키토산이 배양중인 치주인대세포에 미치는 영향

김옥수 · 정현주

전남대학교 치과대학 치주과학교실 및 치의학연구소

I. 서론

치주 치료 중 골 재생 술식의 목표는 치주질환으로 야기된 골 결손부에 새로운 골 성장을 촉진시키는 것이다. 최근 조직형성을 유도하는 적절한 생물질을 이용하여 동일한 생체조직을 만들고자 하는 새로운 접근으로 조직공학은 다양한 흡수성 기질에 분주된 세포를 배양하여 형성된 조직을 의미한다. 이런 조직공학의 주된 목적은 이식 가능한 생활 조직을 in vitro 환경에서 만드는 것이다. 골조직과 연조직에 대한 기질로는 합성 및 천연 인산칼슘, polylactic acid와 같은 다양한 합성물을 비롯하여 교원질, 섬유소, 키토산 같은 천연 중합체 등이 이용된다[1-8].

키틴은 자연계에서 풍부한 천연 생고분자로서 새우나 게와 같은 갑각류의 외골격을 이루는 주성분이며, 진균류나 곰팡이 또는 효모의 세포벽의 주성분을 구성하고 있는 매우 안정된 다당류이다[9]. 키토산(1 - 4, 2 - amino - 2 - deoxy - β - D - glucan)은 키틴을 고온의 강알칼리로 처리하여 측쇄(side chain)를 탈아세틸화하고 아민화하여 정제한 탄수화물이며 800 - 1500 Kd 고분자로서 hyaluronic acid와 비슷한 구조이다[10]. 키토산은 신체 조직과 유사한 글루코즈아민 결합으로 생체적합성이 우수하며, 생분해되며 독성이 없으며 금속이온을 킬레이트화하고[11], 용액, 분말, 박편, 겔 및 얇은 필름 형태로 공급되고 특이한 화학구조와 생물학적인 성질로 인하여 다양한 분야의 생체재료로 이용되고 있다.

키토산은 항섬유아세포 작용 때문에 피부 창상 치유에 도움이 되며[12] 사람의 구강 내 상처에 키토산을 적용하여 치유를 촉진시킬 수 있다는 보고가 있다. Sapelli 등[13]은 치주낭, 구개부 상처 및 발치창의 치유에 키토산 분말을 이용하여 만족할 만한 임상적 결과를 얻었음을 보고하였다. 키토산은 생체 재료로서 화상부위를 보호하면서 신생 조직의 재생 촉진의 목적으로 인공피부재로 이용되며 기계적 강도가 우수하고 물질의 투과 조절이 용이하므로 생체흡수성 봉합사로서도 활용성이 크다. 키토산은 배양피부의 진피를 만드는데 교원질과 함께 이용되기도 한다[14]. Muzzarelli 등[15]은 치주 결손부에 chitosan ascorbate 겔을 적용한 결과 치주조직 재생의 대체물로 제공할 수 있고 조직 재생의 효과를 증진시켜 임상적으로 좋은 결과를 보였고, 발치와 및 근단 절제술 후의 골 결손부에 적용한 결과 정상적인 골 형성이 촉진됨을 보고하였다.

골 이식재가 성공적이기 위해서는 골아세포의 부착 및 성장에 적절한 발판으로 작용되어야 한다. 또한 최근 조직공학적 연구가 활발해지면서 기질로 사용할 수 있는 합성물에 대한 연구들이 이루어지고 있으며 합성물에 대한 세포 부착에 관한 정보를 명확히 하는 것이 생명공학, 인공장기 등의 연구에도 중요하다. 세포의 부착, 증식, 형태 및 기능적 변화는 호르몬, 성장인자 등과 같은 생체 성분과 합성물 표면의 생화학적 특성에 의해 달라질 수 있다. 골세포에 대한 키토산의 효과를 관찰하기 위하여 Klokkevold 등[16]은 키토산을 세포 배양접시에 피복하여 백서의 두개관세포를 배양한 결과 키토산이 골전구세포의 분화를 돕고 골조직 형성을 촉진한다 하였고 김 등[17]은 배지내 키토산이 치주인대세포와 두개관세포의 알칼리성 인산분해효소 활성도 및 두개관세포의 골 결절 형성을 증가시켰다고 하였다.

이상과 같이 자연에서 쉽게 이용할 수 있는 이식재 중 하나인 키토산을 이용한 동물실험이나 임상적 적용이 이루어지고 있지만 키토산이 세포에 미치는 작용은 아직 분명하지 않으며 이에 대한 연구는 드물다. 이에 본 연구에서는 키토산이 치주인대세포의 부착, 증식, 형태 및 기능에 미치는 영향을 관찰하여 향후 치주조직 재생에 응용하고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 배양접시내 키토산 피복처리

0.1% 초산에 키토산을 각각 0.02, 0.2, 2 ㎎/㎖의 농도로 용해시킨 후 96 - microwell plate (Nunc, Denmark)에 35 ㎕, 24 - microwell plate (Costar, USA)에 60 ㎕씩 넣고 초산의 산성을 휘발시키기 위해 자외선 하 배기기 내에서 하루 동안 두어 건조하였다. Phosphate - buffered saline (PBS ; Sigma, USA)으로 1회 세척한 다음 다시 자외선 하 배기기 내에서 건조시켰다. 키토산은 평균 분자량이 400 KDa이고 (주)자광으로부터 제공받았다.

2) 치주인대세포의 배양

성인에서 교정치료를 위해 발거된 제 1 소구치와 제 3 대구치를 발거 직후 PBS로 3회 세척했다. 큐렛이나 15번 외과용 수술도를 이용하여 치근 중간 1/3 부위의 치주인대 조직을 얻은 후 2% 항생제(100 U/㎖ ampicillin, 100 ㎍/㎖ streptomycin (Gibco, USA))가 함유된 PBS로 5회 세척하고 약 1 x 1 x 1 ㎣ 크기로 세절한 후 35 ㎜ 세포 배양접시(Nunc, Denmark)에 5 6 개 조각을 배지 첨가 없이 30 분 동안 이산화탄소 배양기 내에 두었다. 조직이 배양접시에 부착되면 1% 항생제와 10% 우태아혈청(FBS ; Gibco, USA)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM ; Gibco, USA)을 첨가하였고 다음날 배지를 교환하고 그 후로는 3 일마다 교환하였다.

약 20 30 일 후 조직으로부터 성장된 세포가 밀생에 도달하면 PBS로 세척한 후 0.05% trypsin/0.53 mM EDTA (Gibco, USA) 1 ㎖를 첨가하여 37 ℃, 5% 이산화탄소 배양기 내에 5분간 두었고, 세포가 배양접시로부터 분리되면 10% FBS가 함유된 DMEM 배지 1 ㎖를 첨가한 후 1000 rpm에서 10 분간 원심분리하고 세포만을 모아 계대 배양하여 4 7 세대의 세포를 실험에 사용하였다.

