의 불규칙한 방사선불투과상을 관찰하였고 이것이 연골조직과 골조직인 것으로 판명되므로써 chitosan-bonded hydroxyapatite selhardening paste가 골전도성을 가지고 있으며, 임상적으로 생체활성을 갖는 골대체물로 유용하다고 결론지었다<sup>19)</sup>. 한편 Muzzarelli등(1993)<sup>6)</sup>은 10명의 환자를 대상으로 제3대구치 발치후 발치와와 치근단절제술후 골결손부에다 freeze-dried methylpyrrolidinone chitosan(soft sponge material)을 삽입하여, 발치와와 골결손부가 신생골조직으로 채워졌음을 관찰하였고, lysozyme에 의해 점차 해축 되어서 술후 6개월 후에는 완전히 흡수되었다고 하였고, 이에 의해 촉진된 골전도성은 골대체물로서 생체적합성이 있는 무기물질을 개발한다는 의미를 갖는다고 하였다. 또한 술후 1년후까지 어떠한 부작용도 관찰되지 않았으며 이는 in vivo에서의 methylpyrrolidinone chitosan의 생체적합성과 생물분해성을 입증하는 결과라고 하였다.

Muzzarelli등(1993)<sup>20)</sup>은 골결손부에 freeze-dried methylpyrrolidinone chitosan을 삽입하였을 때, 술후 60일후 신생골조직의 존재를 관찰할 수 있었으며, 이는 chitosan의 양이온성과 chelating ability와 관련이 있으며, 혈병-다당류 혼합체에 포함된 성장인자에 의해서 자극된 endosteal-periosteal and bone marrow osteoblast-like precursors가 막내화골을 일으킨 것이라고 하였다. 그후 Muzzarelli등(1994)<sup>21)</sup>은 imidazole군이 결합된 modified chitosan(IMIC)은 석회화를 촉진할 뿐만 아니라 골양조직을

형성하는 복합체의 생물학적 기능을 활성화시킬 수 있는 골유도성 생체중합체라고 하였다. Klokkevold등(1997)<sup>5)</sup>은 in vitro 실험에서 chitosan은 특수한 형태의 골전구세포(예를 들어 조골세포)의 이동과 분화를 향상시키는 기질로 작용하는 반면 섬유아세포와 같이 골형성을 억제하는 세포의 기능을 방해해서 골형성을 간접적으로 촉진할 수 있다고 하였다.

이 연구에 사용된 chitosan은 partially deacetylated chitin으로, 다양한 조직의 재생과 정에서 biostimulating activity를 갖는 것으로 알려져 있다. 수소이온농도 완충작용, 지혈작용과 항균작용에 의한 치아우식증 방지 효과의 관점에서, chitin 유도체를 함유한 치약과 틀니 세정제가 제조되었으며, 특이한 화학적, 생물학적 성질과 함께 용액, 분말, 얇은 조각, 겔, 필름 등의 여러 형태로 이용할 수 있으므로 chitosan은 아주 다재다능한 생체재료다.

여러 동물, 인체 실험에서, chitosan은 지혈작용을 향상시키고 창상치유를 촉진한다고 보고되었다. chitosan은 혈액의 세포성분과 재중합하거나 교차결합하며, 이 때 보통 혈액응고 인자는 관여하지 않는다고 알려져 있으며, William등(1983)에 의하면 chitosan 용액을 지혈제로 이용하면, 다공성 혈관이식제로부터의 실혈을 방지하고 내피 구경면을 지지하는 혈관화된 평활근이 자라들어오는 것을 허용한다고 하였다<sup>10-14)</sup>. Brandenberg등(1984)<sup>14)</sup>은 chitosan이 뇌 모세혈관 실혈을 조절하는 술중지혈제로 효과적이라고 하였다. 한편 Reynolds(1960)는 창상치유촉진을 위한 단당류 N-acetylglucosamine이용에 관한 과학적인 근거를 주장하였으며, Muzzarelli등(1988)은 N-carboxyalkyl chitosan은 화학적, 생물학적으로 glycosaminoglycans와 유사하여, 결합조직 재건을 유도하고 자극하는 작용이 있다고 하였고 그후 Muzzarelli등(1989)<sup>15)</sup>은 전층판막을 형성하여 골결손부에 chitosan ascorbate gel을 삽입하고, 유리치은판막과 치간유두에서 시행

