

키토산이 조골세포에 미치는 영향

김기홍 · 박영주 · 박준우 · 이용찬 · 조병욱 · 안병근

한림대학교 의과대학 구강악안면외과학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2002;28:280-285)

EFFECTS OF CHITOSAN ON HUMAN OSTEOBLASTS

Ki-Hong Kim, Young-Ju Park, Jun-Woo Park, Yong-Chan Lee, Byoung-Ouck Cho, Byoung-Keun Ahn

Department of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Medicine, Hallym University

As the result of the study concerning "bone inducibility of chitosan",

1. "BMP-2" was observed mainly through the test when the "osteoblast" is exposed to the "chitosan".

The expression of BMP-2 was 542.63 times compared to control after 2 hours exposure and it was maintained 16.60 times till 24 hours.

2. The expression of BMP-4 was decreased compared to control during exposure.

3. The expression of BMP-7 revealed two peaks during exposure.

4. The expression of osteocalcin was increased in early phase, and then decreased.

Although it is not clear whether the "chitosan" is clinically effective material as a "bone induction material", we could say that it has a function for bone induction.

Further detailed study will be required.

Key words : Osteoblast, Chitosan, BMP-2

I. 서 론

셀룰로오즈 다음으로 자연계에 풍부하게 분포하는 키틴(poly-β-(1→4)-N-acetyl-D-glucosamine)은 주로 계와 새우같은 절지 동물의 껍질로부터 추출하여 얻을 수 있는 고분자의 천연 물질이다. 키토산은 이러한 키틴을 알칼리로 탈아세틸화(poly-β-(1→4)-D-glucosamine)하여 생합성할 수 있는 물질로서 상처 치유를 촉진하며 독성이 적고 항원 작용이 거의 없으며, 또한 알칼리인포스파타제(alkaline phosphatase)의 활성도를 증가시켜 골전도가 가능하고 생체에서 분해된다. 생체내에서 키틴은 키틴 가수 분해효소나 라이소자임에 의해 분해되며, 키토산은 키토산 가수분해효소로 분해된다. 이처럼 키토산의 낮은 독성, 생체 분해성, 낮은 항원성 등과 같은 생체 친화성과 창상치유 촉진, 세포 활성화,

면역능력 보강, 세균 발육 억제, 특히 구강내 연쇄상구균의 흡착 방지, 알칼린 포스파타제의 활성도 증가 등과 같은 생물학적 기능 등으로 인하여 의학 및 치의학 영역에서 활발하게 연구되고 있다. 또한 최근 키토산이 친수성을 가지고 있으므로 혈액이나 조직액과 접촉하면 팽창하고 팽창된 상태에서 탄력성을 보유하는 충격 완화 효과를 이용하여 키토산을 티타늄 임플란트 표면의 피복 물질로 사용할 수 있는 연구도 활발하다^{1,3)}. 또한 키토산을 이용하여 차단막을 만들어 골 결손부의 골재생을 유도하는 연구도 진행되고 있다.

키토산을 수산화인회석이나 삼인산칼슘(tricalcium phosphate) 등과 혼합한 반죽(paste) 형태나 3차원적 열개(scaffold) 형태로 골 유도물질의 전달자 역할을 하거나 혹은 그 자체가 골전도를 하는 역할에 관한 연구도 활발하다^{4,9)}. 그러나 키토산의 직접적인 골유도 여부에 관하여는 아직 알려져 있지 않다.

골형성은 다잠재성 줄기세포(multipotential stem cell)의 골형성 세포로의 변환, 조골세포로의 분화, 골기질 형성과 광물화를 요구하는 복잡한 생물학적 과정이다. 골은 광화된 특수 결합조직으로서 33%가 유기 기질로 되어 있으며, 이중 28%는 제 1형 교원성 단백질이고 나머지 5%는 osteonectin, osteocalcin, 골분화유도단백(Bone Morphogenic Protein. BMP), bone proteoglycan, 그리고