2. 실험방법

1) 세포 부착도 및 부착세포 활성도 측정

계대 배양한 치주인대세포를 0.02 2 ㎎/㎖ 농도의 키토산이 피복된 96 - microwell plate에 1 X 10^4 세포 밀도로 분주하고 37 ℃, 5% 이산화탄소 배양기 내에서 배양하여 0.5, 1.5, 3, 6, 24 시간 후 도립 위상차 현미경(Olympus, Japan) 하에서 세포의 부착 및 형태 변화

를 관찰하고 사진 촬영하였다. PBS로 2 회 세척 후 0.05% trypsin/0.53 mM EDTA로 처리하여 부착된 세포를 배양접시로부터 분리한 다음 0.4% trypan blue (Gibco, USA)로 염색한 후 hemocytometer (Marienfeld, Germany)를 이용하여 광학현미경 하에서 세포 수를 세었다.

세포 활성도 평가를 위한 MTT 검사를 시행하였다. 각 well 당 배지 양의 1/10 인 20 μℓ MTT (Dimethyl thiazol-2-YL-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma, USA)를 첨가하여 37 ℃, 5% 이산화탄소 배양기 내에서 3 시간 배양한 후 MTT용액을 제거하였다. DMSO (Dimethyl sulfoxamide, Sigma, USA) 50 μℓ를 첨가하여 fumazon 결정을 녹였고 ELISA 판독용 immunoplate (Nunc, Denmark)에 옮긴 후 ELISA reader (Emax® precision microplate reader, Molecular Devices Corp, USA)를 이용하여 630 nm을 기준으로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 키토산이 함유되지 않은 용매만을 피복한 경우의 검사액을 대조군으로 하였다.

2) 세포 증식 및 세포 활성도 측정

계대 배양한 치주인대세포를 키토산이 처리된 96-microwell plate에 1 X 10^4 세포 밀도로 분주하고 배양하였다. 3 일 간격으로 배지를 교환하였으며 배양 후 2, 7 일에 세포 수를 산정하고 MTT 검사를 통하여 세포 활성도를 측정하였다.

3) 알칼리성 인산분해효소 활성도 측정

계대 배양한 치주인대세포를 키토산이 처리된 96-microwell plate에 1 X 10^4 세포 밀도로 분주하고 37 ℃, 5% 이산화탄소 배양기 내에서 배양하였다. 배양 4 일과 7 일 후에 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후 0.1% Triton-X 100 (Sigma, USA) 50 μℓ를 첨가하여 37 ℃에서 20 분간 세포를 용해시켰다. 40 μℓ 표본에 alkaline phosphatase buffer (Sigma, USA)를 첨가하여 405 nm에서 1 분과 2 분 후 p-NPP (p-nitrophenyl phosphate)의 비색 반응을 측정하여 효소 활성을 산출하였다.

4) 석회화 결절 수의 측정

키토산이 0.02 2 ㎎/㎖ 농도로 처리된 24-microwell plate에 치주인대세포를 3 X 10^4 세포 밀도로 분주하고 석회화 결절 형성을 유도하기 위하여 50 μg/㎖ ascorbic acid (Sigma, USA), 10 mM β-glycerophosphate (Sigma, USA), 10^{-7} M dexamethasone (Sigma, USA)이 함유된 DMEM 배지를 첨가하였다. 3 일마다 배지를 교환하여 21 일간 배양하였다. 키토산 자체가 골 형성을 유도할 수 있는 지 알아보기 위하여 석회화 결절 유도 물질을 첨가하지 않은 경우와 비교하였다.

Ca^{++}의 침착 부위를 확인하기 위하여 alizarin red 염색을 다음과 같이 시행하였다. 배양 접시의 배지를 제거한 후 PBS로 2 회 세척하고 3% formalin - PBS 용액 500μℓ를 첨가한 다음 10 분 동안 실온에서 고정하였다. PBS로 2 회 세척하고 건조한 후 2% alizarin red S 용액(pH 4.1 4.3, Sigma, USA)에 15 분간 담갔으며 증류수로 3 회 세척한 후 도립위상차 현미경을 이용하여 X100 배율 하에서 염색된 석회화 결절의 수를 세었다.

5) 통계 분석

각 실험은 4 6 배수로 시행하였고, 세포 부착률, 세포 증식률, 세포 활성도, 알칼리성 인산분해효소 활성도 및 석회화 결절 수의 평균치와 표준 오차를 산정하였고 대조군과 키토산 처리한 군과의 유의성을 평가하기 위하여 Student's *t* test($p<0.05$)를 시행하였다.

III. 결과

1. 도립 위상차 현미경 소견

계대 배양한 치주인대세포를 키토산이 0.02 2 ㎎/㎖ 농도로 처리된 96 - microwell plate에 1 X 10^4 세포 밀도로 접종하고 배양한 후 0.5, 1.5, 3, 6, 24 시간, 2 일, 7 일에 도립현미경 하에서 세포의 부착 양상, 밀생도 및 형태 변화를 관찰하고 사진 촬영하였다.

배양 30 분 후 아직 세포가 대부분 부착되지 않아 둥글었고(Photo 1) 배양 3 시간 이후에 부착되어 방추형으로 나타났다(Photo 2). 24 시간 후에는 약 70% 정도 세포가 붙어 있었다. 키토산을 피복한 군에서는 3 시간 후 부착된 세포가 여전히 둥글었고 6 시간 후에는 둥근 세포들이 응집되어 있었다. 0.02 ㎎/㎖ 농도에서 응집이 가장 두드러졌고(Photo 3), 2 ㎎/㎖ 농도에서는 두 세 개씩 둥근 세포의 응집이 있거나 주로 둥근 세포가 관찰되었다(Photo 4). 24 시간 후에는 응집된 세포들이 결절 양상을 보였다(Photo 5).

배양 7 일에 밀생에 도달하였고(Photo 6) 키토산 피복 부위에서 7 일에 둥근 세포들이 있는 부위는 밀생에 도달하지 않고 거의 증식되지 않았으며 둥근 세포, 방추형 세포, 결절처럼 응집된 세포들의 여러 모양이 관찰되었다. 0.02 ㎎/㎖와 0.2 ㎎/㎖ 농도에서 주로 응집된 세포가 관찰되었고 2 ㎎/㎖ 농도에서는 둥근 세포가 주로 관찰되었다(Photo 7). 세포 수 산정을 위한 트립신 처리 시 결절처럼 응집된 부위에서

Table 1. Number of periodontal ligament cells attached on chitosan coated well

	Concentration of coated chitosan (㎎/㎖)			
Culture periods	0	0.02	0.2	2
0.5 hr	45±4(100)	19±6(42)	15±2(33)**	96±13(213)*
3 hr	1971±210(100)	1284±242(65)**	928±189(47)*	122±30(6)**
6 hr	3759±403(100)	1788±313(48)*	1547±87(41)*	156±34(4)*
24 hr	7288±718(100)	5225±344(72)	3484±379(48)*	2347±361(32)**

Values are mean ±SE of cells (n=4).
Values in parentheses are percentile ratio related to the cell number of the control.
Number of inoculated cells : 1 X 10^4 cells
* : significantly different from the control by student's *t* test at $p<0.05$.
** : significantly different from the control by student's *t* test at $p<0.01$.

