

# 키토산이 치주인대 섬유아세포에 미치는 영향

백정원<sup>1</sup> · 이현정<sup>2</sup> · 유윤정<sup>2</sup> · 조규성<sup>1</sup> · 김종관<sup>1</sup> · 최성호<sup>1</sup>

<sup>1</sup>연세대학교 치과대학 치주과학교실, 치주조직재생연구소

<sup>2</sup>연세대학교 치과대학 구강생물학교실

## 1. 서론

치주인대 조직은 매우 특수한 결합 조직의 형태로 치아와 치조골의 부착에 중요한 기능을 담당하고 있다. 치주 질환으로 인한 치주인대 조직의 파괴는 치아의 동요도 증가와 함께 결국에는 치아의 상실을 일으킬 수 있다. 치주 질환의 치료는 기본적으로 염증성 질환의 정지를 목적으로 하지만, 최근의 술식은 염증으로 인해 파괴된 치주인대 조직의 재생에 주안점을 두고 있다. 치주 조직의 재생이란 치주 질환에 의해 상실된 부착 기구들이 치주인대 조직의 분화에 의해 신생 골, 신생 백악질을 형성하고 새로운 치주인대 섬유가 수직으로 매입되어 구조적, 기능적으로 재형성된 치유 형태를 말한다. 그러나 실제로 치주인대로부터 유래한 세포들은 신부착을 형성할 수 있는 능력을 가지고 있으나 치주인대 내의 미분화 세포가 분화되어 새로운 치주 조직을 형성하는 속도보다 상피 세포의 이주 속도가 빨라, 재생이나 신부착을 위한 치주 치료의 결과가 대부분 긴 접합 상피 부착으로 이루어지게 된다. 이러한 상피 세포의 이주를 막기 위해 1976년 Melcher는 차단막을 사용하는 조직 유도 재생술(Guided tissue regeneration, GTR)을 제안하였다<sup>1)</sup>. 그러나, 차단막의 사용은 재생에 필요한

선택적 세포들의 능동적 이주, 증식, 기질 합성을 촉진하지는 않으며, 골 조직, 치주인대 공간, 골-골막 표면내에 존재하는 혈관으로부터 치은 판막으로의 신혈관 생성이 차단막에 의해 방해될 수 있다. 또한, 이 술식의 성공에는 골 결손부의 형태, 차단막의 종류, 판막의 위치, 치은 퇴축 외에도 환자의 전신 건강 상태, 구강 위생 상태, 흡연 여부, 술자의 기술 및 치유 기간 등 여러 요소들이 영향을 미치게 된다<sup>2)</sup>.

최근에는 분자 생물학의 발전으로 조직의 치유에 국소적으로 관여하는 성장 인자를 조직 재생에 응용하게 되었다<sup>3)</sup>. 성장 인자는 조직 내에 정상적으로 존재하고 있으며 세포의 증식, 분화, 이주와 기질 합성에 영향을 미침으로써 세포의 성장, 생성 기능을 조절하는 역할을 한다. 치주 조직과 골 재생에 중요한 역할을 한다고 생각되는 여러 성장 인자들에 대한 연구가 계속되고 있으나 아직까지 적절한 투여 용량과 송달체가 결정되지 않았으며, 또한 국소 투여 시 인체 내 타 기관에 미치는 영향에 대한 연구가 부족하고, 경제적인 면에서도 불리하다.

이에 구강내 환경의 평형성을 유지하면서 내성 균주를 형성하지 않을 뿐 아니라 신체 부작용이 없이 치주인대 조직의 선택적 재생에 효과적인 생약 제제에 관심이 증가하고 있다. 특히, 천연 중합체인 키토

산(poly-N-acetyl glucosaminoglycan)은 신체 조직과 유사한 결합 형태로 생체 적합성이 우수하고 생분해되며, 항균 작용과 창상 치유 촉진에 효과적인 기능으로 다양한 분야에서 연구, 응용되고 있다<sup>4)</sup>. 키토산은 키틴에서 추출된 탄수화물 유도체로서, 키틴 분자를 탈아세틸화시킴으로써 형성된다. 키틴은 생중합체 중 셀룰로스 다음으로 풍부한 천연 생고분자로서 새우나 게와 같은 갑각류의 외골격, 진균의 세포벽, 곤충의 큐티클을 이루는 주요한 구성 성분으로, 화학적 구조면에서 매우 안정된 다당류이며 1, 4  $\beta$  glucosidic linkage에 연결된 N-acetyl-D-glucosamine 단위의 선형 중합체이다. 키틴과 키토산은 효소에 의해 가수분해되어 단량체 형태로 흡수되는데, 주로 라이소자임(lysozyme)에 의해서 분해된다<sup>5-7)</sup>. 키토산은 지방 흡수를 저해하여 체중 감소에 도움이 되며, 콜레스테롤 조절, 결합 조직 치유 향상, 항생 효과, 항진균 효과, 항암 효과, 지혈 효과 등이 있다<sup>8-14)</sup>. 또한, 최근 여러 연구를 통해 창상 치유 및 골 재생 유도 능력이 보고되고 있다<sup>5-18)</sup>. 키토산의 각 성분에 대한 연구는 1960년 Reynold가 창상 치유 증진에 있어서 N-acetylglucosamine 사용의 과학적 근거를 제시한 보고에서 시작되었으며<sup>9)</sup>, 계속된 여러 동물 실험을 통해 N-acetylglucosamine이 지혈과 창상 치유 증진에 효과적임이 밝혀졌다<sup>5, 18)</sup>. 또한, Sapelli 등은 치주낭, 구개 창상과 발치와의 치유를 증진시키기 위해 키토산 분말을 사용한 증례에서 양호한 임상적 결과를 보고하였다<sup>20)</sup>. Muzzarelli 등은 치주 창상에 키토산을 적용하였을 때 조직화가 증진되면서 섬유화가 감소되는 것을 발견하고<sup>21)</sup>, 뒤이어 발치와 및 치근단 절제술 후의 골 결손부위에 키토산을 적용하여 정상골 형성을 촉진시켰다고 보고하였다<sup>22)</sup>. 게 등은 키토산 제제를 이용한 차단막이 치주 질환시 골조직 유도에 재생에 유용하다고 보고하였다<sup>23)</sup>.