한 연조직 생김에서, 치주조직의 good structural organization와 성숙한 세포성분을 갖는 풍부한 교원질성분, 선택적인 방향으로 주행하는 교원섬유를 관찰할 수 있었으며 임상검사에서 치아동요도와 치주낭 깊이가 유의성 있게 감소하였다고 하였다. 성형수술을 받은 환자의 피부이식편의 공여부를 freeze-dried N-carboxybutyl chitosan의 soft pad로 치료하였을 때, 조직화된 피하조직 재생이 촉진되었다고 하였으며, 이는 분할층 공여부에서의 조직 회복 과정을 조절하는 상황에서 중요한 임상적 의미를 가지며, N-carboxybutyl chitosan을 생물학적으로 활성이 있는 드레싱의 치료형태로 볼 수 있다는 Biagini등(1991)<sup>16)</sup>의 보고도 있다. 또한 Biagini등(1991)<sup>18)</sup>은 토끼 등쪽 피부의 외과적 창상부위에 N-carboxybutyl chitosan을 입힌 expander를 삽입하고서 피막조직 형성을 관찰하였는데, chitosan은 반흔조직 형성을 야기하는 반응성 과정보다는 조직의 올바른 증식과 조직화 현상을 촉진시키며, 어느 정도까지는 섬유생성을 억제하는 반면, 생리학적인 조직회복 과정을 자극하고 맥관형성을 촉진한다고 하였으며, N-carboxybutyl chitosan은 창상치유와 성형수술에서 생리학적, 심미적으로 확실한 결과를 얻고자 할 때 이용할 것을 추천하였다.

한편 Muzzarelli등(1990)<sup>8)</sup>은 N-carboxybutyl chitosan에 노출된 여러 미생물이 두드러진 형태 변화를 보였으며, 이런 항미생물 작용의 기전은 chitosan의 양이온성질로 인해 세균 표면에서 만들어지는 산성중합체(예를 들어, lypopolysaccharide, teichoic & teichuronic acid, capsular polysaccharide)와 상호작용해서 전체 질복합체를 형성하는 것과 관련이 있는 것 같다고 하였다. 이런 항균작용과 항칸디다작용은 반흔형성을 야기하는 2차 감염을 방지하는 데 기여할 수 있으므로 N-carboxybutyl chitosan은 wound dressing으로 이용하기에 적절하다고 하였다. N-carboxybutyl chitosan을

이용한 wound dressing은 조직의 ordered regeneration과 신생혈관 형성을 촉진하고, 가스 교환을 허용하며, 체액과 접촉시 젤을 형성하므로 신생조직에 손상을 주지 않고 제거 가능하다는 장점을 가지고 있다.

Tarsi등(1997)<sup>9)</sup>은 hydroxyapatite에 존재하는 소량의 modified chitosan은 Streptococcus mutans가 HA에 부착하는 것을 막아주는데, 이는 chitosan이 함유된 치약, 구강세정제, 껌을 사용함으로써 치면에 S. mutans가 집락을 형성하는 것을 감소시킬 수 있음을 의미한다고 하였다. Hirano등(1989)<sup>36)</sup>은 lysozyme과 chitinase에 의한 효소 가수분해 속도는 N-acetyl group의 치환도에 의해서 조절할 수 있으므로, chitosan을 조절된 약물 유리를 위한 약물수송체계의 기저물질로 이용할 수 있을 것이라고 하였다.