Table 2. MTT activity of periodontal ligament cells attached on chitosan coated well

	Concentration of coated chitosan (㎎/㎖)			
Culture periods	0	0.02	0.2	2
0.5 hr	0.075±0.004(100)	0.045±0.002(60)**	0.035±0.000(47)**	0.037±0.002(49)**
3 hr	0.066±0.002(100)	0.048±0.002(73)**	0.041±0.001(62)**	0.031±0.001(47)**
6 hr	0.094±0.006(100)	0.062±0.007(66)*	0.058±0.003(62)**	0.048±0.003(51)**
24 hr	0.118±0.003(100)	0.089±0.003(75)**	0.045±0.006(38)**	0.033±0.002(28)**

Table 3. The proliferation of periodontal ligament cells on chitosan coated well

Culture periods	Concentration of coated chitosan(㎎/㎖)			
	0	0.02	0.2	2
2 day	8273±702(100)	8476±365(102)	5143±324(62)**	1568±109(19)**
7 day	16523±1239(100)	20511±1525(124)	14465±1109(88)	5844±326(35)**

Values are mean ±SE of cells(n=6).
Values in parentheses are percentile ratio related to the cell number of the control.
Number of inoculated cells: $1X10^4$ cells
* : significantly different from control by student's *t* test at $p<0.05$.
** : significantly different from control by student's *t* test at $p<0.01$.

Table 4. MTT activity of periodontal ligament cells proliferated on chitosan coated well

Culture periods	Concentration of coated chitosan(㎎/㎖)			
	0	0.02	0.2	2
2 day	0.129±0.005(100)	0.110±0.005(85)*	0.094±0.002(73)**	0.026±0.002(20)**
7 day	0.196±0.007(100)	0.152±0.005(78)**	0.124±0.006(63)**	0.035±0.005(18)**

Values are mean ±SE of absorbance on 570 nm (n=6).
Values in the parentheses are percentile ratio related to the cell activity of the control.
Number of inoculated cell : $1X10^4$ cells
*: significantly different from control by student's *t* test at $p<0.05$.
**: significantly different from control by student's *t* test at $p<0.01$.

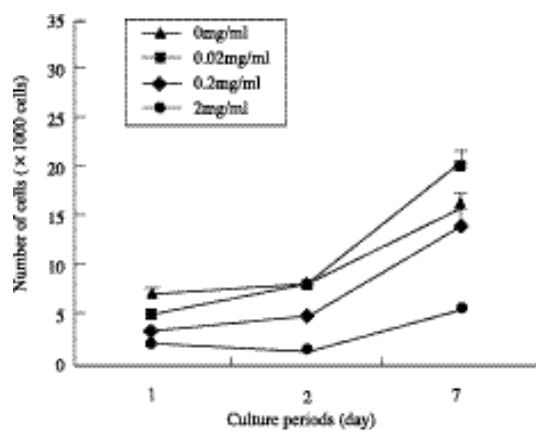


Figure 1. Effect of chitosan on the proliferation of human peridontal ligament cells

는 많은 세포들이 관찰되었고 방추형으로 부착되어 있던 세포보다 잘 분리되지 않았다(Photo 8).

2. 세포 부착에 대한 영향

치주인대세포는 분주 후 1.5 시간부터 부착되기 시작하여 24 시간 후 72% 정도가 부착되었다. 키토산 농도가 증가할수록 세포 부착률이 감소되었고 2 ㎎/㎖ 농도에서 초기에는 대조군

에 비해 부착이 많았지만 시간에 따른 부착의 증가가 둔화되었다. 그리고, 24 시간 후 세포 부착률은 0.02 ㎎/㎖ 농도에서는 대조군의 72%이었으나 통계적 의의가 없었고 0.2 ㎎/㎖와 2 ㎎/㎖는 각각 대조군의 48%, 32%였다(Table 1). 부착된 세포의 활성도는 키토산 피복시 초기에 전반적으로 억제되었으나 24시간 후 0.02 ㎎/㎖ 농도에서는 대조군에 비해 75%의 활성도를 보였으나, 0.2 ㎎/㎖는 38%, 2 ㎎/㎖는 28%로 활성도가 현저하게 억제되었다(Table 2).

3. 세포 증식에 대한 영향

배양 2 일에 0.02 ㎎/㎖ 농도는 세포 증식률이 대조군과 유사하였으나 0.2, 2 ㎎/㎖는 대조군의 62%, 19%로 세포 증식률이 감소되었다. 7 일에는 0.02 ㎎/㎖ 농도에서 대조군에 비해 세포 증식이 증가하는 경향을 보였다. 0.2 ㎎/㎖ 농도에서는 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였으나 2 ㎎/㎖ 농도에서는 대조군의 35% 정도로 세포 증식이 심히 억제되었다($p<0.01$)(Table 3). 세포 활성도도 키토산 농도가 증가함에 따라 억제가 크게 나타났으며, 0.2 ㎎/㎖ 이하의 농도

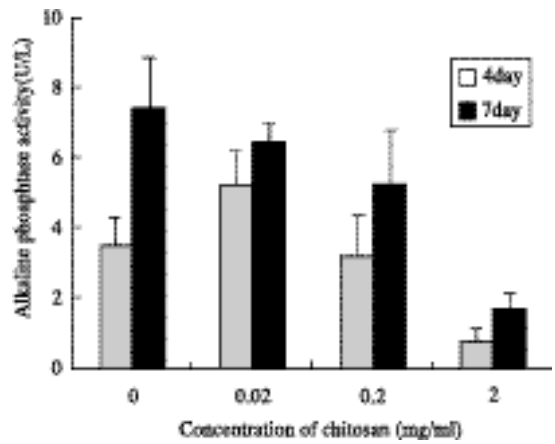


Figure 2. Effect of chitosan on the alkaline phosphatase activity of human periodontal ligament

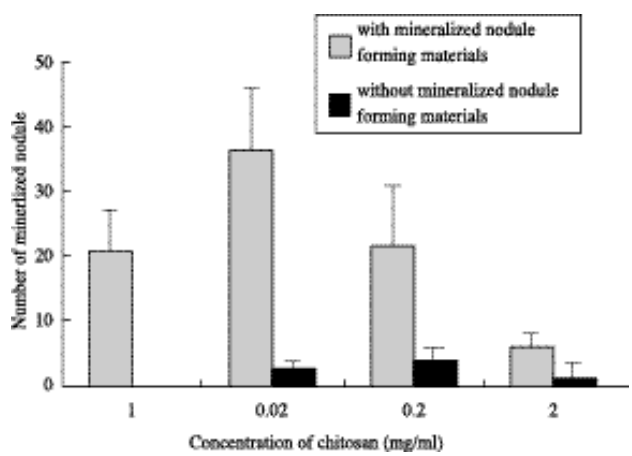


Figure 3. Effect of chitosan on the formation of mineralized nodule in human periodontal ligament