이러한 생체 실험의 성공적 결과에도 불구하고 아직까지 키토산이 치주 조직 세포에 미치는 영향이나 그 기전에 관한 연구가 부족한 것이 사실이다. 따라서, 본 연구에서는 세포 독성 검사를 통하여 키토산이 치주인대 섬유아세포에 독성을 나타내지 않는 최고의 농도를 결정하고, 결정된 농도의 키토산이 치주인대 섬유아세포

포의 교원질 생성능, alkaline phosphatase(ALP) 활성에 미치는 효과를 비교함으로써, 키토산이 치주인대 섬유아세포에 미치는 영향을 평가하였다.

## II. 연구재료 및 연구방법

### 가. 연구 재료

#### 1. 키토산

수용성 키토산(poly-N-acetyl glucosaminoglycan)\*은 100% 키토산을 탈아세틸화시킨 후 염산과 물을 첨가한 수용액에 키토산 분해 효소(Chitosanase)를 이용해 분해시켜 정제 과정을 거쳐 건조한 분말 형태로 공급된다. 분말 형태의 키토산을 phosphate-buffered saline(PBS)에 녹인 100mg/ml의 stock solution을 각 실험군의 농도로 희석하였다.

#### 2. 치주인대 섬유아세포

치주인대 섬유아세포(human periodontal fibroblasts, hPDLFs)는 교정 치료를 목적으로 발거한 건강한 제 1 소구치에서 채취하여 계대 배양하였다.

### 나. 연구 방법

#### 1. 치주인대 섬유아세포의 분리 및 배양

건강한 제 1 소구치의 발거 전에 큐렛을 이용하여 치태와 치석을 제거한 후 Hank's balanced salt solution(HBSS)으로 3회 세척하여 잔존하는 혈액을 제거한 다음 치근 중앙 1/3 부위에서 치주인대 조직을 No. 15 blade로 채취하여 25mm<sup>2</sup> 배양 접시에 20% fetal bovine serum(FBS), 100unit/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 0.5mg/ml amphotericin-B가 포함된  $\alpha$ MEM을 넣고 37°C, 100% 습도, 5% CO<sub>2</sub> 공기 혼합 배양기에서 배양하였고, 배양액은 매 3일 간격으로 교환하면서 밀생 단일층이 얻어질 때까지 배양하였다. 밀생 배양이 형성되면 배양액을 제거하고 0.25% trypsin-EDTA를 첨가하여 37°C, CO<sub>2</sub> 배양기

\*키토산 100, Hanwha Co., Seoul, Korea

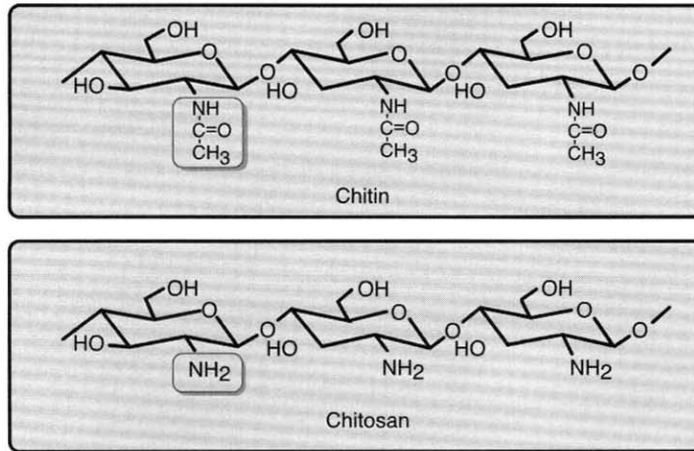


Figure 1. Structure of chitin and chitosan

에서 5분 간 배양하여 세포를 탈리시키고  $\alpha$ MEM을 동량 이상 첨가하여 희석시킨 다음 4°C에서 1,200rpm으로 10분 동안 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 수집된 치주인대 섬유아세포는 상기 배양액으로 세포 부유액을 만든 후 75mm<sup>2</sup> 배양 접시에 7-10일 간격으로 계대 배양하였다. 세포의 균일한 특성을 얻기 위해 계대 배양한 세포 중 5-7세대를 사용하였다.

