

Flurbiprofen 함유 키토산 제제가 치은 섬유아세포에 미치는 영향

정종평* · 박윤정** · 이승진** · 유인철* · 최상묵*

*서울대학교 치과대학 치주과학교실

**이화여자대학교 약학대학

I. 서 론

치주질환치료에 있어서 치조골, 치주인대 재생을 위한 연구는 오래전부터 활발하게 이루어져 왔다.¹⁻⁸⁾ 이러한 예로는 골분말을 이식¹⁻³⁾하거나 골형성유도물질⁴⁻⁶⁾ 및 약물⁷⁻¹⁰⁾, 성장인자^{11, 12)} 등을 투여함으로써 손상된 부위의 결손회복을 도모하는 방법이 연구된 바 있고 물리적으로는 차폐막을 이용하여 상피조직과 치은결체조직을 격리함으로써 선택적으로 치주인대 및 치조골이 재생되도록 하는 방법이 개발되었다(유도조직 재생술, Guided tissue regeneration, GTR).¹³⁻¹⁵⁾ 한편 차폐막에 의한 치조골 손상부의 골재생을 촉진시키기 위해 손상부를 충전하여 치조골 및 치주조직의 재생을 촉진하며 자신은 생체내로 흡수되는 소재의 개발이 요구되는데 이러한 충전물질들이 갖추어야 할 조건으로는 다음과 같다.¹⁷⁻²⁰⁾ 생체적합성, 신생조직의 형성유도능력, 항균성, 지혈작용을 위한 친수성, 결손부 충전 용이성, 세포와의 친화성, 세포고정에 필요한 다공성 구조, 비면역원성, 활성물질의 조절방출능 등이 이상적인 충전물질이 갖추어야 할 조건으

로 제시되어진다. 오래전부터 동종골의 골조직 입자들이 이러한 목적으로 사용되어져 왔다. 골입자들은 세포와의 접착력 및 충전력도 부족하고 항원성도 문제점으로 지적되고 있지만 입자화 형태로 제공받을 수 있으며 특히 자체에 골형성단백질(Bone morphogenetic protein, BMP)을 함유하고 있어 이에 의한 조직 재생 능력이 기대되므로 최근까지 치주조직 재생 및 골대체물질로서 사용되어져 왔다.^{1, 21, 22)} 이외에 합성물질로서 비흡수성 경조직 대체 고분자물질(Hard tissue replacement, HTR)²³⁾ 인회석류(hydroxyapatite)²⁴⁾ 트리칼슘인산 세라믹²⁵⁾ 등이 있다. 이들은 골입자에 비해서 항원성이 거의 없으며 수급 및 조작이 용이하다. 그러나 이들은 감염에 민감하고 이식 후 자기들끼리 응집되며 조직재생에 관여되는 세포의 활성화와 치주조직 재생효과는 밝혀져 있지 않다. 이러한 배경에서 볼 때 물질 자체가 입자화되어 충전능을 가지고 있으면서 조직 재생을 유도시키는 한편 약물 및 조직성장인자를 효율적으로 봉입하고 이에 의해 조직 재생을 유도시킬 수 있는 기법이 요구된다.

의료용 소재로서 chitosan은 인공신장막^{26, 27)}

※ 이 논문은 1994년도 서울대학교병원 일반연구비 지원에 의해 이루어진 것임

으로 응용되어져 왔고 제산효과, 항괴양효²⁸⁾, 콜레스테롤 수치저하 작용²⁹⁾이 있어 의, 약학 분야에서 유용한 재료가 될 수 있다. Chitosan은 leukemia cell에 선택적으로 응집함³⁰⁾으로서 항암 효능을 갖는 약물의 담체로서도 유용성이 기대된다. 항암효과외에 chitosan은 박테리아, 바이러스 감염 및 암세포증식에 대항하는 비특이성 면역반응 활성화에 대한 효과적인 immunomodulator로서도 알려져 있다.^{30, 31)} 이는 macrophage와 natural killer cell의 살세포작용을 촉진하기 때문이다. 생체재료로서 chitosan은 화상부위를 보호하면서 새로운 조직의 재생을 촉진시키는 목적으로서 인공피부^{26, 32)}로서 사용되며 기계적 강도가 우수하고 물질의 투과조절이 용이하므로 생체흡수성 봉합사³³⁾ 및 인공신장용 막재료로 이용된다. 약제분야에서 chitosan은 용출제어성 조절방출능³⁴⁻³⁶⁾도 가지고 있으므로 이식용 제제에 활용될 수 있는 장점을 가지고 있다. 치주조직의 재생에 있어서는 치주인대 세포의 이동, 부착, 증식 및 분화가 핵심적인 요건인데, N-acetylhexosamine, polypeptide growth factor, O-carboxymethyl chitin, low molecular weight chitosan등이 치주인대 세포에 대한 화학 주성 및 세포분화에 효과가 있는 것으로 보고되었다.³⁷⁾ 치주인대 재생 및 치조골 재생에 있어서 chitosan의 작용은 chitosan내의 N-acetyl glucosamine 잔기에 기인^{37, 38)}하는데 구조적으로 glucosaminoglycan과 유사하며 세포내 fibroblast growth factor와 같은 성장인자와 결합하여 osteoblast와 같은 다양한 중배엽기원세포에 대해 mitogenic activity를 부여한다. 따라서 이러한 활성이 있는 chitosan을 적절한 크기로 입자화하여 이식한다면 조직재생에 있어서 그 효과를 발휘할 수 있을 것으로 예측되었다.