에서 대조군에 비해 유의하게 억제되었으며 2 ㎎/㎖ 농도에서는 2, 7 일에 대조군에 비해 20%, 18%의 활성도를 보여 세포활성도가 현저히 억제되었다($p<0.01$)(Table 4). 부착된 세포 수를 기준으로 평가한 경우, 대조군에 비해 0.02 ㎎/㎖ 농도에서는 증식률이 증가되었으며 0.2 ㎎/㎖ 농도에서는 유사하였으나, 2 ㎎/㎖ 농도에서는 유의하게 억제되었다(Figure 1).

4. 알칼리성 인산분해효소 활성도에 대한 영향

치주인대세포의 알칼리성 인산분해효소 활성도는 4 일 후 0.02 ㎎/㎖ 농도에서 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였고 0.2 ㎎/㎖ 농도에서 대조군과 유사한 수준을 보였다. 효소 활성도는 시일이 지남에 따라 증가하여 7 일 후 대조군에서 가장 높았으며 0.02 ㎎/㎖와 0.2 ㎎/㎖ 농도에서 각각 대조군에 비해 낮아지는 경향을 보였다. 2 ㎎/㎖ 농도는 4, 7 일에 효소 활성도 수준은 대조군의 25%, 24%로 억제되었다(Figure 2).

5. 석회화 결절 형성에 대한 영향

치주인대세포를 석회화 결절 유도 물질을 첨가한 군과 첨가하지 않은 군으로 나누어 배양하고 배양 21 일에 alizarin red S 염색하여 석회화 결절 수를 측정한 결과는 다음과 같다.

키토산 처리 부위의 세포들은 서로 응집되어 완전히 밀생에 도달하지 않았으며 석회화 결절은 원형으로 주위에 세포가 밀집되어 있고 결절 중앙 부위가 진한 오렌지색으로 염색되었고 그 주위가 연하게 염색되는 양상을 보였다(Photo 9).

치주인대세포는 석회화 결절 유도물질을 첨가 시 0.02 ㎎/㎖ 농도에서 대조군에 비해 더 많은 석회화 결절 형성을 보였고 석회화 결절 유도물질을 첨가하지 않은 경우 대조군에서 석회화 결절 형성이 관찰되지 않았으나(Photo 10) 키토산을 피복한 군에서 2 4 개의 석회화 결절을 보였다(Photo 11, Figure 3).

IV. 총괄 및 고찰

치주조직의 재생을 목적으로 여러 이식 재료가 어느 정도 성공적으로 이용되어 왔지만 이런 이식재들은 각기 한계점을 가지고 있다. 최근에는 부작용과 독성이 없으면서 치주 재생을 자극하는 생약제, 한약제 개발이 꾸준히 시도되고 있으며, 천연 중합체인 키토산을 치주조직 재생에 이용하려는 시도들이 있었다[15]. 키토산은 자연으로부터 얻기 쉬운 물질로 골전도성을 가지며 항미생물 작용을 한다. 이러한 키토산의 생체 실험은 많이 이루어졌으나 세포 수준의 연구가 아직까지는 드물어서 치주조직 재생에 중요한 치주인대세포의 기능에 어떤 영향을 미치는 가에 대한 연구가 필요하였다.

본 연구에서는 0.02 2 ㎎/㎖ 농도로 키토산을 피복하여 치주인대세포의 24 시간 이내 초기 부착률과 부착된 세포의 세포 활성도를 측정하였다. 모든 농도에서 치주인대세포의 부착 및 부착된 세포의 세포활성도가 억제되었으며 농도가 높아질수록 억제 경향이 두드러졌다. 24 시간 후 0.02 ㎎/㎖농도에서는 치주인대세포의 부착 억제가 회복되었으나 나머지 농도에서는 여전히 억제되었다. 이 결과로 치주인대세포의 초기 부착이 키토산 처리 시 억제됨을 알 수 있었다.

부착된 세포의 증식률을 평가한 결과 0.02, 0.2 ㎎/㎖ 농도로 키토산을 피복 시 7 일 후 대조군에 비해 치주인대세포의 증식이 증가되었으며 2 ㎎/㎖ 농도에서는 세포 증식이 억제되었다. 이는 농도가 높아질수록 부착 및 증식에 방해가 됨을 알 수 있었다. 0.02, 0.2 ㎎/㎖의 농도로 키토산 처리한 경우 대조군에 비해 치주인대세포의 증식이 증가하였는데 이는 치주인대세포 특유의 이질적인 특성에 기인하여 섬유아세

포의 특성을 가진 세포에 대한 자극보다는 골아세포의 특성을 가진 세포에 대한 것으로 추정된다[16].

김 등[17]은 0.04 ㎎/㎖의 농도로 키토산을 배지에 첨가한 후 치주인대세포와 두개관세포를 배양한 초기에는 키토산을 첨가한 군에서 증식이 증가하다가 각각 9 일, 12 일부터 증식이 억제되었다. 본 연구에서도 유사한 농도인 0.02 ㎎/㎖에서 치주인대세포의 증식이 촉진되는 동일한 결과를 보였다. 그러나 본 연구에서는 배지에 키토산을 첨가하지 않고 배양접시에 피복하였는데 이는 실제 임상적으로 키토산 첨가 후 시간에 따라 농도가 감소되는 효과를 재현하기 위한 것이었다.