## 2. 세포 독성 검사

MTT assay는 살아있는 세포에서의 세포 증식이나 세포 독성을 측정하는데 사용되는 방법으로, 대사적으로 활성이 있는 세포의 mitochondria에 의해 tetrazolium salt가 환원되는 원리를 이용한 것이다. 환원된 tetrazolium salt는 색이 있는 불용성의 formazan salt로 되며, 유기 용매에 의해 용해된 formazan의 양을 측정하게 된다.

본 실험에서는  $\alpha$ -minimal essential medium( $\alpha$ -MEM)에서 배양한 세포를 대조군, 각 농도의 키토산을 함유한 배지를 넣어 배양한 군을 실험군으로 설정하였고, 이 때 실험군의 키토산 농도는 0.01, 0.1, 1, 2mg/ml의 네 군으로 나누었다.

96well plate에 치주인대 세포를  $1 \times 10^4$ 개씩 분주하고 10% FBS가 함유된  $\alpha$ -MEM 배양액 200 $\mu$ l를 첨가하여 동일 조건에서 3일 간 배양하였다. 배양액을

제거하고 대조군에는 새로운 배양액 200 $\mu$ l를 첨가하고 실험군에는 각각 0.01, 0.1, 1, 2mg/ml의 키토산 용액을 동량 첨가하여 배양 2일, 3일 후에 MTT assay를 시행하였다. 각 well에서 배양액을 제거하고 생리 식염수로 용해한 3-(4,5-dimethyl-thiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) 용액 50 $\mu$ l를 첨가한 후 4시간 동안 방치하였다. 반응액을 제거하고 200 $\mu$ l의 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가하여 형성된 formazan 결정을 용해한 후 ELISA reader로 파장 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 실험을 3회 반복 시행하여 치주인대 세포에 독성을 나타내지 않는 키토산의 최고 농도를 결정하였다.

## 3. 실험군 설정

세포 독성 검사에서 결정된 농도(0.1mg/ml)의 키토산을 함유한 배지에서 배양한 군을 실험군으로, 배지만을 넣어 배양한 군을 대조군으로 설정하였다.

## 4. Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)

### (1) RNA 분리 및 농도 확인

24well plate에 치주인대 세포를  $8 \times 10^4$ 개씩 분주하고 10% FBS가 함유된  $\alpha$ -MEM 배양액 400 $\mu$ l를 첨가하여 동일 조건에서 3일 간 배양하였다. 배양액을 제거하고 대조군에는 새로운 배양액 400 $\mu$ l를 첨가하

고 실험군에는 0.1mg/ml의 키토산 용액을 동량 첨가하여 배양 3일 후에 RNA를 분리하였다. 배양액을 제거하고 100 $\mu$ l의 TRIzol을 첨가하여 각 군의 탈리된 세포를 1.5ml tube에 수집하였다. 0.2ml chloroform을 첨가하여 RNA를 용해시킨 후 4 $^{\circ}$ C, 12,000g에서 15분 간 원심 분리하였다. 상층액을 취한 후 0.5ml isopropyl alcohol을 첨가하여 RNA를 침전시키고 4 $^{\circ}$ C, 12,000g에서 10분 간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 분리한 RNA는 0.1% diethyl pyrocarbonate-treated distilled water(DEPC-treated H<sub>2</sub>O) 60 $\mu$ l에 녹여 농도를 확인하였다. Complementary DNA(cDNA) 합성 시 RNA 1 $\mu$ g을 12.5 $\mu$ l로 맞추었다.

### (2) cDNA 합성

RNA 12.5 $\mu$ l에 oligo(dT)18 primer 1 $\mu$ l를 첨가하고 70 $^{\circ}$ C에서 5분 간 변성시킨 후 5 $\times$  reaction buffer 4 $\mu$ l, 10mM의 dNTP 1 $\mu$ l, recombinant RNase inhibitor 0.5 $\mu$ l, M-MLV reverse transcriptase 1 $\mu$ l를 함유한 6.5 $\mu$ l의 reverse transcription mixture를 첨가하여 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 cDNA를 합성하였다. 94 $^{\circ}$ C에서 5분 간 합성을 중단하고 합성된 cDNA 20 $\mu$ l에 DEPC-treated H<sub>2</sub>O 60 $\mu$ l를 첨가하여 80 $\mu$ l로 희석하였다.