이번 in vitro 실험의 결과 chitosan을 투여한 경우 백서 두개관세포가 대조군에 비해 유의성있게 많은 석회화 결절을 형성했음을 알았고(그림 10), 이는 간엽기원세포를 chitosan으로 전처리한 배양접시에서 배양한 군과 0.2% acetic acid로 전처리한 배양접시에서 배양한 군으로 나누어 석회화 결절 수를 측정 비교하여, chitosan처리군은 각 배양접시당  $6.2 \pm 1.2$ 개인데 반해 대조군은  $3.6 \pm 0.6$ 개였다는 Klokkevold등(1997)<sup>5)</sup>에 의한 in vitro 실험의 결과와 일치하였다. 세포배양시 골성기질의 형성과 석회화에 필수적인 요소로는 ascorbic acid와  $\beta$ -glycerophosphate, dexamethasone등을 들 수 있다. ascorbic acid는 전 교원질분자(procollagen molecule)의 proline기를 hydroxylation 시켜서 삼중 헬릭스 구조를 안정화시키는 역할을 하여 세포배양시 골성기질 형성에 필수요소로 작용하고 조골세포와 같은 세포배양시 ATPase, 염기성 인산분해효소 활성도 및 단백질 합성능을 조절한다. synthetic glucocorticoid인  $\beta$ -glycerophosphate는 염기성 인산분해효소에 의한 가수분해되

어 석회화에 필요한 인산이온을 공급하는 역할을 한다. dexamethasone은 in vitro실험에서 적절한 농도로 배양액에 첨가시켰을 때 조골세포를 분화시켜 골형성을 증가시키며, 쥐의 두개골과 골수에서 채취한 조골성 dexamethasone으로 처리한 경우 골특이성의 표지 단백질인 osteopontin, 염기성 인산분해효소 그리고 osteocalcin의 합성이 증가하였다. 한편 dexamethasone이 부족한 배지에서는 치주인대세포뿐만이 아니라 조골세포도 결절이나 이와 유사한 치밀한 물질을 형성시키지 못하였다. 그 외에 in vitro상의 석회화 결절형성에 영향을 미치는 요소들로는 세포밀집도, 혈청, 세포공급원의 연령과 각종 성장인자들을 포함하는 cytokines등이 있다<sup>37-39</sup>). 본 연구에 이용된 Alizarin red S 염색법은 anthraquinone 염료로 조직 표면의 calcium의 존재를 chelate반응으로 증명해주는 방법이며 이 염료는 magnesium, mangan, barium, strontium, iron등에도 반응하므로 calcium에 대한 특이적인 염색은 아니나 세포내에는 calcium외에 다른 성분이 많지 않기 때문에 문제가 되지 않는다.

본 연구를 통해서 chitosan이 골형성을 향상시키는 잠재력을 가지고 있다고 본 다른 in vivo의 보고들을 세포 수준에서 뒷받침해줄 수 있는 결과를 얻었다. 또한 chitosan은 치주조직의 주구성원인 치주인대세포와 두개관세포의 증식, 단백질 합성능, 염기성 인산분해효소 활성도 및 석회화 과정에 많은 영향을 미치는 것으로 나타났다. 차후에는 chitosan 농도와 적용방법에 따른 영향에 관한 연구가 계속 진행되어야 할 것으로 생각된다.

## V. 결론

치주질환으로 인해 소실된 치주조직을 재생시키는 데 도움을 줄 수 있는 보조약제의 개발을 위해 chitosan(Poly-N-Acetyl Glucosaminoglycan)을 치주인대, 두개관 및 치은섬

유아세포에 적용하여 세포증식율, 단백질 합성능, 염기성 인산분해효소 활성도 및 석회화 결절 형성능을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. chitosan은 배양초기에는 치주인대세포와 두개관세포의 증식을 촉진시키다가, 각각 배양 9일, 12일부터는 오히려 이들 세포의 증식을 억제하는 것으로 나타났다. 치은섬유아세포의 증식은 전반적으로 억제하였으나 통계학적인 유의성은 없었다.
2. chitosan은 배양 3일에는 치주인대세포와 두개관세포의 단백질 합성능을 증가시키다가, 배양 7일에는 단백질 합성능을 감소시켰다. 치은섬유아세포에 대해서는 유의성 있는 영향을 미치지 않았다.
3. chitosan은 배양 3일, 7일에 치주인대세포와 두개관세포의 염기성 인산분해효소 활성도를 증가시키는 것으로 나타났으나, 배양 7일에 두개관세포의 염기성 인산분해효소 활성도에 대한 영향은 통계학적인 유의성은 없었다. 치은섬유아세포에 대해서는 유의성 있는 영향을 미치지 않았다.
4. chitosan은 두개관세포의 결절형성을 유의성 있게 증가시켰다( $P<0.01$ ).