키토산 피복 부위에 세포를 접종한 후 세포 부착과 증식이 이뤄지는 동안 세포 형태 변화를 도립 광학 현미경으로 관찰한 결과, 치주인대세포는 둥근 모양으로 부착되었고 세포 접종 후 약 6 시간부터 둥근 세포들이 서로 응집됨을 보였다. 이런 응집이 세포 배양 1 일에는 불완전하였지만 2 3 일 이후로는 세포의 응집이 유지되었다. 7 일 이내에 대조군의 세포들은 밀생에 도달하였으나 키토산 피복 부위에서는 밀생에 도달하지 않았고 세포들이 응집되어 있었으며 세포 자체의 활발한 증식은 관찰되지 않았다. Hamano 등[18,19]은 키토산을 다전해질 복합체(polyelectrolyte complex)와 혼합하여 피복한 후 치주인대세포를 배양하여 이런 세포의 응집이 있음을 보여 주었다. 이런 응집의 형성은 세포들의 fibronection 흡착이 방해되기 때문이라고 하였으며 응집이 일어남으로서 분화가 촉진되었다고 하였다. 또한 부착되지 않고 응집된 세포들을 세포 배양접시에 재접종해서 10 일간 배양했을 때 세포는 방추형의 퍼져 있는 세포로 완전히 분리되어 증식하였고 alizarin red 염색이 거의 염색되지 않아 세포 내 칼슘 이온이 감소되어 있다고 하였다. 이는 키토산에 의한 분화 과정이 가역적일 수 있음을 보여준다. 일반적으로 세포 배양접시에 배양된 세포들은 주로 단층으로 성장하고 탈분화된다. 그러나, 간세포[20], RINr[21], 각화세포[22], 골세포[23]는 몇몇 기질에서 3차원적인 세포의 응집을 보였다는 보고가 있었다. RINr의 3 차원적인 응집이 일어났을 때 인슐린의 분비 능력이 높았다고 한다[21]. 본 연구에서 나타난 키토산이 피복된 부위에서의 치주인대세포의 응집은 골형성을 위한 기능적인 분화의 과정이라고 추정할 수 있다. 또한 이런 응집된 세포는 트립신 처리 시 배양접시로부터 잘 분리되지 않았는데 이는 세포의 응집된 결합이 강하여 트립신이 잘 투과되지 않았기 때문이거나 트립신 기능을 억제하는 세포간 응집 기전 때문으로 생각된다.

알칼리성 인산분해효소 활성도의 측정 결과 치주인대세포의 경우 배양 4 일에 0.02 ㎎/㎖ 농도에서 대조군보다 높았으며 시일이 지남에 따라 증가하였다. 이는 키토산이 알칼리성 인산분해효소의 활성도를 증가시킴을 보여준다고 할 수 있다. 김 등[17]도 키토산이 두개관세포와 치주인대세포의 알칼리성 인산분해효소 활성도를 증가시켰고 두개관세포의 골 결절 형성을 유의성 있게 증가시켰다고 하였다. Ogata 등[24]은 사람의 치주인대세포의 알칼리성 인산분해효소 활성도를 12 일간 관찰한 결과, 이 기간 동안 효소 활성도가 계속해서 증가함을 보였고 본 연구에서도 치주인대세포의 효소 활성도가 7 일 동안 시일이 지남에 따라 증가되었다. 알칼리성 인산분해효소는 일반적으로 치주인대세포와 골아세포가 밀생 상태에 도달할 때까지 증가하며, 그 뒤에는 세포증식이 멈추고 세포는 분화기에 들어간다. 알칼리성 인산분해효소 활성도는 골아세포의 초기 분화기에 증가하므로 초기분화 표식자 중 하나라고 알려져 있는데, Arceo 등[25]은 in vitro 실험에서 치주인대세포의 알칼리성 인산분해효소 활성도의 증가는 석회화가 촉진됨을 반영한다고 보고하였다.

골 형성의 역할에서 치주인대세포는 배지 내에 ascorbic acid, β - glycerophosphate, dexamethasone이 존재하는 경우, 2 주 이상

배양했을 때 석회화 결절이 형성된다고 알려져 있다[26]. 즉 골성 기질의 형성과 석회화에 ascorbic acid, β-glycerophosphate, dexamethasone 등이 필수적인 요소로 작용한다. Ascorbic acid는 전교원질 분자의 proline기를 수산화시켜 삼중 헬릭스 구조를 안정화시키는 역할을 하여 골성 기질 형성을 위한 세포 배양의 필수 요소로 작용하고 조골양세포 배양 시 ATPase, 알칼리성 인산분해효소 활성도 및 단백질 합성능을 조절한다. β-glycerophosphate는 알칼리성 인산분해효소에 의해 가수분해되어 석회화에 필요한 인산이온을 공급하는 역할을 한다. Dexamethasone은 조골세포를 분화시켜 골 형성을 증가시키며, 쥐의 두개골과 골수에서 채취한 기질세포를 dexamethasone으로 처리한 경우 골특이성의 표지 단백질인 osteopontin, 알칼리성 인산분해효소 그리고 osteocalcin의 합성이 증가되었다. 한편 dexamethasone이 결여된 배지에는 치주인대세포뿐만 아니라 조골세포도 결절이나 이와 유사한 치밀한 물질을 형성시키지 못하였다[27-29]. 그 외에 석회화 결절 형성에 영향을 미치는 요소들로는 세포밀집도, 혈청, 세포 공급원의 연령과 각종 성장 인자들을 포함하는 cytokine, 비타민 D_3 등이 있다[27-30]. Cho 등[26]은 백서의 치주인대세포에 의해 형성된 석회화 결절을 분석한 결과, 골아세포에 의해 형성된 석회화 결절 부위의 세포 모양은 사각형이며 세포간 gap junction으로 되어 있으나 치주인대세포에 의해 형성된 석회화 결절의 세포 모양은 방추 형태로 골아세포 및 골세포로의 분화가 나타나지 않았으며 세포간 gap junction이 나타나지 않았다고 하였다. 이는 치주인대세포는 골 석회화 결절과 다른 형태의 석회화 조직을 형성한다고 하였다. Ramakrishnan 등[31]은 치주인대세포는 골과 백악질을 형성할 수 있는데 치주인대세포에 의해 형성된 석회화 결절은 골 형성보다는 백악질 형성과 관련된다고 하였으며 석회화된 조직의 성질을 명확하게 밝힐 수 있는 연구가 필요하다고 하였다.

본 연구에서는 석회화 결절 유도 물질을 첨가하지 않고도 키토산을 피복하여 치주인대세포를 배양시켰을 때 석회화 결절 유도 물질을 첨가한 경우보다는 적었지만 석회화 결절이 관찰되었다. 석회화 결절 유도 물질을 첨가한 경우에서도 0.02 ㎎/㎖농도의 키토산 피복 부위에서 더 많은 결절 형성을 보였다. 치주인대세포가 섬유아세포 또는 골아세포의 표현형을 갖는데[25,26] 키토산이 치주인대세포의 골아세포로의 분화를 촉진시켜 석회화 결절 형성이 유도되었다고 사료된다. 이런 결과로 보아 키토산이 골 형성을 촉진시키는 것을 알 수 있었다.

키토산의 작용 기전은 아직 분명하지 않지만, 키토산은 여러 성장 인자들의 생물학적 활동을 조절하는 다당류이며 세포의 표면에 배열되어 있는 glycan의 인식 결정인자로 기능하는 N-acetyl glycosamine을 가지고 있다. 키토산은 성장 인자에 붙어 중요한 세포 활성 과정을 기시하며[32] Chito-oligomer는 hyaluronic acid 합성에 기시 물질로 작용한다고 한다[33]. 키토산은 hyaluronic acid와 유사한 구조를 가지고 있어서 석회화 결절을 형성하기 위한 골원세포의 기질로서 작용하거나 골 결절 형성을 위한 발판으로 작용할 수 있다.