### (3) Polymerase chain reaction(PCR)

1.0mM MgCl<sub>2</sub>를 포함하고 있는 10 $\times$ buffer 5 $\mu$ l, A, G, C, T 각 1 $\mu$ l, DEPC-treated H<sub>2</sub>O 34.8 $\mu$ l, 5unit Taq polymerase 0.2 $\mu$ l, 제 I형 교원질과 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)에 대한 oligonucleotide primer 2 $\mu$ l(Table 1), 합성된 cDNA 4 $\mu$ l를 혼합하여 94 $^{\circ}$ C에서 9분 간 pre-denaturation시켰다. PCR은 DNA thermal cycler에서 30cycle 반응시

켰고, 각 cycle은 94 $^{\circ}$ C에서 45초 간 denaturation, 56 $^{\circ}$ C에서 45초 간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 90초 간 polymerization시키는 과정으로 이루어지며, 반응 후 72 $^{\circ}$ C에서 5분 간 방치하였다. 증폭된 PCR product 12 $\mu$ l에 loading buffer 3 $\mu$ l를 첨가하여 1.5% agarose ethidium bromide gel에 100V에서 15분 간 running 시킨 결과를 분석하였다.

### 5. Alkaline phosphatase(ALP) 활성도 검사

Alkaline phosphatase(ALP) 활성도 검사는 *p*-nitrophenyl phosphate(pNPP)의 가수 분해 반응에 ALP가 촉매로 작용하는 것을 이용하여, 가수 분해의 산물인 *p*-nitrophenol의 양을 측정함으로써 ALP의 농도를 간접적으로 산출하는 것이다. 이 때 세포수의 차이가 ALP 활성도에 영향을 미칠 수 있으므로 총 단백질 양을 측정하여 ALP 농도를 나누어 줌으로써 단위 세포수 당 ALP 활성도를 계산한다.

본 실험에서는 24well plate에 치주인대 세포를 8 $\times$ 10<sup>4</sup>개씩 분주하고 10% FBS가 함유된  $\alpha$ MEM 배양액 400 $\mu$ l, 10mM  $\beta$ glycerophosphate와 50 $\mu$ g/ml ascorbic acid를 첨가하여 동일 조건에서 3일 간 배양하였다. 배양액을 제거하고 대조군에는 새로운 배양액 400 $\mu$ l를 첨가하고 실험군에는 0.1mg/ml의 키토산 용액을 동량 첨가하여 배양 10일에 ALP 활성도를 측정하였다. 배양액을 제거하고 효소 용액(0.2% collagenase, 0.1% dispase) 100 $\mu$ l를 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 20분 간 반응시켜 세포 간 교원질을 분리하였다. 세포를 1.5ml tube에 수집하여 세포 부유액을 4 $^{\circ}$ C, 8,000rpm에서 10분 동안 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 PBS로 2회 세척한 후, 분리한 세포를 얼음에 옮겨 0.5% triton X-100 100 $\mu$ l, PBS 200 $\mu$ l를 첨가하여 1시간 동안 방치하여 세포막을 파괴하였다.

Table 1. Primers utilized for RT-PCR

Primer	Size(bp)	Sequence
Type I collagen	503	sense 5'CTGGCAAAGAAGCGGCAAA3' anti 5'CTCACCACGATCACCACCTCT3'
GAPDH	985	sense 5'TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGT3' anti 5'CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC3'

Table 2. Effect of chitosan on proliferation of hPDLFs

Chitosan conc (mg/ml)	Absorbance(Mean ± S. D.)	
	after 2 day	after 3 day
Control	1,814 ± 0,205	2,576 ± 0,200
0,01	2,143 ± 0,149	2,612 ± 0,127
0,1	2,205 ± 0,085	2,491 ± 0,230
1	1,993 ± 0,137	2,037 ± 0,143*
2	1,600 ± 0,141*	1,518 ± 0,148*

\*significantly different from the control group, P<0,05.

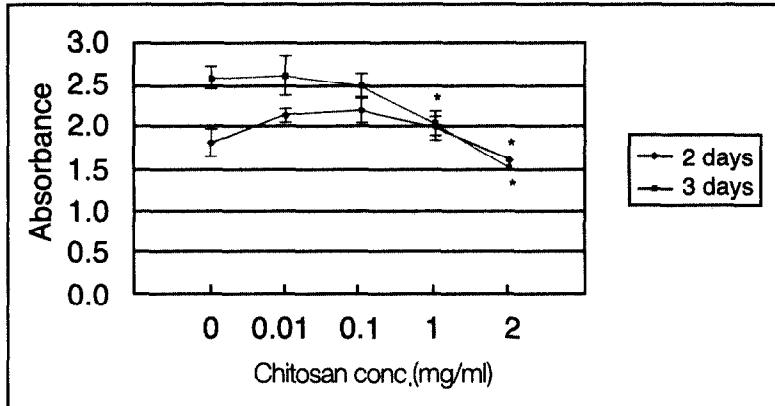


Figure 2. Effect of chitosan on proliferation of hPDLFs

\*significantly different from the control group, P<0,05.

PBS 200 $\mu$ 를 첨가하고 4 $^{\circ}$ C, 8,000rpm에서 10분간 원심 분리한 후 상층액을 모아 ALP 활성도 측정에 사용하였다. 30 $^{\circ}$ C에서 20 $\mu$ 의 세포액을 1ml의 ALP-10 $\times$ 용액과 혼합하여 30 $^{\circ}$ C에서 30초간 반응시킨 후 생성되는 p-nitrophenol의 양을 405nm에서 흡광도를 측정하였다(Initial data). 30 $^{\circ}$ C에서 계속 반응시켜 2분 경과 후 동일 파장에서 흡광도를 측정하고(Final data), 2분 간의 흡광도 변화를 이용하여 다음과 같이 ALP 활성도를 계산하였다.