한편, 이러한 기술에 있어서 약물을 이용하면 조직재생에 있어 그 효율이 더욱 증진될 것으로 예측되었다. 이러한 목적에는 이미 과거에 경구, 혹은 주사투여하여 약물 효능만을

검색한 보고가 있다. 비스테로이드성 소염진통제 등의 약물³⁹⁻⁴⁵⁾은 PGE₂의 수치를 낮추고 치은염 등을 치료하였으며 성견에서 치조골의 흡수를 막아 골결손이 치유됨이 보고되었다. 또한 성인에 있어서도 약물 비투여군에 비해 flurbiprofen투여시 골결손이 유의적으로 치유됨이 보고되었다.⁴⁶⁻⁵⁰⁾ 그러나 현재까지 이러한 골결손치유에 적절한 약물의 농도는 결정되지 않았으며 효능을 발현하는 농도의 유지 개념도 확립되어 있지 않다. 또한 최근까지 이러한 약제는 경구로 투여하므로 골결손부까지 도달하는데 약물손실이 따르며 또한 전신적인 부작용의 위험도 있다. 따라서 국소 조직내로의 효과적인 약물 송달기법이 요구되는데 본 연구에서는 골이식대체물로 사용되어질 chitosan matrix에 flurbiprofen을 봉입하고 이들로부터 flurbiprofen이 어떠한 방식으로 용출되어 작용을 발현하는지 또한 얼마간 지속적인 효과를 나타내는지 관찰하여 chitosan matrix의 골조직 재생시스템으로서의 가능성을 예측하고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 약물을 함유하는 chitosan bead의 제조

Chitosan(Junsei chemical., Tokyo, Japan)을 녹인 용액에 flurbiprofen(태극약품, 서울, 한국)을 chitosan중량에 대하여 10%, 20%가 되도록 하여 가하고 교반하여 약물 함유 chitosan용액을 제조하였다. 약물이 함유된 chitosan액을 압축공기가 통과하는 droplet extruder nozzle(Dwyer Co., U.S.A.)을 이용하여 sodium tripolyphosphate(이하TPP, Showa chemicals, Tokyo, Japan)용액에 적하하였다. 이들을 2시간 동안 교반하여 순차적으로 젤화, 경화시켰으며 진공하에서 24시간 건조하였다. 제조된 chitosan bead의 형태는 시차주사현미경(JSM35F, JEOL Co., Tokyo, Japan)으로 표면

을 관찰하였다.

2. 약물의 용출실험

제조된 bead로부터 flurbiprofen의 방출측정을 위해 chitosan bead를 200 mesh의 내부로 둘러싸인 basket에 채웠다. 이를 0.1 M 인산완충액 (pH 7.4)에 넣은 후 shaking water bath (Dongyang Science Co., Buchon, Korea)에서 37°C, 15rpm을 유지시켰다. 일정시간 간격으로 whole media exchange법으로 방출액을 취해서 UV흡광도법으로 247nm에서 흡광도를 측정하여 용출된 약물량을 계산하였다.

3. 세포활성도에 미치는 효과

실험에 사용할 세포배양을 위해서 서울대학 병원에 교정치료를 위하여 내원한 환자의 제 일 소구치의 치은조직을 사용하였다. 채취직전에 큐렛(Gracey, Hu-Friedy Co., Chicago, IL, U.S.A.)을 이용하여 치석 및 치태 등을 제거하고 생리식염수로 여러 번 씻어내었다. 국소마취를 시행하고 치간부위에 내사면 절제를 가한다음 정상 치은조직을 채취하였다. 채취된 조직편을 100U/ml penicillin(Gibco Laboratories, Grand Island, NY, U.S.A.)과 100 μ g/ml streptomycin(Gibco)이 첨가된 α -MEM(Gibco)생검배지에 침수시켰다. 채취된 치은조직을 약1mm²로 세절한 다음 35mm 세포배양접시에 고르게 분산시켜 100U/ml penicillin과 100 μ g/ml streptomycin 및 10% FBS가 첨가된 α -MEM을 이용하여 세포배양을 시행하였으며 3일 간격으로 배양액을 교환해 주면서 5계대 배양시켰다. 배양시 습도는 95%, 온도는 37°C를 유지하면서 95%의 공기와 5%의 CO₂를 공급하였다.

계대배양한 치은섬유아세포를 0.25% trypsin EDTA(Gibco)용액으로 처리한 후 원심분리하여 배양액으로부터 세포부유액을 만들고 표준

혈구계산기로 well당 1×10⁵개의 세포수가 되게 하여 접종한 후 배양하였다. 24시간 후 배양액을 교환하고 48시간 후 배양액을 제거한 후 Hank's balanced salt solution(Gibco)으로 세척하였다. Chitosan bead는 약물을 넣지 않은 것과 10%, 20%로 flurbiprofen을 함유한 것을 소독한 후 각 well에 넣고 배양액을 200 μ l가 되게 하였다. 이들을 24시간 배양하고 생리식염수에 용해한 methylthiazol-2-YL-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)(Sigma)를 50 μ l씩 첨가하였다. plate를 잘 흔든 후 ELISA reader(THERMO max, Molecular devices, Bohannon, CA, U.S.A.)로 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료가 들어있지 않은 α -MEM배양액 well을 사용하였고 모든 실험 결과는 대조군에 대한 백분율로 계산하였다.

4. IL-1 β 생산억제 실험

4-1. 단핵세포 분리배양

전신질환이 없는 건강한 성인으로부터 heparin을 항응고제로 사용하여 60-120ml의 정맥혈액을 채집하였다. 채집한 정맥혈액을 Histopaque-1077(Sigma사, 미국)을 이용한 밀도차 원침법(Fisher와 Koren)을 이용하여 단핵세포를 분리하였다. 분리된 단핵세포는 phosphate buffer solution(PBS)으로 2-3회 세척하여 10% fetal bovine solution(FBS), 100U/ml penicillin과 100 μ g/ml streptomycin이 함유된 RPMI 1640 배지(Gibco사, 미국)으로 95%공기, 5% CO₂, 100%습도 조건하에서 무균적으로 배양하였다.

4-2. 혈액단핵세포에서 chitosan으로부터 용출된 약물이 IL-1 β 생성에 미치는 영향

배양된 혈액단핵세포를 24 well plate에 10⁶ cell/well로 분주하고 첨가물을 가하지 않은 RPMI 1640배지를 대조군으로 하고 E.coli LPS(25 μ g/ml)와 prednisolone(10nM/ml)을 첨

가한 well 및, LPS(25 μ g/ml)와 각 농도의 chitosan 제제로부터 방출된 flurbiprofen 방출액(10ml)을 첨가한 well을 실험군으로 하여 48시간 동안 부유배양하였다. 배양후 각 세포부유액을 모아 400 \times g으로 10분간 원심시키고 상층액을 모아 측정전까지 -80°C상태로 동결 보관하였다. 생산된 IL-1 β 의 양은 thymocyte stimulation assay로 측정하였다. 4-6주된 C3H/HeJ mice를 희생시켜 thymus를 무균적으로 적출하여 PBS로 세척한 후 RPMI 1640 배지가 담긴 petridish에 놓고 소독된 ground glass slide로 가볍게 비벼 부셨다. cell suspension을 10분간 100 \times g로 원심시킨 후 cell을 모아 신선한 배지로 107 cell/ml로 cell suspension을 만들고 96 well plate에 106 cell/well(100 μ l)로 분주하였다. 분주된 각 well에 앞서 준비된 sample을 각각 첨가하여 72시간 동안 무균적으로 배양하였다. 배양중 마지막 18시간 전에 0.5 μ Ci[3H]-thymidine을 각 well에 첨가하여 배양시킨 후 세포를 cell harvester(Skotron사, 미국)를 사용하여 모은 후 filter disc를 건조시켜서 cocktail solution에 용해시키고 liquid scintillation counter(Beckman사, 미국)으로 방사능을 측정하였다.