키토산의 골에 대한 효과는 이미 다양한 동물 모델에서 확인되었다. Malette 등[34]은 키토산을 이용하여 개에서 다리의 골 재생이 증진됨을 제시하였다. 또한 Muzzarelli 등[35]은 양의 고관절 과두에서 대조군에 비해 향상된 골 치유를 보였다. 키토산은 골 성장을 촉진하기 위해 다른 물질과 병용되기도 한다. Ito[36]는 키토산과 수산화인회석, 키토산과 β-tricalcium phosphate의 자가경화 기질을 만들어 치조능의 증진 또는 치주 결손부의 치료에 골 대체물질로 사용할 것을 제안하였다. 이 등[37]은 다공성의 키토산 스폰지와 키토산에 tricalcium phosphate를 첨가하여 만든 기질을 조직공학적 발판으로의 사용 여부를 확인하기 위하여

골아세포를 넣고 배양하여 백서의 두개골 결손부에 넣은 결과 골 재생에 효과적이었음을 보여주었다. 계 등[38]은 키토산 제재를 이용한 차폐막이 흰쥐의 두개관 결손부에서 골조직 재생을 증진시킬 수 있음을 보였다.

이상의 연구에서 키토산 처리시 0.02 2 ㎎/㎖ 농도에서 치주인대세포의 초기 부착은 억제하였지만 2 ㎎/㎖ 농도를 제외하고는 치주인대세포의 증식이 촉진되었고, 알칼리성 분해효소의 활성도 및 석회화 결절의 형성을 증가시켰다. 그리고 키토산의 피복 부위에 둥근 형태로 응집되어 3차원적 배양이 가능하다고 한 다른 보고들[18, 19]을 확인시켜 주었고 이런 3차원적 응집이 기능적으로 석회화 결절 형성을 촉진시키고 치주조직 재생을 위한 골 이식재나 조직공학적 골 재생용 기질로 이용될 수 있음을 보여 주었다. 향후 화학적, 물리적 성질을 변경한 여러 키토산을 이용한 세포 수준의 연구가 필요하며 조직공학 분야의 기질로 이용 시 어떤 형태가 가장 적합할 지에 대한 부가적인 연구가 필요하리라 생각된다.

V. 결론

치주 재생을 위한 여러 이식재에 대한 세포부착 및 성장에 관한 연구와 조직공학적 기질로 사용할 수 있는 합성물에 대한 연구들이 이루어지고 있다. 키토산을 치주조직 재생에 이용하기 위하여 배양접시에 0.2 2 ㎎/㎖ 농도로 키토산을 피복한 후 치주인대세포를 배양하여 세포의 부착, 증식, 형태 및 기능적 변화를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 키토산을 피복한 부위에서 세포는 둥근 형태로 부착되었고 6 시간 이후로 응집되어 24 시간 이후로는 결절 양상으로 관찰되었다. 대조군의 치주인대세포는 배양 7 일 후 밀생에 도달하였지만 응집된 세포들은 밀생에 도달하지 않았다.
2. 키토산은 모든 농도에서 배양 초기의 치주인대세포의 부착을 억제하였으며 키토산의 농도가 증가할수록 세포 부착률 및 부착된 세포의 활성도가 억제되는 경향이 증가하였다($p<0.01$).
3. 0.02, 0.2 ㎎/㎖ 농도의 키토산을 처리한 군에서 7 일 후 치주인대세포의 증식률이 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였다. 세포활성도는 모든 농도에서 대조군보다 낮았다($p<0.01$). 키토산의 농도가 높아질수록 세포의 증식 및 세포활성도가 감소하였다.
4. 키토산은 치주인대세포의 알칼리성 인산분해효소 활성도에 농도에 따라 다르게 영향을 주었으며 0.02 ㎎/㎖ 농도에서 배양 4 일에 대조군에 비해 증가하였고 그 이상에서는 효소 활성도가 억제되었으며 시일에 경과함에 따라 증가하였다.
5. 치주인대세포는 석회화 결절 유도물질을 첨가한 경우 0.02 ㎎/㎖ 키토산 처리 시 대조군에 비해 많은 석회화 결절 형성을 보였고($p<0.01$) 유도물질을 첨가하지 않은 경우 대조군에서는 석회화 결절 형성이 없었지만 키토산 처리시 석회화 결절 형성을 보였다.

결론적으로 키토산은 농도에 따라 다르게 치주인대세포의 부착, 증식, 세포활성도 및 알칼리성 인산분해효소 활성도에 영향을 주고, 석회화 결절 형성을 촉진하는 것으로 나타났다. 본 연구로 볼 때 적정 농도(0.02 ㎎/㎖)를 선택하여 이용한다면 키토산은 치주인대세포의 증식에 대한 억제를 줄이며 골 형성을 촉진하므로 키토산을 치주조직 재생 특히 골조직 재생을 위한 골 이식재 또는 조직공학적 기질로 응용할 수 있으리라 추정된다.