ALP(U/L) = (Final data-Initial data)/2 $\times$ Total volume $\times$ 1000

/(18.45 $\times$ Sample volume $\times$ Light path)

= (Final data-Initial data) $\times$ 1382

96well plate의 각 well에 bovine serum albumin(BSA) standard 0, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 $\mu$ g/ml와 각 군별 세포액 5 $\mu$ 씩을 넣었다. Coomassie blue 250 $\mu$ 씩을 각 well에 넣고 즉시

ELISA reader를 이용하여 570nm에서 흡광도를 읽었다. BSA standard의 흡광도를 이용하여 단백질 농도와 흡광도 간 관계식을 작성하고 이를 이용하여 각 군별 세포액의 단백질 농도를 계산하였다. ALP 농도를 단백질 농도로 나누어 ALP 활성도를 계산하였다. 이상의 실험을 3회 반복 시행하였다.

#### 6. 통계학적 분석

Kruskal-Wallis test와 Mann-Whitney test를 시행하였다.

### III. 연구 결과

#### 가. 세포 독성 검사

대조군과 농도별로 키토산을 처리한 각 실험군을 배양 2일, 3일 후에 MTT assay를 이용하여 대사적 활

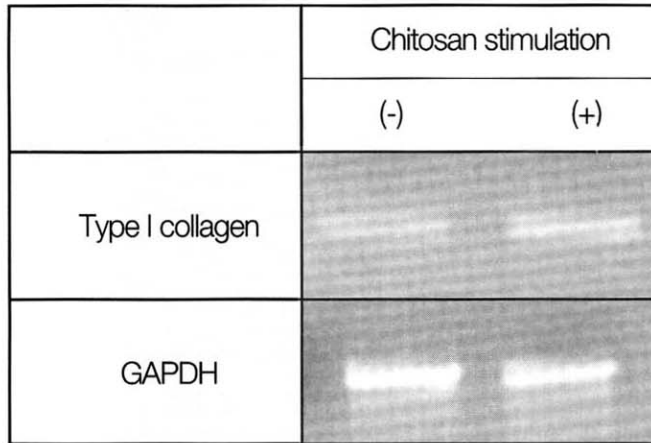


Figure 3. Effect of chitosan on mRNA expression by hPDLFs. Expression of specific mRNAs was detected by PCR with primers specific for type I collagen and GAPDH

Table 3. Relative densitometric analysis of RT-PCR experiment

	Chitosan stimulation	
	(-)	(+)
Type I collagen/GAPDH	2.09	2.82

Table 4. Effect of chitosan on ALP activity of hPDLFs

Chitosan conc(mg/ml)	ALP activity(Mean ± S.D.)(U/g)
Control	138.2 ± 59.9
0.1	188.8 ± 65.8*

\*significantly different from the control group, P < 0.05.

성을 평가하였다. 2일 째에는 2mg/ml의 농도에서, 3일 째에는 1, 2mg/ml의 농도에서 대조군과 비교하여 활성 감소가 유의하게 나타났다(Table 2, Figure 2).

이상의 결과에 근거하여 치주인대 섬유아세포에 대하여 독성을 나타내지 않는 최고의 키토산 농도를 0.1mg/ml로 결정하였다.

#### 나. RT-PCR에 의한 제 I형 교원질의 발현

0.1mg/ml의 키토산이 함유된 배지에서 치주인대 섬유아세포를 배양한 후 RNA를 분리하여 제 I형 교원질의 발현 정도를 대조군과 비교 분석하였다. 0.1mg/ml의 키토산을 함유한 배지에서 배양된 치주인대 섬유아세포는 대조군에 비하여 제 I형 교원질의

mRNA 발현이 증가하였다(Figure 3, Table 3).

#### 다. ALP 활성도 검사

0.1mg/ml의 키토산을 함유한 배지에서 배양된 치주인대 섬유아세포의 분화능을 알아보기 위해 10일간 배양한 후 세포막을 파괴시켜 세포 내 ALP의 양을 측정하였다. 0.1mg/ml의 키토산을 함유한 배지에서 배양된 치주인대 섬유아세포는 대조군과 비교하여 ALP 활성이 유의하게 증가되었다(Table 4).