5. 치은섬유아세포에서 chitosan제제로부터 방출된 fluriprofen에 의한 PGE₂ 생성에 미치는 영향

5회 내지 7회 계대배양된 치은섬유아세포를 24 well plate에 α -MEM배지에서 105cell/well(1ml)로 분주한 후 rhIL-1 β (Genzyme사, 미국) 1ng/ml을 첨가하여 PGE₂ 생성을 유도하였는데, 아무런 첨가제를 가하지 않은 well을 대조군으로 하고 rhIL-1 β (1ng/ml)만을 첨가한 well과, rhIL-1 β (1ng/ml)과 chitosan제제로부터 용출된 각 농도의 flurbiprofen 방출액(10ml)을 첨가한 well을 실험군으로 하여 48시간 동안 무균적으로 배양

하였다. 배양 후 각 well의 배지를 수집하여 배지내의 PGE₂를 PGE₂ enzyme immunoassay system(Amersham사, 영국)을 이용하여 ELISA reader로 450nm에서 비색정량하였다.

6. 교원질 분해효소(Collagenase) 생산억제 능력 측정

6-1. crude enzyme의 추출

Crude enzyme은 Ono의 방법⁵¹⁾을 약간 변형하여 추출하였다.

1ml당 hemin 5 μ g과 menadione 0.5 μ g이 첨가된 Trypticase soy broth(BBL)에 3일간 37°C의 혐기성 배양기(10% CO₂, H₂ and 80% N₂)에서 *P. gingivalis* (W50)를 배양하였다. 이 세포들은 12,000 \times g에서 20분동안 원심분리를 해 제거되고 그 상층액을 침전시켜 최종농도가 80%되도록 한다. 침전물은 12,000 \times g에서 20분동안 원심분리하여 2mM CaCl₂를 포함하는 Tris-HCl buffer(pH7.5) 50mM 30ml에 용해시킨다. 이 부유액을 같은 buffer에 완전히 투석시키며 투석된 crude enzyme은 0.22 μ m filter에 통과시켜 본 연구에 사용하였다.

6-2. chitosan제제로부터의 flurbiprofen 방출액의 교원질분해효소 억제에 관한 분석

교원질 분해효소 억제능력은 Nagai등⁵²⁾의 Collagenokit CLN-100(Collagen Technological Co.)를 사용하여 결정하였다.

분석할 혼합물은 50mM Tris-HCl buffer(pH 7.5) 0.1ml와 brown tube에서 0.05% fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated collagen type I으로 구성된 substrate solution 0.2ml로 이루어져 있다. 효소 반응은 crude enzyme 0.2ml를 각각 첨가하여 실행하였다. blank실험 및 표준 실험에서는 5mM CaCl₂를 함유한 50mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)를 crude enzyme대신 사용하였다. 분석하고자 하는 chitosan제제로부터의 약물 방출액은 35°C

에서 120분 동안 배양하였다. 양성 대조 실험 군으로는 tetracycline을 사용하였다. 이 반응을 50% ethanol에 80mM o-phenanthroline 10 μ l을 첨가하여 중단시켰다. 이 혼합물을 37°C에서 60분간 더 배양하였고 표준 튜브는 80°C에서 10분간 가열하였다. 70% ethanol 0.5mM을 첨가한 후 각 혼합물을 흔들고 나서 바로 3,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 부유물의 형광정도(Fluorescence Intensity:FI)는 520nm(Em)/495nm(Ex)에서 spectrophotometer로 측정하였다. collagenase activity(U/ml)는 다음의 공식에 따라 계산하였다.

$$IU = \frac{FI_{\text{enzyme}} - FI_{\text{blank}}}{FI_{\text{standard}} - FI_{\text{blank}}} \times 100(\mu\text{g}) \times \frac{1}{120(\text{min})} \times \frac{1}{0.2(\text{ml})}$$

위 공식에서 IU는 분(min)당 1 μ g의 교원질을 소화하는 것을 나타낸다.

7. 치은섬유아세포의 총단백질과 교원질 합성능력

사람 치은섬유아세포를 24 well plate(Corning사, 미국)에 well당 1 \times 10⁵개의 세포를 접종한 다음 10% FBS가 첨가된 α -MEM에서 3일간 배양한 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척하였다. 그 후 50 μ g/ml ascorbic acid와 50 μ g/ml β -aminopropionitril이 함유된 α -MEM으로 교환한 다음 2 μ Ci[3H]-proline과 chitosan 제제로부터의 flurbiprofen 용출액, 혈소판 유도 성장인자(PDGF-BB), 인슐린형 성장인자(IGF)를 첨가한 배양액으로 세포를 배양하였다. 24시간이 경과한 후 생성된 총단백질과 교원질량을 Peterkofsky와 Diegelmann(1971)방법으로 측정하였다. 즉, 각 well에 250ml의 5 \times collagenase buffer(0.25M Tris, 0.025M CaCl₂와 0.012M N-ethylmaleimide함유, pH 7.4)를 첨가하고 얼음위에 놓고 30초간 초음파 분쇄기로 세포막을 파괴시킨 후 세포균질액 1ml에