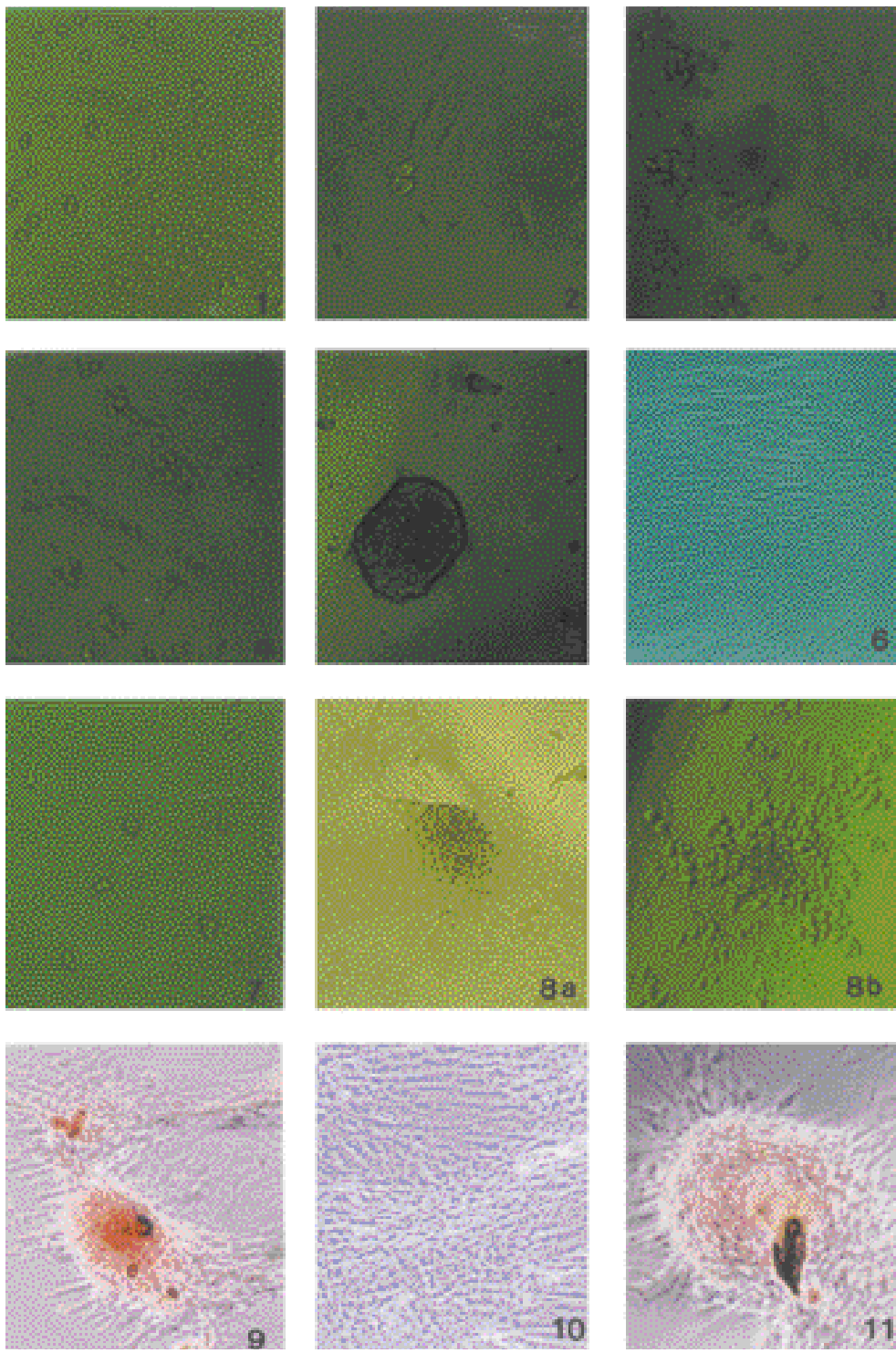
VI. 참고 문헌

1. Lynch SE, Genco RJ, Marx RE. Tissue Engineering ; Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics. Chicago : Quintessence, pp3 - 5,1999.
2. 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 46:46 - 56,1990.
3. 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 274 - 284,1991.
4. Goshima J, Victor MG, Caplan AI. The Osteogenic potential of culture - expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks. Clin Orthop Rel Res 298 - 311,1991.
5. Nakahara H, Bruder SP, Goldberg VM, Caplan AI. In vivo osteochondrogenic potential of cultured cells derived from periosteum. Clin Orthop 259:223 - 232,1990.
6. Nakahara H, Bruder SP, Haynesworth SE, Holecek JJ, Barber VM, Caplan AI. Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. Bone 11:181 - 188,1990.
7. Nakahara H, Goldberg VM, Caplan AI. Cultured - expanded human periosteal - derived cells exhibited osteochondral potential in vivo. J Orthop Res 9:465 - 476,1991.
8. Ohgush H, Goldberg VM, Caplan AI. Heterotropic osteogenesis in porous ceramic induced by marrow cells. J Orthop Res 7:568 - 578,1989.
9. Aspinall GO. The polysaccharides: Chitin and Chitosan. New York : Academic Press Inc pp386,1983.
10. Sandford PA. Chitosan: Commercial uses and potential application. In: Skajak - Braek G, Anthonsen T, Sandford P(eds). Chitin and Chitosan. London : Elsevier Applied Science ; pp51 - 70,1989.
11. Peter MG. Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. J.M.S. - Pure Appl Chem A32:629 - 640,1995.
12. Muzzarelli RAA. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. Cell Biol Life Sci 53:131 - 141,1997.
13. Sapelli PL, Baldessare V, Muzzarelli RAA, Emanuelli M. Chitosan in dentistry. Chitin in Nature and Technology ; pp507 - 512,1986.
14. Saintigny G, Bonnard M, Damour O, Collombel C. Reconstruction of epidermis on a chitosan cross - linked collagen - GAG lattice: Effect of fibroblasts. Acta Derm Venereol 73:175 - 180,1993.
15. Muzzarelli RAA, Biagini G, Pugnaloni A, Filippini O, Baldassarre V. Reconstruction of parodontal tissue with chitosan. Biomaterials 14:39 - 43,1993.
16. Klokkevold PR, Vandemark L, Kenney EB, Bernard GW. Osteogenesis enhanced by chitosan (poly - N - Acetyl Glucosaminoglycan) in vitro. J Periodontol 67:1170 - 1175,1996.
17. 김선희, 권영혁, 이만섭, 박준봉, 허익. Chitosan이 치주인대, 두개관 및 치은섬유아세포의 성상에 미치는 영향. 대한치주과

학회지 28(1):17 - 35,1998.
18. Hamano T, Teramoto A, Iizuka E, Abe K. Effects of polyelectrolyte complex(PEC) on human periodontal ligament fibroblast function. I. Three dimensional structure of HPLF cultured on PEC. J Biomed Mater Res 41:257 - 269,1998.
19. Hamano T, Teramoto A, Iizuka E, Abe K. Effects of polyelectrolyte complex(PEC) on human periodontal ligament fibroblast function. II. Enhancement of HPLF differentiation and aggregation on PEC by L - ascorbic acid and dexamethasone. J Biomed Mater Res 41:270 - 277,1998.
20. Kobayashi A, Goto M, Kobayashi K, Akaike T. Receptor - mediated regu -