결론적으로 chitosan은 치주인대세포와 두개관세포의 증식, 단백질 합성능 및 염기성 인산분해효소 활성도에 영향을 미치며, 골형성을 촉진하는 작용을 하는 것으로 나타났으며, 이러한 결과로부터 chitosan을 치주조직 재생술식에 임상적으로 응용할 수 있으리라 생각한다.

## VI. 참고문헌

1. Genco, R. J., Goldman, H. M. and Cohen, D. W. : Contempory Periodontics, C. V. Mosby, St Louis, PP

- 554-604, 1990.
2. Egelberg, J. : Regeneration and repair of periodontal defects. *J. Periodont. Res.*, 22 : 233-242, 1987.
3. Terranova, V. P. and Wikesjö, U. M. E. : Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cell of the periodontium. *J. Periodontol.*, 58 : 371-380, 1987.
4. 권영혁, 이만섭, 양승한, 김영, 박준봉 : 치주수술후 Zea Mays L. 투여가 치유과정에 미치는 영향에 대한 임상적 연구. *대한치주학회지*, 24(3) : 649-660, 1994.
5. Klokkevold, P. R., Vandemark, L., Kenney, E. B. and Bernard, G. W. : Osteogenesis enhanced by chitosan(poly-N-Acetyl Glucosaminoglycan) In vitro. *J. Periodontol.*, 67(11) : 1170-1175, 1996.
6. Muzzarelli, R. A. A., Biagini, G., Bellardini, M., Simonelli, L., Castaldini, C. and Fratto, G. : Osteoconductive exerted by methylpyrrolidinone chitosan used in dental surgery. *Biomaterials*, 14 : 39-43, 1993.
7. Lee, K. Y., Ha, W. S. and Park, W. H. : Blood compatibility and biodegradability of partially N-acylated chitosan derivatives. *Biomaterials*, 16(16) : 1211-1216, 1995.
8. Muzzarelli, R., Tarsi, R., Filippini, O., Giovanetti, E., Biagini, G. and Varaldo, P. E. : Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 34(10) : 2019- 2023, 1990.
9. Tarsi, R., Muzzarelli, R. A. and Pruzzo, C. : Inhibition of Streptococcus mutans adsorption to hydroxyapatite by low-molecular-weight chitosans. *J. Dent. Res.*, 76(2) : 665-672, 1997.
10. Kind, G. M., Bines, S. D., Staren, E. D., Templeton, A. J. and Economou, S. G. : Chitosan : Evaluation of a new hemostatic agent. *Current Surgery*, January-February : 37-39, 1990.
11. Malette, W. G., Quigley, H. J., Gaines, R. D., Johnson, N. D. and Rainer, W. G. : Chitosan: A new hamostatic. *The Annals of Thoracic Surgery*, 36(1) : 55-58, 1983.
12. Klokkevold, P. R., Fukayama, H. and Bertolami, C. N. : Effect of chitosan on lingual hemostasis in rabbits with platlete dysfunction induced by Epoprostenol. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 50 : 41-45, 1992.
13. Klokkevold, P. R., Lew, D. S., Ellis, D. G. and Bertolami, C. N. : Effect of chitosan on lingual hemostasis in rabbits. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 49 : 858-863, 1991.
14. Brandenburg, G., Leibrock, L. G., Shuman, R., Malette, W. G. and Quigley, H. : Chitosan : A new topical hemostatic agent for diffuse capillary bleeding in brain tissue. *Neurosurgery*, 15(1) : 9-13, 1984.
15. Muzzarelli, R. Biagini, G., Pugnalone, A., Filippini, O. and Baldassarre, V. : Reconstruction of parodontal tissue with chitosan. *Biomaterials*, 10 : 598-603, 1989.
16. Biagini, G., Bertani, A., Muzzarelli, R., Damadei, A., DiBenedetto, G., Belligolli, A. and Riccotti, G. : Wound namagement with N-carboxybutyl chitosan. *Biomaterials*, 12 : 281-286, 1991.
17. Van der Lei, B. and Wildevuur, Ch. R.