5mg/ml BSA 200ml와 50% trichloroacetic acid/5mM proline 300ml를 첨가한 후 잘 혼합하여 0°C에서 5분간 방치한 다음 1000xg에서 5분간 원침하여 상층액을 버리고 5% TCA/mM proline으로 3회 세척하였다. 침전물 0.2N NaOH에 용해시킨 후 1M N-2-Hydroxyethyl piperazine-N-2-ethanesulfonic acid완충액(Sigma, U.S.A., 이하 HEPES완충액, pH 7.2)를 첨가하여 중화시킨 후 5 \times collagenase완충액 100ml를 첨가하였다. Microfuge tube에 각 용액을 반으로 나누어 넣은 후 교원질 합성량을 측정하기 위한 microcentrifuge tube에 15U collagenase가 함유된 collagenase bufer를 15ml주입하여 37°C에서 90분간 배양한 다음 collagenase활성도를 정지시키기 위해 0°C로 냉각시키고 각 tube에 50% TCA/2.5% tannic acid를 첨가하여 4°C에서 30분간 방치하였다. 교원질 합성량을 측정하기 위해서는 collagenase가 함유된 microcentrifuge tube를 1000xg에서 5분간 원침후 상층액과 5% TCA/1mM proline으로 세척한 세척액을 counting vial에 담아 10ml scintillation cocktail을 넣어 liquid scintillation counter(Packard, U.S.A.)로 5분간 방사능을 측정하였다. 총 단백질량을 측정하기 위해서 collagenase가 함유되지 않은 microcentrifuge tube를 100xg에서 5분간 원침 후 상층액을 버리고 5% TCA/1 mM proline으로 세척 후 침전물을 0.2N NaOH로 세포를 용해시켜 counting vial에 담가 상기의 방법으로 방사능량을 측정하였다.

8. 조직 반응실험

체중 200-250gm의 백서(Sprague-Dawley rat) 24마리를 대상으로 실험을 하였다. 백서를 에테르로 마취한 후 등을 깎고 0.5% chlorhexidine으로 소독하고 피하조직에 chitosan bead를 일정량 취하여 매식하고 봉합하였다. 매식 후 0, 1, 2, 4주에 동물을 희생시

키고 매식물을 주위조직과 함께 절제해내었다. formalin에 고정한 후 Haematoxilin - eosin(HE) 을로 염색하고 광학 현미경 (Olympus BH -2, Olympus Co., Tokyo, Japan)으로 조직학적 소견 및 흡수양상을 관찰하였다.

물의 함량을 10%, 20%로 달리하여 chitosan bead를 제조한 후 용출실험을 행한 결과이다.

III. 연구결과

1. Chitosan bead의 제조 및 용출실험

제조된 chitosan bead의 SEM관찰형태를 그림 1에 나타내었다. Bead의 크기는 평균적으로 250 μ m정도였으며 표면은 치밀한 구조를 나타내었고 깊은 주름이 관찰되었다. 그림 2는 약

그림 1. 제조된 Chitosan bead의 SEM관찰결과($\times 100$)

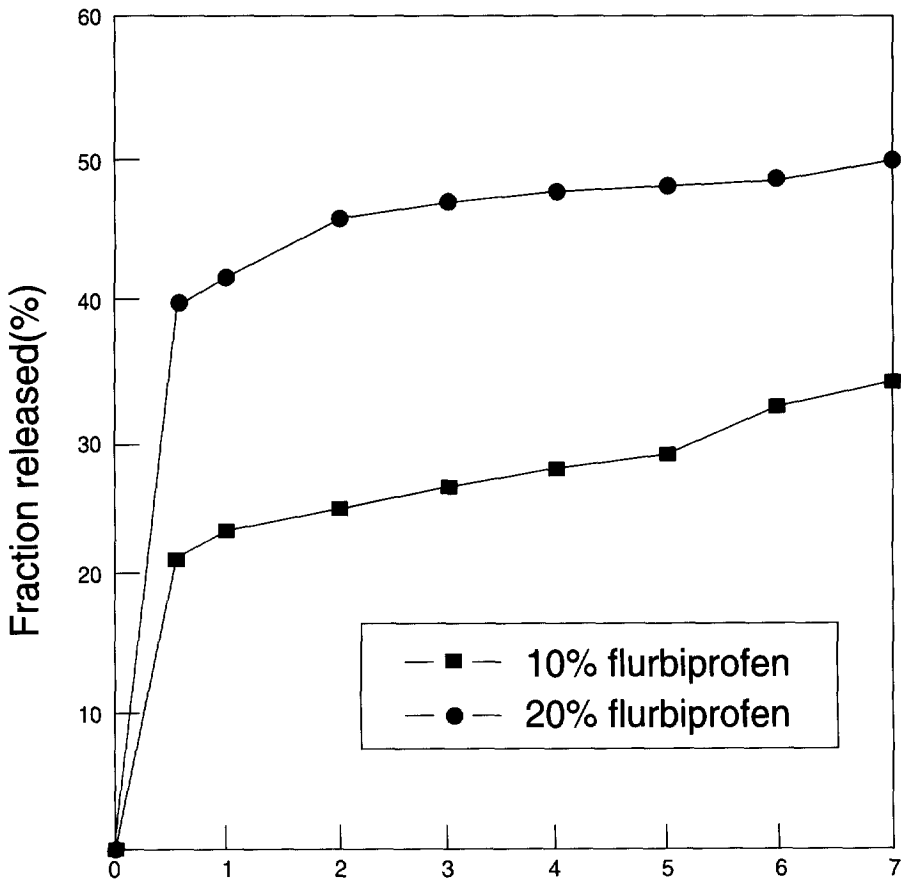


그림 2. Chitosan 제제로부터의 flurbiprofen의 방출실험결과

표 1. 10% 및 20% flurbiprofen 함유 chitosan 제제의 치은 섬유아세포 활성화 효과(N=4)

Sample	Cellular activity(%)	% Increase
α -MEM	100.00 \pm 4.7	-
10% flurbiprofen	107.10 \pm 4.1	7.1
20% flurbiprofen	93.72 \pm 5.2	-6.28
PDGF BB(100ng/ml)	111.52 \pm 3.2	11.52
IGF(20mg/ml)	106.91 \pm 5.8	6.91

significant at $p < 0.05$

표 2. 10% 및 20% flurbiprofen 함유 chitosan 제제의 IL-1 β 생산억제 효과 (N=4)

Sample	³ H - thymidine incorporation(cpm)	% Inhibition
control	313.5 \pm 6.8	-
LPS	1229.50 \pm 23.3	0
LPS + Prednisolone	507.20 \pm 11.5	58.75
LPS + 10% Flurbiprofen	484.20 \pm 7.3	60.62
LPS + 20% Flurbiprofen	407.50 \pm 14.6	66.86

significant at $p < 0.05$

10%, 20%로 flurbiprofen를 함유한 chitosan bead로부터 1일째 각각 25, 43%의 약물을 방출시킨 후 서서히 지속적으로 방출하여 7일째에는 33 및 50%의 약물을 방출하였다.

2. 세포활성도에 미치는 효과

세포활성도에 관한 영향은 α -MEM에서의 활성도를 100으로 하여 각각 chitosan bead로부터의 용출액의 효과를 백분율로 나타내었다(표 1).