### IV. 총괄 및 고찰

치주 조직의 재생에 있어 치주인대의 역할은 매우

중요한 인자이며, 그 구성 요소 중 치주인대의 유지와 개조에 기여하는 주세포인 치주인대 섬유아세포는 성장과 생성, 분화에 있어 특징적인 양상을 나타낸다. 임상적으로, 치주 조직의 재생을 위해 다양한 종류의 이식재와 차단막이 연구되고 또한 실제 임상에 응용되고 있으나, 아직까지 각각의 한계점을 가지고 있다. 치주 조직의 재생을 위해 사용되는 생약 제제는 생체 거부 반응이나 생분해시 나타날 수 있는 독성의 위험이 적고 그 효과가 지속적이며 임상에 응용될 경우 경제적으로 사용될 수 있다. 최근 이러한 생체 적합성과 항균 작용, 창상 치유 촉진 등의 생물학적 작용, 우수한 기계적 특성으로 관심이 증가하고 있는 키토산은 키틴을 강알칼리 처리하여 탈아세틸화시킨 유도체로서, 구조적으로 hyaluronic acid와 유사한 polycationic complex carbohydrate이며 분자량은 800-1,500kd인 생체 분해성 물질이다<sup>14)</sup>. 그러나, 천연 고분자 물질인 키토산은 pH 5.0 이상에서는 소수성을 나타내기 때문에 수용액을 만들기 위해서는 산성의 용매를 사용해야 하고, 이러한 산성 용매는 조직에 유해할 수 있다. 이에 중합체를 올리고당 형태로 가수 분해하여 쉽게 물에 녹을 수 있도록 만든 수용성 올리고당 키토산이 개발되어, 인체 내에서의 흡수성을 높여 경구 복용이 가능해졌을 뿐 아니라 다양한 분야에서 적절한 농도로 희석하여 사용하는 것이 가능해졌다. 본 연구에서는 이러한 수용성 키토산을 PBS에 녹여 다양한 농도의 실험군을 비교해 보았으며, 이 중 세포 독성 검사를 통하여 치주인대 섬유아세포에 독성을 나타내지 않는 최고의 농도를 결정하고 교원질 생성 능력과 조골 세포로의 분화능력을 알아보았다.

본 연구에 사용한 키토산의 농도는 0.01, 0.1, 1, 2 mg/ml의 네 가지였고 대조군은 키토산을 처리하지 않았다. MTT assay를 이용하여 치주인대 섬유아세포에 대한 영향을 분석한 결과 키토산의 농도가 증가할수록 치주인대 섬유아세포의 성장이 증가하였으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다. 그 정점(plateau)이 되는 농도는 0.1mg/ml였고, 1mg/ml 이상의 농도에서는 오히려 세포의 성장이 유의한 차이로 감소하였다. 따라서, 0.1mg/ml를 치주인대 섬유아세포

에 대한 적정 농도로 결정하였다.

키토산이 치주인대 섬유아세포의 교원질 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 키토산을 함유한 배지에서 배양하였을 때 제 I형 교원질의 발현을 RT-PCR을 이용해 분석하였다. 0.1mg/ml 키토산을 처리한 경우 대조군에 비해 제 I형 교원질의 mRNA 발현이 증가하였다. 제 I형 교원질은 치주 조직에 가장 많은 세포의 기질로 석회화 결절 형성에 필수적인 요소라 할 수 있다. 이러한 결과를 볼 때, 적정 농도의 키토산은 치주인대 섬유아세포의 성장과 교원질 생성을 촉진할 뿐 아니라 치주인대 섬유아세포가 골원 세포(osteogenic cell)로 분화하는 것 또한 촉진한다고 할 수 있다.

치주인대 섬유아세포가 조골 세포로 분화하는 양상을 확인하기 위해 ALP 활성도를 분석하였다. 0.1 mg/ml 키토산을 함유한 배지에서 배양한 경우 대조군에 비해 활성이 유의하게 증가하였다. ALP의 활성은 조골 세포의 초기 분화기에 증가하는 분화의 표식자로, 치주인대 세포에서 ALP의 증가는 석회화가 촉진됨을 반영한다.

Klokkevold는 쥐에서 채취한 미분화 간엽 세포가 키토산을 처리하였을 때 조골 세포로 분화하여 석회화되는 양상을 보고한 바 있다<sup>11)</sup>. 그는 이 연구에서 키토산이 직접적으로는 조골 세포의 골 생성을 촉진하고 간접적으로는 섬유아세포를 억제함으로써 골 생성에 저해되는 인자를 억제하여, 결과적으로 조골 세포로의 분화와 골 생성을 촉진한다고 결론내렸다. 그러나, 본 연구 결과에 의하면 키토산을 함유한 배지에서 치주인대 섬유아세포를 2일, 3일 간 배양한 후 MTT assay를 시행하였을 때 성장과 교원질 생성을 촉진한 반면 10일 간의 배양 후에는 ALP의 활성을 유의하게 증가시킨 결과를 볼 수 있다. 즉, 키토산은 치주인대 섬유아세포에 대해 초기에는 성장을 촉진하고, 시간이 지남에 따라 성장보다는 조골 세포로의 분화를 유도하는 작용을 하는 것으로 사료된다. 따라서, 미분화 간엽 세포의 배양에서 조골 세포가 섬유아세포보다 우세하게 나타난 것은 배양 기간에 기인한 것으로 추측된다.