안 병 근

150-719, 서울 영등포구 영등포동 94-200

한림대학교 한강성심병원치과 구강악안면외과학교실

Byoung-Keun Ahn

Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Medicine, Hallym University

94-200, Youngdeungpo-dong, Youngdeungpo-gu, 150-719, Korea

Tel : 82-2-2639-5580 Fax : 82-2-2632-2846

bone sialoprotein 등을 포함하는 비교원성 단백질로 되어있다. Urist¹⁰⁾가 자가유도에 의한 골형성을 최초로 소개한 이후 골분화 유도단백의 작용에 의해 골이 형성된다고 하는 골유도 개념이 정립되었다¹¹⁾. 그 후 Wang¹²⁾ 등에 의해 비로서 BMP활성을 가진 요소의 확인과 특성, 기능, 위치 등이 알려졌다. BMP2, 4, 7은 TGF- β (Transforming growth factor- β)의 하위그룹(subgroup)이며 모두 골유도성이고 BMP7은 osteogenic protein-1(OP-1)이라고도 불리어진다. BMP7은 동물이 발달하는 동안 간엽상피유도, 골유도 같은 다양한 기능을 갖고 있다¹³⁾. Schmitz & Hollinger¹⁴⁾는 동물의 두개골에 형성된 임계크기의 결손부를 rh(recombinant human)BMP-2와 BMP-7으로 처리시 신생골이 형성되었으며 재생된 골은 인접골과 형태학적 차이가 없다고 보고하였다. 한편 Boyne 등¹⁵⁾은 인체에서 rhBMP-2와 흡수성 콜라겐 스폰지를 이용하여 상악동저 거상술을 시행한 결과 골대체물로 사용이 가능하다고 보고하였다. Osteocalcin은 골형성의 생화학적 표지자인 비타민K 의존성 단백질로써 조골세포에서 합성된다. Osteocalcin은 비교원성 단백질로써 혈중 농도가 골형성 여부를 확인할 수 있는 요소이다. 키토산 열개를 이러한 골형성단백질의 전달자로 사용하면 골대체물로 사용이 가능할 것이며 만일 키토산이 골유도작용이 있다면 적절한 3차원 구조를 만들어 골대체물로 직접 사용이 가능할 것이다.

이에 본 연구자는 키토산의 골 형성능 기전을 밝히기 위하여 키토산을 코팅한 배지에 조골세포를 배양하여 조골세포내에서 BMP 2, 4, 7과 osteocalcin의 발현과 시간 경과에 따른 각 유전자의 mRNA 발현량을 비교 관찰하였다.

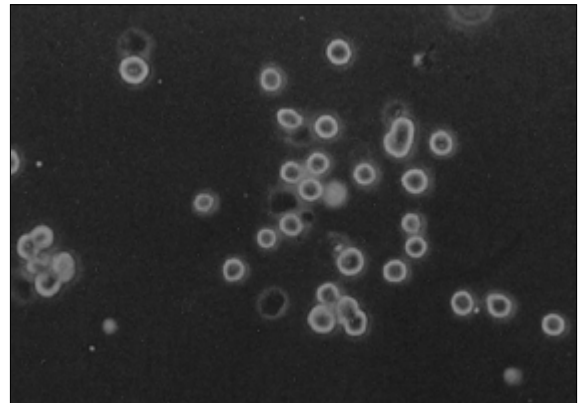
II. 재료 및 방법

1. 재 료

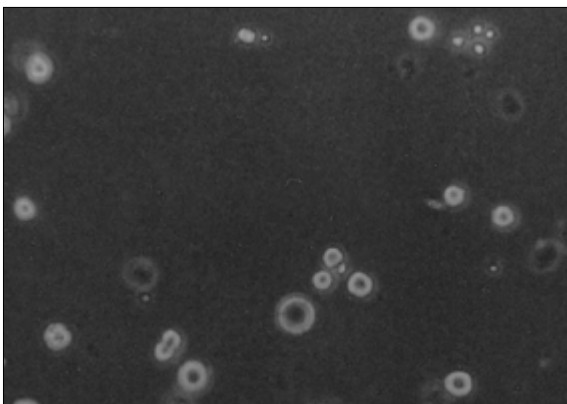
본 실험에 사용된 MG-63 세포주는 골육종 조직에서 얻은 조골 세포주으로써 한국생명공학연구원에서 분양받았다. 세포배양실험은 1차 배양으로 세포수를 증식시킨 후 serum free medium에서 24시간 경과 후 키토산 코팅한 배양접시에 세포를 노출시켜 노출 직후, 2, 4, 8, 12, 24 시간 후에 세포 반응을 비교 관찰하였다 (Fig. 1, 2, 3).