아무 물질을 섞지 않고 α -MEM만의 효과를 대조군으로 하여 측정시의 10% flurbiprofen 함유 chitosan제제의 방출액의 세포활성도는 107.11을 나타내었고, 20%로 함유시는 93.72를 나타내었다. PDGF, IGF는 각각 111.52, 106.91의 세포활성도를 보였으며 이는 각각 11.52,

6.91%의 세포활성 증진효과를 보인 것이다. 본 실험에서는 10%로 flurbiprofen을 함유한 chitosan제제로부터의 용출액이 growth factor와 비슷한 세포활성도를 보였으나 20%로 약물의 함유량이 증가하면서 세포활성도가 저하되는 것을 관찰할 수 있었다.

3. IL-1 β 생산억제 실험

말초혈액에서 분리하여 배양한 단핵세포에 의한 IL-1 β 생성에는 사용한 각 생약 추출물들이 유의한 억제효과가 있는 것으로 나타났다(표 2). 대조군으로 사용한 RPMI 1640배지에서 단핵세포가 생성한 IL-1 β 는 31.35cpm으로 측정되었고, 25 μ g/ml의 LPS를 첨가하여 자극을 주었을 때 1229.5 cpm으로 측정되었다. LPS에 10nM/ml prednisolone을 첨가한 경우

표 3. 10% 및 20% flurbiprofen 함유 chitosan 제제의 PGE₂ 생산 차단 효과(N=4)

Sample	PGE ₂ (pg)	% Inhibition		
control	24.0	±	2.6	-
rhIL-1 β	61.0	±	0.9	0
rhIL-1 β +10% Flurbiprofen	7.4	±	1.6	87.87
rhIL-1 β +20% Flurbiprofen	7.2	±	2.1	88.2

significant at p < 0.05

표 4. 10% 및 20% flurbiprofen 함유 chitosan 제제의 PGE₂ 생산 차단 효과(N=4)

Sample	Activity(mU/ml)	Inhibition(%)
control	2322 ± 26.8	-
10% Flurbiprofen	1406 ± 21.5	40
20% Flurbiprofen	1308 ± 17.3	44
Tetracycline - HCl	1323 ± 27.5	43

significant at p < 0.05

표 5. 10% 및 20% flurbiprofen 함유 chitosan 제제의 치은섬유아세포의 총단백질 합성 및 교원질 합성에 미치는 효과(N=4)

Sample	Collagen(cpm/well)	% Increase	Total protein(cpm/well)	% Increase
a MEM	1091.50 ± 23.5	0	7932.25 145.3	0
10% Flurbiprofen	1201.50 ± 45.2	10.1	8887.50 68.5	12.1
20% Flurbiprofen	1233.50 ± 58.6	13.0	8065.50 111.8	1.7
PDGF BB(100ng/ml)	1136.75 ± 37.3	4.2	8874.25 176.5	11.9
IGF(20ng/ml)	1104.50 ± 10.8	1.2	8376.75 89.6	5.6

significant at p < 0.05

IL-1 β 의 양은 507.2cpm으로 측정되어 IL-1 β 의 생성 억제효과를 보였고, LPS와 10 및 20% flurbiprofen 함유 chitosan 제제로부터 방출액을 첨가했을 경우는 각각 484.2 및 407.5cpm으로 측정되어 유의한 IL-1 β 의 생성 억제효과가 있는 것으로 나타났다.

4. 치은섬유아세포에서 chitosan 제제로부터 방출된 flurbiprofen에 의한 PGE₂ 생성에 미치는 영향

치은섬유아세포의 PGE₂ 생성 억제효과는 PGE₂ enzyme immunoassay system을 사용하여

측정하였다. 표 3에서 나타난 바와 같이 배양 전 치은 섬유아세포는 IL-1 β 의 자극이 없는 상태에서 24pg의 PGE₂를 생성하며 rhIL-1 β 1 μ g/ml이 첨가되었을 때 61pg의 PGE₂를 생성하지만, 10%, 20% flurbiprofen 함유 chitosan 제제로부터의 방출액이 첨가되었을 때 각각 7.4 및 7.2pg의 PGE₂를 생성하여 IL-1 β 가 치은 섬유아세포를 자극하여 PGE₂를 생성하는데 chitosan 제제내에 함유된 약물이 억제효과가 있음을 나타내었다.

5. 교원질 분해효소(Collagenase) 생산억제 능력 측정

P. gingivalis crude enzyme를 이용하여 교원질 분해효과를 측정하였으며 crude enzyme의 교원질 분해 활성에 대한 chitosan 제제로부터의 flurbiprofen 방출액 및 tetracycline의 억제효과를 시험물질이 없는 대조군의 억제정도와의 비교하여 백분율로 표시하였다(표 4).

분해효소만을 사용한 대조군에서는 2322의 활성도를 보이는데 비해 10 μ g/ml의 농도의 tetracycline에서는 1323의 활성도로 43%의 억제효과를 나타내었고 chitosan 제제로부터의 flurbiprofen 방출액은 10%, 20% 함유시의 경우 1406 및 1308의 활성도를 보여 각각 40, 44%의 억제효과를 보였다. 세 물질 중 tetracycline이 가장 큰 억제효과를 보였으나 chitosan 제제에 함유된 flurbiprofen도 상당한 억제효과를 나타내고 있다.

6. 치은 섬유아세포의 총단백질과 교원질 합성능력

교원질 합성능력과 총단백질 합성능력은 표 5와 같다. 배지인 α -MEM만에서의 교원질 합성 및 총 단백질 합성능력을 100으로 한 백분율로 나타낸 결과 교원질 합성에 있어서는 대조군인 α -MEM만의 1091.50에 비해 100ng/ml

농도의 PDGF와 20ng/ml의 IGF는 1136.75, 1104.5로서 4.1%, 1.2%의 증가를 보였다. Chitosan 제제로부터의 flurbiprofen의 방출액은 10%, 20% 함유한 경우 1201.5 및 1233.0로서 각각 10.1 및 13%의 증가를 보여 PDGF나 IGF보다 우수한 효과를 나타내었다. 총단백질 합성능력에서는 α -MEM만을 넣은 대조군에 비해 PDGF는 8874.25로 11.9%, IGF는 8376.75로 5.6%의 증가를 보였으며 10%, 20% flurbiprofen 함유 chitosan 제제로부터의 방출액은 8887.5, 8065.5로서 각각 12% 및 1.7%의 증가를 보였다. 이중 10% flurbiprofen 함유 chitosan 제제로부터의 방출액은 PDGF와 유사한 증가효과를 보였다.