키토산이 골 결손 치유, 즉 골 재생에 미치는 영향에 대해서는 여러 가지 동물 실험을 통해 입증된 바

있다. Malette 등은 키토산을 이용한 개 실험에서 다리에서의 골 재생을<sup>24)</sup>, 또 Muzzarelli 등은 양의 대퇴부 관절 실험에서 대조군과 비교해 골 치유가 향상된 결과를 보고하였다<sup>22)</sup>. 본 실험으로 키토산의 작용 기전을 명확하게 규명할 수는 없지만, 상기의 연구 결과는 동물 실험에서의 키토산의 골 재생 효과를 세포 수준에서 뒷받침하고 있다. 키토산의 작용 기전에 대해 키토산이 구조적 측면에서 hyaluronic acid와 유사하다는 점에 착안하여, hyaluronic acid가 조직 재생에 관여하는 전구 세포의 이주와 성장을 촉진하는 것과 유사하게, 키토산이 특정 전구 세포, 즉 조골 세포로의 이주와 분화를 촉진할 수 있다는 가설이 제시된 바 있다<sup>1)</sup>. 키토산의 작용 기전에 관해서는 향후의 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구에서 입증된 골 유도 효과(osteo-inductive effect)이외에도 키토산은 생체 내에서 오랜 기간 흡수되지 않고 그 형태를 유지하고 있어 골 전도 효과(osteo-conductive effect) 또한 기대된다. Jameela 등은 키토산이 glutaraldehyde같은 dialdehyde를 사용하여 cross-linking시킴으로써 보다 오랜 기간 흡수되지 않고 그 형태와 기능을 유지하고 있음을 보고하였다<sup>25)</sup>. 이는 키토산의 cross-linking density를 변화시킴으로써 필요한 기간동안 유지시킬 수 있는 가능성을 제시하며, 이러한 특성은 키토산의 생분해성 차단막으로의 성공적인 사용 가능성을 뒷받침한다.

결론적으로, 0.1mg/ml 농도의 키토산은 초기에는 치주인대 섬유아세포의 교원질 생성을 증가시켰고, 시간이 지남에 따라 조골 세포로의 분화를 유도하였으며, 이러한 결과는 향후 키토산의 임상적 적용에 대한 근거가 될 것으로 사료된다.

## V. 결론

키토산을 치주 조직 재생에 적용하기 위한 임상 전 실험으로 키토산이 치주인대 섬유아세포에 미치는 영향을 알아보기 위해, 치주인대 섬유아세포에 독성을 나타내지 않는 최고의 농도를 결정하여, 결정된 농도의 키토산이 치주인대 섬유아세포의 교원질 생성능, alkaline phosphatase(ALP) 활성에 미치는 효

과를 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 세포 독성 검사 결과 키토산의 농도가 0.1mg/ml 이상일 경우 세포 활성이 감소하였다(p<0.05).
2. 키토산(0.1mg/ml)은 치주인대 섬유아세포의 제 I형 교원질의 mRNA 발현을 증가시켰다.
3. 키토산(0.1mg/ml)은 치주인대 섬유아세포의 ALP 활성을 유의하게 증가시켰다(p<0.05).

결론적으로, 치주인대 섬유아세포에 독성을 나타내지 않는 최고 농도(0.1mg/ml)의 키토산은 초기에는 치주인대 섬유아세포의 교원질 생성을 증가시켰고, 시간이 지남에 따라 조골 세포로의 분화를 유도하였다.

## VI. 참고 문헌

1. Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissue. *J Periodontol* 1976;47: 256-260.
2. Machtei, Cho M, Dunford R, Norderyd J, Zambon J, Genco R. Clinical, microbiological, and histological factors which influence the success of regenerative periodontal therapy. *J Periodontol* 1994;65:154-161.
3. Terranova V, Wikesjo UME. Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cells of the periodontium. *J Periodontol* 1991;62:458-463.
4. Aspinnall GO. The polysaccharides. Chitin and chitosan. New York: Academic Press, 1983;Inc, 2:386.
5. Amano K, Ito E. The action of lysozyme on partially deacetylate chitin. *Eur J Biochem* 1978;85:97-104.
6. Pangburn SH, Trescony PV, Heller J. Lysozyme degradation of partially deacetylated chitin, its films and hydrogels. *Biomaterials* 1982;3:105-108.
7. Shigemasa Y, Saito K, Sashiwa H, Saimoto H. Enzymatic degradation of chitins and partially