2. 방 법

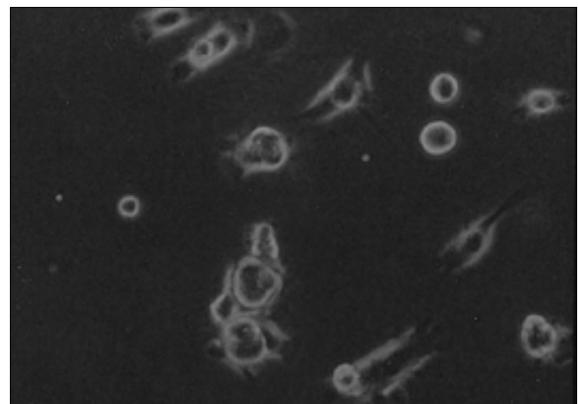
Total RNA를 추출하기 위하여 TRI REAGENT[®](Molecular Research Center, Inc., USA)로 제조사의 지침서에 따라서 시행하였다. TRI REAGENT[®]를 가한 후에 시핀은 섭씨 4도, 12000 rpm에서 10분간 원심분리를 시행하였고, 상층액을 새로운 튜브에 옮긴 후 0.2 ml의 chloroform을 가한 후 섭씨 4도, 12000 rpm에서 15



osteoblast and chitosan x 200
Fig. 1. The manifestation of osteoblast after 2hr



osteoblast and chitosan x 200
Fig. 2. The manifestation of osteoblast after 4hr

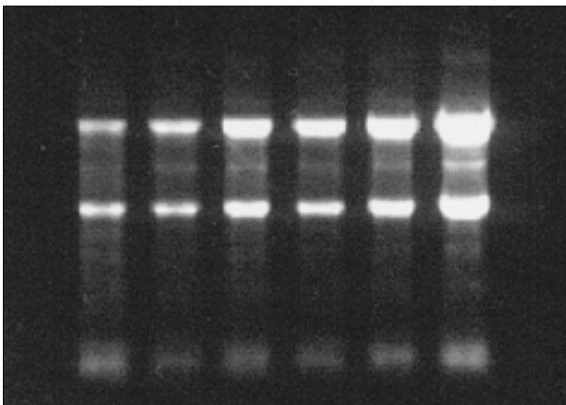


osteoblast and chitosan x 200
Fig. 3. The manifestation of osteoblast after 12hr

분간 원심분리를 시행하였고, 이 시편의 상층액에 RNA가 존재하였다. 0.5 ml의 isopropanol을 가하여 RNA를 침전시킨 후 실온에서 5-10분 정도 둔 후 섭씨 4도, 12000 rpm에서 8분간 원심분리를 시행하였고, 추출된 RNA pellet은 수집 후 75% ethanol로 세척하였다.

이렇게 추출된 Total RNA는 FORMAzol®(Molecular Research Center, Inc., USA)에 용해시킨 후 RNase free Dnase I(Message Clean®, GenHunter, USA)로 처리하여 혹시 있을 지 모르는 genomic DNA에 의한 오염을 막았으며, 얻어진 RNA의 농도는 Spectrophotometer(Ultrospec2000 UV/Visible Spectrometer, Pharmacia Biotech, USA)로 측정하였다(Fig. 4).

BMP와 osteocalcin cDNA의 합성 및 증폭은 RT-PCR kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA)를 이용하여 시행하였다. 5 µl의 Total RNA를 넣어 전체 부피가 19 µl가 되도록 DEPC를 첨가하였다. 여



BMP-2 BMP-4 BMP-7 Osteo Osteo GAPDH
calcin pontin

Fig. 4. RNA Gel

기에 1.5 µl의 oligo(dT) primer (100 ng/µl)를 첨가한 후에 섭씨 65도에서 5분간 배양하고 실온으로 서서히 온도를 낮추었다. 이어서 2.5 µl의 10x first-strand buffer, 0.5 µl의 Rnase Block Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl), 1 µl의 100 mM dNTP, 그리고 0.5 µl의 MMLV-RT (50 U/µl)를 용액에 첨가하였다. 역전사 혼합물은 Gene Amp PCR system 2400 (Perkin-Elmer Cetus, USA)를 이용하여, 섭씨 37도에서 1시간 동안 배양하고 섭씨 90도에서 5분간 배양하였다.