7. 조직 반응실험

그림 3에는 백서의 피하조직에 chitosan 제제를 매식하고 각 기간 별로 조직반응을 관찰한 결과이다. 1주째에는 염증세포의 침윤이 소량 관찰되었고 fibrotic encapsulation의 증상도 조금씩 나타나기 시작하였다. 2주째에는 염증세포의 침윤은 보이지 않았으며 주변의 세포는 긴 형태로서 fibroblast의 양상을 보였다. 또한 fibrotic encapsulation의 양상이 뚜렷하였으며 이시기부터 bead 변연부의 흡수가 시작되었음을 관찰할 수 있었다. 4주째에는 세포가 완전히 fibroblast의 양상을 보였으며 bead의 흡수반응이 더욱 뚜렷이 관찰되었다.

IV. 총괄 및 고안

Polycationic polysaccharide인 chitosan은 이온상호작용에 의해 다가 반대이온과 intermolecular 혹은 intramolecular linkage를 형성한다. 본 연구에서는 양이온으로 하전된 chitosan과 tripolyphosphate(TPP)의 음이온과 ionic interaction을 이용하여 chitosan bead를 제조하였다.

제조된 bead의 표면은 치밀한 구조를 나타내었고 깊은 주름이 관찰되었는데 이는 친수성 고분자용매인 물이 표면에서 증발하는 과정에서 형성된 것으로 사료되며 약물은 chitosan 용액내에서 용해되어 있는 것이 아니고 분산되어 있는 것이므로 용매가 증발하면서 표면으로 일부 노출된 것을 관찰할 수 있었다. 또한 chitosan bead 입자의 크기는 공기의 유속 및 pumping 압력으로 조절될 수 있다. Flurbiprofen과 같은 음이온성 약물을 봉입하여 제조할 때 문제점은 음이온으로 하전된 flurbiprofen이 gel bead를 제조하는 동안 pH가 높은 TPP 용액으로 누출되는 것이다. pH가 9.4인 TPP 용액에 의한 gel bead 형성시 flurbiprofen이 chitosan bead로부터 TPP 용액으로 손실되는 것을 관찰한 바 산성영역에서 용해도가 120 μ g/ml이었던 것이 pH가 9로 증가하면서 4900 μ g/ml로 증가하였다. 대부분의 약물이 pH 9.4인 TPP 용액으로 gelation시킬 때 3시간 동안 90% 손실되었다. pH 6에서는 손실이 30%로, pH 5에서는 손실이 15%로 감소되었다. Otagiri 등은 chitosan bead를 제조할 때 TPP의 pH가 6이하로 감소시 chitosan gel bead는 brittle 해지고 gel 형성이 되지 않는다고 보고하였으나 본 연구에서는 이를 개선하기 위하여 TPP내에서 gel화 및 경화를 동시에 실시하였는데 pH에 의한 gel bead의 형성능 저하는 관찰되지 않았다.

일반적으로 고분자 매트릭스로부터의 약물의 방출은 약물의 용해도, 고분자 내부구조 및 고분자와 약물의 상호작용에 의해 제어를 받는다. 약물의 함량이 증가할수록 용출율은 증가하였으나 용출거동은 초기 속방출 이후 plateau를 유지하였다. flurbiprofen은 pKa가 4.8이므로 chitosan의 양이온성 잔기와 이온성 상호작용이 가능하다. chitosan bead로부터 flurbiprofen의 용출은 확산 및 이온성 상호작용이 약물의 용출에 우세하게 작용을 한 것으로 사료된다. 실제로 용출후 잔량을 검토한 결과

방출이후 약물 함유 bead로부터는 거의 같은 양이 남아있는 것으로서 상호작용의 존재를 확인하였다. 때문에 약물의 용출은 이온성 상호작용이 주로 작용하며 약물의 대부분이 매트릭스내에 포착되어 있으며 trap되지 않은 소량의 약물이 chitosan내부 매트릭스를 확산에 의해 용출된 것으로 사료된다.

10%, 20% flurbiprofen을 함유한 chitosan bead의 경우 치은 섬유아세포에 대한 세포활성 억제효과를 나타내지 않았다. 100ng/ml의 PDGF-BB와 200ng/ml IGF의 세포활성에 대한 영향과 비슷한 수준의 효과를 나타낸 것으로 보아 안전한 것으로 판단된다.

항염효과 측면에서 볼 때 flurbiprofen은 LPS에 의해 자극된 단핵세포로부터의 IL-1 β 의 생성을 강력하게 차단하였다.⁵³⁾ IL-1 β 는 치은 섬유아세포로부터 PGE₂생산을 일어나게 하는데 flurbiprofen은 IL-1 β 의 생성을 억제할 뿐 아니라 강력한 cyclooxygenase 억제작용을 갖고 있는 물질로서, PGE₂의 생성을 동시에 억제한다. Cyclooxygenase는 arachidonic acid가 prostaglandin으로 전환되는데 작용하는 효소이다.⁵⁴⁻⁵⁹⁾

항생제인 tetracycline은 collagenase의 활동을 억제하는 효과가 큰 것으로 알려져 있다. 치주 질환과 관련된 collagenase의 근원은 다형핵 백혈구 collagenase와 interstitial collagenase가 있다. 본 연구에서는 flurbiprofen이 tetracycline과 유사한 collagenase 억제효과를 나타내었다. 이러한 결과를 볼 때 flurbiprofen은 우수한 항염효과를 갖고 있다는 것을 알 수 있다.

10%, 20% flurbiprofen이 교원질 합성 및 총 단백질 합성에 있어 대조군에 비해 약간 증가를 보인 것으로 보아 flurbiprofen이 세포활성 촉진 능력을 갖고 있으며 chitosan에 함유시켜 국소적으로 적용시 지속적으로 방출되어 상기의 효과가 오랜 기간 동안 유지될 것이며 전신적인 투여에 따른 부작용을 해소하고 치주염을 치료하는데 우수한 효과를 나타낼 것으로

사료된다. 또한 조직내 적용시에도 적절한 생분해성 및 생체적합성을 나타낸 것으로서 flurbiprofen함유 chitossan제제의 치주질환 치료 시스템으로서의 활용성이 기대된다.