- H. : Improved healing of microvascular PTFE prostheses by induced of a clot layer : An experimental study in rats. *Plastic And Reconstructive Surgery*, 84 : 960-968, 1989.
18. Biagini, G., Pugnali, A., Damadei, A., Bertani, A., Belligoli, A., Bicchiera, V. and Muzzarelli, R. : Morphological study of the capsular organization around tissue expanders coated with N- carboxy-butyl chitosan. *Biomaterials*, 12 : 287-291, 1991.
19. Kawakami, T., Antoh, M., Hasegawa, H., Yamagishi, T., Ito, M. and Eda, S. : Experimental study osteoconductive properties of a chitosan- bonded hydroxyapatite self-hardening paste. *Biomaterials*, 13 : 759-763, 1992.
20. Muzzarelli, R. A. A., Zucchini, C., Ilari, P., Pugnali, A., Belmonte, M. M., Biagini, G. and Castaldini, C. : Osteoconductive properties of methylpyrrolidine chitosan in an animal model. *Biomaterials*, 14 : 925-929, 1993.
21. Muzzarelli, R. A. A., Mattioli-Belmonte, M., Tietz, C., Biagini, R., Ferioli, G., Brunelli, M. A., Fini, M., Giardino, R., Ilari, P. and Biagini, G. : Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. *Biomaterials*, 15 : 1075-1081, 1994.
22. Ito, M. : In vitro properties of a chitosan-bonded hydroxyapatite bone-filling paste. *Biomaterials*, 12 : 41-45, 1991.
23. Lasho, D.J., O'Leary, T.J. and Kafrawy, A.H. : A scanning electron microscope study of the effects of various agents on instrumented periodontally involved root surfaces. *J. Periodontol.*, 54 : 210-220, 1983.
24. Melcher, A.H. : On the repair potential of periodontal tissues. *J. Periodontol.*, 47 : 256-260, 1976.
25. Nyman, S., Gottlow, J., Karring, T. and Lindhe, J. : The regenerative potential of the periodontal ligament. *Journal of Clinical Periodontology*, 9 : 257-265, 1982.
26. Vergara, J.A., Quinones, C.R., Nasjleti, C.E. and Caffese, R.G. : Vascular response to guided tissue regeneration procedures using nonresorbable and bioabsorbable membranes in dogs. *J. Periodontol.*, 68 : 217-224, 1997.
27. Piche, J.E. and Graves, D.T. : Study of the growth factor regenerations of human factor requirements of human bone-derived cells : A comparison with human fibroblasts. *Bone*, 10:131-138, 1989.
28. Lynch, S.E., Buser, D., Hernandez, R.A. et al. : Effects of Platelet-derived growth factor/Insulin- like growth factors-I combination on bone regeneration around titanium dental implant. Results of a pilot study in beagle dogs. *J. Periodontol.*, 62 : 710-716, 1991.
29. Arceo, N., Sauk, J.J., Moehring, J., Foster, R. A. and Somermann, M. J. : Human periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro. *J. Periodontol.*, 62 : 499-503, 1991.
30. Yamashita, Y., Sato, M. and Noguchi, T. : Alkaline phosphatase in the periodontal ligament of the rabbit and macaque monkey. *Archs. Oral Biol.*, 32 : 677-678, 1987.
31. Nojima, N., Kobayashi, M., Shionome,