- deacetylated chitins. *Int J Biol Macromol* 1994;16:43-49.
8. Brandenberg G, Leibbroch LG, Shuman R, Malette WG, Quigley H. Chitosan: A new topical hemostatic agent for diffuse capillary bleeding in brain tissue. *Neurosurg* 1984;15:9-13.
  9. Kind GM, Bind SD, Staren ED, Templeton AJ, Economou SG. Chitosan: Evaluation of a new hemostatic agent. *Curr Surg* 1990;47:37-39.
  10. Klokkevold PR, Lew DS, Ellis DG, Bertolami CN. Effect of chitosan on lingual hemostasis in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg* 1991;49:858-863.
  11. Klokkevold PR, Vandemark L, Kenney EB, Bernard GW. Osteogenesis enhanced by chitosan (Poly-N-Acetyl Glucosaminoglycan) *in vitro*. *J Periodontol* 1996;67:1170-1175.
  12. Muzzarelli RA, Baldassarre M, Conti F, Ferrara P, Biagini B. Biological activity of chitosan: Ultrastructural study. *Biomaterials* 1988;9:247-252.
  13. Muzzarelli RA, Biagini G, Bellardini M, Simonelli L, Castaldini C, Fratto G. Osteoconduction exerted by methylpyrrolidinone chitosan used in dental surgery. *Biomaterials* 1993;14:39-43.
  14. Sandford PA. Chitosan: Commercial uses and potential applications. In: Skjak-Braek G, Anthonsen T, Sandford P, eds. *Chitin and Chitosan*. London: Elsevier Applied Science, 1989:51-70.
  15. Balassa LL, Prudden JF. Applications of chitin and chitosan in wound healing acceleration. In: Muzzarelli RA, Pariser ER, eds. *Proceedings of the 1st International Conference on Chitin and Chitosan*. Cambridge, MA: MIT Press, 1978.
  16. Muzzarelli RA, Mattioli-Belmonte M, Tietz C, Biagini R, Ferioli G, Brunelli MA, Fini M, Giardino R, Ilari P, Biagini G. Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. *Biomaterials* 1994;15:1075-1081.
  17. Mima S, Miya M, Iwamoto R, Yoshikawa S. Highly deacetylated chitosan and its properties. *J Appl Polym Sci*, 28: 1909-1917, 1983.
  18. Minami S, Okamoto A, Matsushashi A, et al. Applications of chitin and chitosan in animals. In: Brine CJ, Sanford PA, Zikakis JP, eds. *Advanced in chitin and chitosan*. London: Elsevier Applied Science, 61-69, 1992.
  19. Reynolds BL. Wound healing III: Artificial maturation of arrested regenerate with an acetylated amino sugar. *Am Surgeon* 1960;26:113-117.
  20. Sapelli PL, Baldassarre V, Muzzarelli RA, Emanuelli M. Chitosan in dentistry. *Chitin in Nature and Technology* 1986;507-512.
  21. Muzzarelli RA. *In vivo* biochemical significance of chitin-based medical items. *Polymeric Materials for Biomedical Applications*(Eds S. Dumitriu and M. Szycher), Marcel Dekker, New York, USA, 1992.
  22. Muzzarelli RA, Biagini G, Pugnaroni A, Filippini O, Baldassarre V. Reconstruction of parodontal tissue with chitosan. *Biomaterials* 1989;10:598-603.
  23. 계승범, 손성희, 최상묵. Chitosan 과 chitosan-cellulose를 이용한 차폐막의 골조직 재생유도능력에 관한 연구. *대한치주과학회지*, 1998;28:611-630.
  24. Mallette WG, Quigley HJ, Adickes ED. Chitin in nature and technology. In: Muzzarelli RA, Jeuniaux C, Gooday GW, eds. *Chitosan Effect in Nature and Technology*. New York: Pleum Press, 1986;435-442.
  25. Jameela SR, Jayakrishnan A. Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long acting biodegradable drug delivery vehicle: studies on the *in vitro* release of mitoxantrone and *in vivo* degradation of microspheres in rat muscle. *Biomaterials* 1995;16:769-775.

## The effects of chitosan on the human periodontal ligament fibroblasts in vitro

Jeong-Won Paik<sup>1</sup>, Hyun-jung Lee<sup>2</sup>, Yun-Jung Yoo<sup>2</sup>, Kyoo-Sung Cho<sup>1</sup>,  
Chong-Kwan Kim<sup>1</sup>, Seong-Ho Choi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Periodontology, College of dentistry, Yonsei University,  
Research institute for periodontal regeneration

<sup>2</sup>Department of oral biology, College of dentistry, Yonsei University

Periodontal therapy has dealt primarily with attempts at arresting progression of disease, however, more recent techniques have focused on regenerating the periodontal ligament having the capacity to regenerate the periodontium. The effect of chitosan (poly-N-acetyl glucosaminoglycan), a carbohydrate biopolymer extracted from chitin, on periodontal ligament regeneration is of particular interest.

The purpose of this study was to evaluate the effect of chitosan on the human periodontal ligament fibroblasts (hPDLFs) *in vitro*, with special focus on their proliferative properties by MTT assay, the synthesis of type I collagen by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and the activity of alkaline phosphatase (ALP). Fibroblast populations were obtained from individuals with a healthy periodontium and cultured with  $\alpha$ MEM as the control group. The experimental groups were cultured with chitosan in concentration of 0.01, 0.1, 1, 2 mg/ml.

The results are as follows;

1. Chitosan-induced proliferative responses of hPDLFs reached a plateau at the concentration of 0.1 mg/ml ( $p < 0.05$ ).
2. When hPDLFs were stimulated with 0.1 mg/ml chitosan, mRNA expression of type I collagen was up-regulated.
3. When hPDLFs were stimulated with 0.1 mg/ml chitosan, ALP activity was significantly up-regulated ( $p < 0.05$ ).

In summary, chitosan (0.1 mg/ml) enhanced the type I collagen synthesis in the early stage, and afterwards, facilitated differentiation into osteogenic cells. The results of this *in vitro* experiment suggest that chitosan potentiates the differentiation of osteoprogenitor cells and may facilitate the formation of bone.

---

Key words : Chitosan, hPDLFs, MTT assay, RT-PCR, ALP activity