참고문헌

1. Drury G et al., Effect of topical tetracycline on bone regeneration following freeze-dried bone allografts J Dent Res, 59, 364 1980.
2. Yukna R et al., Clinical evaluation of localized periodontitis defects treated with freeze-dried bone allograft combined with local and systemic tetracycline, Int. J.Periodontics Restorative Dent, 2(5), 9-15 1982.
3. Mabry T, et al., Freeze-dried bone allografts combined with tetracycline in the treatment of juvenile periodontitis., J Periodontol, 56, 74-81 1985.
4. Evans G et al., Effect of various graft materials with tetracycline in localized juvenile periodontitis., J Periodontol, 60, 491-497 1989.
5. Grotendorst GR, et al., Stimulation of granulation tissue formation by platelet derived growth factor in normal and diabetic rats, J.Clin.Invest, 76, 2322-2329 1986.
6. Boyne PJ, et al, Long term study of HA implants in canine alveolar bone J Oral Maxillofac Surg, 42, 589, 1984.
7. Murray VK, et al , Polymer implantation in periodontic endodontic lesions, New York Journal of Dentistry, 1991.
8. Amlaer MH, et al, Hard tissue replacement(HTR) polymer as an implant material, J Biomed Mater Res, 24, 1079-1089, 1990.
9. Eppley BL, Evaluation of HTR polymer as a craniomaxillofacial graft material, Plast Reconstr Surg , 86(6), 1085 -1092, 1990.
10. Boyne PJ, Bone induction and the use of HTR polymer as a vehicle for osseous inductor materials, Compend Contin Educ Dent(suppl), 10, S337-S341, 1988.
11. Cranin H, A polymeric bone replacement material in human oral and maxillofacial surgery, Compend Contin Educ Dent, 10, S321-S327, 1988.
12. Leake D, HTR Polymer, present and future applications Compend Contin Educ Dent, 10, S328-S329, 1988.
13. Shamiri S, Initial clinical response in human intrabony pockets to HTR polymer graft implants. Compend Contin Educ Dent 10, S348-S349, 1988.
14. Salman L, Clinical responses of HTR polymer as an implant material in oral surgery patients. J Oral Implantol,18(1), 24-28, 1992.
15. Kaban LB, Induced osteogenesis in the repair of experimental defects in rats, Proc Am Inst Biol 73, 291-306, 1980.
16. Preston D. Miller, The concept of the "Super clot" in osseous grafting, Compend Contin Educ Dent, Vol XIII, No. 3, 236
17. Selvig KA, Chemical analysis and microradiography of cementum and dentin from periodontally diseased human teeth. J Periodontol, 33, 303-310, 1962.
18. Register AA, Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin demineralized in situ, J Periodontol 47, 497-505, 1976.
19. Bogle G, et al, New connective tissue attachment in beagles with advanced

- indomethacin on bone destruction during experimental periodontal disease in the hamster, *J. Periodont. Res.*, 1983;18:110-117
43. Howel TH, Fiorellini J, Weber HP, Williams RC, Effect of the NSAID piroxicam, topically administered, on the development of gingivitis in Beagle dogs, *J. Periodont. Res.*, 1991;26:180-183
 44. Williams RC, Jeffcoat MK, Howell TH, Naproxen treatment of periodontitis in beagles, *J. Dent. Res.*, 1989;68:243
 45. Meserli LS, Turner DW, Chai JY, Stern PH, Effects of high concentration of flurbiprofen on bone remodelling in neonatal mouse calvaria, *Northwestern Dent. Res.*, 4(1) 9: -10, 1993.
 46. P. Goldhaber, Flurbiprofen treatment of human periodontitis, *J. Periodontal Res.*, 1988, 23, 381-385
 47. Vogel R, Copper SA, Schneider L, Goteiner D, The effects of topical steroidal and systemic nonsteroidal anti-inflammatory drugs on experimental gingivitis in man, *J. Periodontol.*, 1984, 247-252
 48. Waite IM, Saxton CA, Young A, The periodontal status of subjects receiving non-steroidal anti-inflammatory drugs, *J. Periodont. Res.*, 1981;16:100
 49. Hesman PA, Benn DK, Kelly PJ, Seymour RA, Atken D, The use of topical fluriprofen as an adjunct to non-surgical management of periodontal disease, *J. Clin. Periodontol.* 20(6) : 457-464 1993
 50. Hesman PA, Offenbacher S, Collins JG, Edwards G, Seymour RA, Flurbiprofen in the prevention and treatment of experimental gingivitis, *J. Clin. Periodontol.* 20(10) :732-738, 1993
 51. Ono M, Okuda K and Tkazoe I.: Purification and characterization of a thioprotease from *Bacteroids gingivalis* strain 381., *Oral Microbiol. Immunol* 2 : 77 : 1987
 52. Nagai H, Hori H, Hattori T, Sunada Y and Terado KL: A micro-assay method of collagenase activity and its application in the study of collagen metabolism in pathological tissues. *Inflammation* 4, 123(in Japanese), 1984.
 53. Williams RC, Jeffcoat MK, Howell TN, Reddy MS, Johnson HG, Hall CM and Goldhaber P., Ibuprofen: An inhibitor of alveolar bone resorption in beagles., *J. Periodontal Res.*, 23: 225-229 1988.
 54. Williams RC, Jeffcoat MK, Wechter WJ, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug treatment of periodontitis in beagles. *J. Periodont. Res.*, 1984;19:633
 55. Williams RC, Jeffcoat MK, Kaplan ML et al. Flurbiprofen : a potent inhibitor of alveolar bone resorption in beagles , *Science* 1985: 227:640
 56. Jeffcoate MK, Williams RC, Wechter WJ, et al. Flurbiprofen treatment of periodontal disease in beagles. *J. Periodont. Res.*, 1986;21:624
 57. Williams RC, Jeffcoat MK, Howell TH et al. Indomethacin or flurbiprofen treatment of periodontitis in beagles: effect on bone loss. *J. Periodont. Res.* 1987: 22:403
 58. Williams RC, Offenbacher S, Jeffcoat MK et al. Indomethacin or flurbiprofen treatment of periodontitis in beagles: effect on crevicular fluid arachidonic acid metabolites compared with effect on alveolar bone loss. *J. Periodon. Res.*, (in