- M., Takahash, N., Suda, T. and Hasegawa, K. : Fibroblastic cells detived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts. J. Periodontol. Res., 25 : 179-185, 1990.
32. 인영미, 박준봉, 이만섭, 권영혁. : 치주 인대세포와 치은섬유아세포의 혼합배양이 석회화 결절형성에 미치는 영향. 대한치주학회지., 26(1) : 89-102, 1996.
33. Beertsen, W. and Theo Van Den Bos. : Calcification of dentinal collagen by cultured rabbit periodontium : The role of alkaline phosphatase. Matrix, 9 : 159-171, 1989.
34. Anderson, H.C. : Mechanism of mineral formation in bone. Lab. Invest., 60 : 320-330, 1989.
35. Bellows, C.G., Aubin, J.E. and Heersche, J.N.M. : Initiation and progression of mineralization of bone nodule formed in vitro: The role of alkaline phosphatase and organic phosphate. Bone and Mineral., 14 : 27-40, 1991.
36. Hirano, S., Tsuchida, H. and Nagao, N. : N- acetylation in chitosan and the rate of its enzymic hydrolysis. Biomaterials, 10 : 574-576, 1989.
37. Bellows, C.G., Aubin, J.E., Heersche, J.N.M. and Antosz, M.E. : Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. Calcif. Tissue Int., 38 : 143-154, 1986.
38. Beresford, J.N., Graves, S.E. and Smoothy, C.A. : Formation of mineralized nodule of bone formation? Am. J. Medical Genetics., 45 : 163-178, 1993.
39. Maniatopou, C., Sodek, J. and Melcher, A. H. : Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult adult rats. Cell Tissue Res., 254 : 317-330, 1988.

## Effects of chitosan on the characteristics of periodontal ligament, calvaria cells and gingival fibroblasts

Sun-Hee Kim, Young-Hyuk Kwon, Man-Sup Lee, Joon-Bong Park, Yeek Herr  
Department of Periodontology, College of Dentistry, Kyung-Hee University

Chitosan, with a chemical structure similar to hyaluronic acid, has been implicated as a wound healing agent. The purpose of this research was to evaluate the effects of chitosan on the characteristics of periodontal ligament cells, calvaria cells and gingival fibroblasts and to define the effects of chitosan on bone formation in vitro.

In control group, the cells were cultured alone with Dulbecco's Modified Eagle's Medium contained with 10% Fetal bovine serum, 100unit/ml penicillin, 100 $\mu$ g/ml streptomycin, 0.5 $\mu$ g/ml amphotericin-B. In experimental group, chitosan(40 $\mu$ g/ml) is added into the above culture condition. And then each group was characterized by examining the cell proliferation at 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15 day, the amount of total protein synthesis, alkaline phosphatase activity at 3, 7 day and the ability to produce mineralized nodules of rat calvaria cell at 11 day.

The results were as follows :

1. At early time both periodontal ligament cells and calvaria cells in chitosan-treated group proliferated more rapidly than in non-treated control group, but chitosan-treated group of periodontal ligament cells at 9 days and calvaria cells at 12days showed lower growth rate than control group.  
Gingival fibroblast in chitosan-treated group had lower growth rate than in control group but the difference was not statistically significant ( $P < 0.01$ ).
2. Both periodontal ligament cells and calvaria cells in chitosan-treated group showed much protein synthesis than in control group at 3 days, but showed fewer than in control group at 7 days. Amount of total protein synthesis of gingival fibroblast didn't have statistically significant difference among the two groups( $P < 0.01$ ).
3. At 3 and 7 days, alkaline phosphatase activity of periodontal ligament cells and calvaria cells was increased in chitosan-treated group, but at 7 days there was not statistically significant difference among the two groups of calvaria cells ( $P < 0.01$ ). Alkaline phosphatase activity of gingival fibroblast didn't have statistically significant difference among the two groups( $P < 0.01$ ).
4. Mineralized nodules in chitosan-treated group of rat calvaria cells were more than in control

group.

In summery, chitosan had an effect on the proliferation, protein systhesis, alkaline phosphatase activity of periodontal ligament cells and calvaria cells, and facilitated the formation of bone. It is thought that these effects can be used clinically in periodontal regeneration therapy.