lation of differentiation and proliferation of hepatocytes by synthetic polymer model of asialoglycoprotein. J Biomater Sci Polym End 6:325 - 342,1994.
21. Ichiba Y, Ono J, Okeda T, Takagi R, Abe K, Senoh S. Culture of RINr cells on a polyelectrolyte complex(PEC) - coated dish. J Jpn Diab Soc 32:635 - 639,1989.
22. Hata R, Senoo H. L - ascorbic acid 2 - phosphate stimulates collagen accumulation, cell proliferation, and formation of a three - dimensional tissue like substance by skin fibroblast. J Cell Physiol 138:8 - 16,1989.
23. Harris SE, Sabatini M, Harris MA, Feng JQ, Wozney J, Mundy GR. Expression of bone morphogenetic protein messenger RNA in prolonged cultures of fetal rat calvarial cells. J Bone Miner Res 9:389 - 394,1994.
24. Ogata Y, Niisato N, Sakurai T, Furuyama S, Sugiya H. Comparison of the character - istics of human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. J Periodontol 66:1025 - 1031,1995.
25. Arceo N, Sauk JJ, Moehring J, Foster RA, Somerman MJ. Human periodontal cells initiate mineral - like nodules in vitro. J Periodontol 62:499 - 503,1991.
26. Cho MI, Matsuda N, Lin WL, Moshier A, Ramakrishnan PR. In vitro formation of mineralized nodules by periodontal ligament cells from the rat. Calcif Tissue Int 50:459 - 467,1992.
27. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JNM, Antosz ME. Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvarial cell populations. Calcif Tissue Int 38:143 - 154,1986.
28. Beresford JN, Graves SE, Smoothy CA. Formation of mineralized nodule of bone formation? Am J Medical Genetics 45:163 - 178,1993.
29. Maniatopoulos C, Sodek J, Melcher AH. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. Cell Tissue Res 254:317 - 330,1988.
30. Carnes DL, Maeder CL, Graves DT. Cells with osteoblastic phenotypes can be explanted from human gingiva and periodontal ligament. J Periodontol 68:701 - 707,1997.
31. Ramakrishnan PR, Lin WL, Sodek J, Cho MI. Synthesis of noncollagenous extracel - lular matrix proteins during development of mineralized nodules by rat periodontal liga - ment cells in vitro. Calcif Tissu Int 57:52 - 59,1995.
32. Varki A. Does DG42 synthesize hyaluronan or chitin?: A controversy about oligosaccharides in vertebrate development. Pro Natl Acad Sci 93:4523 - 4525,1996.
33. Hirz GA, Gardner PJ, Christiensen GR. The effect of chitosan on glaucoma filtering surgery. Ann Ophthalmol 28:158 - 163,1996.
34. Malette WG, Quigley HJ, Adickes ED. Chitin in nature and technology. In: Muzzarelli R, Jeuniaux C, Gooday GW, eds. Chitosan effects in nature and technology. New York : Plenum Press ; pp435 - 442,1986
35. Muzzarelli RAA, Mattioli - Belmonte M, Tietz C. Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. Biomaterials 15:1075 - 1081,1994

사진부도



36. Ito M. In vitro properties of a chitosan - bonded hydroxyapatite bone - filling paste. Biomaterials 12:41 - 45,1991
37. 이용무, 최상묵, 박윤정, 이승진, 구영, 정종평. Tissue engineered bone formation using porous chitosan and chitosan/tricalcium phosphate matrices. 대한치주과학회지 28(4);577 - 599,1998
38. 계승범, 손성희, 최상묵. Chitosan과 chitosan - cellulose를 이용한 차폐막의 골조직 재생 유도능력에 관한 연구. 대한치주과학회지 28(4);611 - 630,1998

사진부도 설명

Photo 1 Control group of periodontal ligament cells after 30 minutes of inoculation(X100). Cells were round and not attached to the cell well.

Photo 2 Control group of periodontal ligament cells after 3 hours of inoculation(X100). Cells had spindle shape and attached to the cell well.

Photo 3 Periodontal ligament cells attached on 0.02 ㎎/㎖ chitosan coated well after 6 hours of inoculation(X100). Many cells were round and aggregated.

Photo 4 Periodontal ligament cells attached on 2 ㎎/㎖ chitosan coated well after 6 hours of inoculation(X100). Most of cells were round and aggregated.

Photo 5 Periodontal ligament cells attached on 0.2 ㎎/㎖ chitosan coated well after 24 hours of inoculation(X100). Aggregated cells were nodule-like appearance.

Photo 6 Control group of periodontal ligament cells after 7 days of culture(X100). Cells were confluent.

Photo 7 Periodontal ligament cells on 2 ㎎/㎖ chitosan coated well after 2 days of culture(X100). Cells were round.

Photo 8 Periodontal ligament cells on 0.02 ㎎/㎖ chitosan coated well after 7 days of culture a. Before trypsinization b. After trypsinization(X100).

Photo 9 Mineralized nodules on 0.02 ㎎/㎖ chitosan coated well(X100). Mineralized nodule was surrounded by many cells, showed red orange color by Alizarin red staining.

Photo 10 Mineralized nodules in control group of periodontal ligament cells(X100). Mineralized nodule was not formed under medium without mineralized nodule forming materials (ascorbic acid, β-glycerophosphate, dexamethasone) in DMEM.

Photo 11. Mineralized nodule on 0.02 ㎎/㎖ chitosan coated well(X100). Periodontal ligament cells formed mineralized nodule without mineralized nodule forming materials in DMEM.

- Abstract -

Effects of Chitosan on Human Periodontal Ligament Cells *in Vitro*

Ok - Su Kim, Hyun - Ju Chung

Dept. of Periodontology, College of Den - tistry, Research Institute of Dental Science Chonnam National University

The aim of this study was to evaluate the effects of chitosan coating on the attach - ment, proliferation, functional and morpho - logical change of periodontal ligament cells.

Primary human periodontal ligament cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotics. In experimental group, cells of 4th to 7th passage were inoculated in the multiwell plates coated with chitosan in concentration of 0.02, 0.2, and 2 ㎎/㎖. Cell counting and MTT assay were done after 0.5, 1.5, 3, 6 and 24 hours of incubation to evaluate the cell attach - ment, and then after 2 and 7 days of culture to evaluate the cell proliferation. The alka - line phosphatase activity was measured after 4 and 7 days of culture and the ability to produce mineralized nodules was evalu - ated after 21 days of culture.

The results were as follows :

1. The morphology of periodontal ligament cells on the chitosan coating was round or spheric. Round cells were aggregated after 6 hours of culture. Aggregated cells on the chitosan coat - ed surface showed nodule - like appearance after 24 hours of culture and not achieved confluency at 7 days.
2. During early period of culture, the attachment of periodontal ligament cells were inhibited by chitosan coating. Inhibition of cell attachment tended to increase with the concentration of chi - tosan.
3. At the chitosan concentration of 0.02 and 0.2 ㎎/㎖, periodontal ligament cells were more rapidly proliferated at 7 days, compared to the control group. At the concentration of 2 ㎎/㎖, the proliferation of periodontal ligament cells was inhibited($p<0.01$).
4. Alkaline phosphatase activity of periodontal ligament cells was increased in chitosan coated group, especially at the concentration of 0.02 ㎎/㎖ after 4 days of culture.
5. Periodontal ligament cells pro - duced mineralized nodules on chitosan coated wells without the addition of mineralized nodule forming materials (ascorbic acid, β - glycerophosphate, dexamethasone). With the addition of mineralized nodule forming materials, periodontal ligament cells produced more mineralized nodules at the con - centration of 0.02 ㎎/㎖, compared to the control.

In summary, the attachment, proliferation, cell activity, and alkaline phosphatase activity of periodontal ligament cells depended on the concentration of coated chitosan. Chitosan stimulated mineralized

nodule formation by periodontal ligament cells. At the appropriate concentration(0.02 ㎎/㎖), chitosan could increase alkaline phosphatase activity and stimulate the for - mation of mineralized nodule by periodontal ligament cells. These results suggest that chitosan can be used as an adjunct for bone graft material, and the matrix of tissue engineering for periodontal regeneration, especially bone regeneration.