- natural periosontitis, *J Periodont Res* 18, 220 – 228, 1983.
20. Stahl SS et al, Human clinical and histologic repair responses following use of citric acid in periodontal therapy, *J Periodontol* 48, 261 – 266, 1977.
 21. Cole RT et al, Connective tissue regeneration to periodontally diseased teeth – a histological study, *J Periodontol Res*, 15, 1 – 9, 1980.
 22. Stephe S. Hall, First in cell transplantation , *Science*, Vol 256, 1522(1992)
 23. P.J.Morris, The immunobiology of cell transplantation, *Transplantation proceedings*, vol 24, No. 6, p2865 1992.
 24. Freed.L.E, Joint resurfacing using allotraft chondrocytes and synthetic biodegradable polymer scaffolds , *J.Biomed. Mat. Res*, vol 28, 891 – 899(1994)
 25. Freed.L.E. et al, Comparison of cell – polymer cartilage implants, *Biotechnol. Bioeng.* 43, 605 – 614(1994)
 26. Riccardo A.A.Muzzarelli, Biochemical significance of exogeneous chitins and chitosans in animals and patients, *Carbohydrate Polymers*, 20(1993), 7 – 16
 27. Muzzarelli, R.A.A.(1989), In *chitin and chitosna eds. G. Skjak – Brack, T.Anthonsen & P.Sandford*, Elsevier, Amsterdam, pp 87 – 100
 28. Muzzarelli, R.A.A.(1990), In *Towards a Carbohydrate – Based Chemistry*, ECC, Brussels, pp 201 – 46
 29. Muzzarelli, R.A.A.(1992), In *Chitin Derivatives in Life Sciences ed. S. Tokura*. Japan Chitin Society, Sappro
 30. Muzzarelli, R.A.A.(1978), *Proc. 1st Int.Conf. Chitin Chitosan*, MIT, Cambridge, MA
 31. Muzzarelli, R.A.A.(1988), *Biomaterials*, 247 – 52
 32. Muzzarelli, R.A.A. et al., *Biomaterials*, 10, 598 – 603 (1989)
 33. Muzzarelli, R.A.A. et al, Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan, *Biomaterials*, 1994, vol 15, No. 13
 34. Y.K awashima. et al., Novel method for the preparation of controlled release theophylline granules coated with a polyelectrolyte complex of sodium polyphosphate – chitosan, *J. Pharm. Sci.*, 74(1985), 264 – 268
 35. R. Srinivasan et al., Polyelectrolyte complexes of glycol – chitosan with some polysaccharides, *Biopolymers*, 21(1982), 251 – 263
 36. R.Bodmeier et al, Preparation and evaluation of drug – containing chitosan beads., *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 15(1989), 1475 – 1494 Shigehiro Hirano, *Agric. Biol. Chem.*, 55(10), 2623 – 2625, 1991
 37. Toshio Hayashi et al., *Biomaterials* 1994, vol 15, No. 2
 38. *Biodegradable polymers as drug delivery systems*, edited by Mark Chasin, Dekka Press, 1990
 39. P. Goldhaber, *J Periodontal Res.*, 1987, 22, 403 – 407
 40. William RC, Jeffcoat MK, Howell TH, Reddy MS, Johnson HG, Hall CM, Goldhaber P, Ibuprofen: An inhibitor of alveolar bone resorption in beagles, *J. Periodont. Res.*, 1988: 23:225 – 229
 41. Jeffcoat MK, Williams RC, Wechter WJ, Jonson HG, Kaplan ML, Gandrup JS, Goldhaber P, Flurbiprofen treatment of periodontal disease in beagles, *J. Periodont. Res.* 1986:21:624 – 633
 42. Lasfargues JJ, Safar JL, Effects of

press)

59. Williams RC, Jeffcoat MK, Howell TH et al., Topical flurbiprofen treatment of

periodontitis in beagles., J. Periodont. Res.,
(in press)

Fig. 3a. Chitosan 제제의 백서 피하매식 1 주후 조직 소견 결과 (×100)

B : bead

C : connective tissue

Fig. 3b. Chitosan 제제의 백서 피하매식 1 주후 조직 소견 결과 (×400)

F : fibroblast

M : macrophage

B : bead

Fig. 3c. Chitosan 제제의 백서 피하매식 2 주후 조직 소견 결과 (×100)

F : fibroblast

B : bead

Fig. 3d. Chitosan 제제의 백서 피하매식 2 주후 조직 소견 결과 (×400)

F : fibroblast

B : bead

Fig. 3e. Chitosan 제제의 백서 피하매식 4 주후 조직 소견 결과 (×100)

R : resorption area

B : bead

Fig. 3f. Chitosan 제제의 백서 피하매식 4 주후 조직 소견 결과 (×400)

B : bead

C : connective tissue

F : fibroblast

Biological Effects Of Flurbiprofen Loaded Chitosan To Gingival Fibroblast

Chong - Pyoung Chung*, Yoon - Jeong Park**, Seung - Jin Lee**
In - Cheol Rhyu* and Sang - Mook Choi*

*Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Seoul National University

**Dept. of Industrial Pharmacy, College of Pharmacy, Ewha Womans University

The main goal of periodontal regeneration is to be achieved by epithelial exclusion, periodontal ligament cell activation or alveolar bone regeneration. The purpose of this study was to investigate on the physico-chemical and biological characteristics of biodegradable chitosan beads.

Chitosan beads were fabricated by ionic gelation with sodium tripolyphosphate and they had the size in 300 μ m diameter. As therapeutic agent, flurbiprofen was incorporated into the beads by 10, 20% loading contents. The release of drugs from the chitosan beads was measured in vitro. Also, biological activity tests of flurbiprofen loaded chitosan beads including cytotoxicity test, inhibition of IL-1 β production, suppression to PGE₂ production, collagenase inhibition test, the ability of total protein synthesis, and tissue response were evaluated.

The amount of flurbiprofen released from chitosan was 33-50% during 7 days. Minimal cytotoxicity was observed in chitosan beads. Flurbiprofen released from chitosan beads significantly suppressed the IL-1 β production of monocyte, PGE₂ production and markedly inhibited collagenase activity. Meanwhile, flurbiprofen released from this system showed increased ability for protein synthesis. Throughout 4-week implantation period, no significant inflammatory cell infiltrated around chitosan bead and also fibroblast like cell types at the beads-tissue interface were revealed with gradual degradation of implanted chitosan beads.

From these results, it was suggested that flurbiprofen loaded chitosan beads can be effectively useful for biocompatible local delivery system in periodontal regeneration.

Key words : Periodontal regeneration, Chitosan, Flurbiprofen, Local drug delivery system