BMP-2, -4, -7과 osteocalcin, GAPDH의 시발체 디자인과 PCR 조건은 Table 1과 같다.

시발체의 디자인이 적절하였는 지를 확인하기 위하여 PCR을 시행한 후에 유전자 서열을 분석한 결과 Gene Bank에서 참고로 하였던 유전자 서열과 일치하는 것을 확인하였다. 각 시편에서 해당 유전자의 정량적 분석은 ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystem, CA, USA)를 이용하여 시행하였다. GAPDH를 따로 PCR할 때 발생하는 오류를 피하기 위하여 각 시편에는 정량분석하고자 하는 유전자의 시발체와 GAPDH의 시발체를 함께 넣어서 PCR을 시행하였고, 키토산에 노출되지 않은 경우 정량분석하고자 하는 유전자의 발현량을 1로 하여 각 시간 별로 해당유전자의 발현량을 아래 공식을 이용하여 계산하였다.

$$\frac{\text{실험 조건에서 A 발현량}}{\text{기본적인 A 발현량}} = (1 + \text{증폭효율})^{-\Delta\Delta CT}$$

($\Delta\Delta CT$ = 실험조건에서 A가 검출 가능한 최소 PCR cycle 횟수 - 기본조건에서 A가 검출가능한 최소 PCR 횟수)

기기의 특성상 증폭효율은 1에 가깝기 때문에, 이 비율은 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 로 계산하였다. 각 실험 조건에서 정확한 상대적인 유전자 발현량을 얻기 위하여, 각기 다른 배양접시에서 얻은 샘플에서 3회 반복하여 조사 분석하였다.

Table 1. Primer design

Name	Primer site		Size	Product size
BMP 2	Sens	agatgcaagatgctttagga	20mer	401
	Anti	acgttttctctttgtgga	20mer	
BMP4	Sens	gtgactcacctccatcagac	20mer	409
	Anti	aattgacagaattgaccagg	20mer	
BMP7	Sens	caggaatcggatctctt	20mer	419
	Anti	tacagctcgtgctttaca	20mer	
Osteocalcin	Sens	agagccctcacactcte	20mer	288
	Anti	gataggcctcctgaaagc	20mer	
Osteopontin	Sens	ggtttatggactgaggtaa	20mer	410
	Anti	cttctactttgggggtct	20mer	
GAPDH	Sens	gaaggactcatgaccacagt	20mer	450
	Anti	ataccaggaatgagcttga	20mer	

III. 결 과

BMP-2는 노출 2시간 경과시 대조군에 비하여 542.63 ± 24.23 배 발현량이 증가되었으며, 4시간후 283.66 ± 35.57 배, 8시간후 38.85 ± 7.04 배, 12시간후 13.49 ± 6.73 배, 24시간후 16.60 ± 4.33 배로 증가된 발현량을 유지하였다(Fig. 5).

BMP-4는 노출 2시간 경과시 대조군에 비하여 0.35 ± 0.04 배 발현량을 보였으며, 4시간후 0.29 ± 0.01 배, 8시간후 0.48 ± 0.06 배, 12시간후 0.71 ± 0.09 배, 24시간후 0.56 ± 0.07 배로 발현량이 정상인 경우에 비하여 감소된 양상을 보였다(Fig. 6).

BMP-7은 노출 2시간 경과시 대조군에 비하여 1.16 ± 0.54 배 발현량이 증가되었으며, 4시간후 2.16 ± 0.06 배, 8시간후 1.44 ± 0.09 배, 12시간후 2.16 ± 0.05 배, 24시간후 1.44 ± 0.02 배로 증가된 발현량을 유지하였다(Fig. 7).

Osteocalcin은 노출 2시간 경과시 대조군에 비하여 1.13 ± 0.09 배 발현량이 증가되었으며, 4시간후 1.78 ± 0.15 배, 8시간후 0.70 ± 0.05 배, 12시간후 0.49 ± 0.02 배, 24시간후 0.28 ± 0.03 배로 발현량이 나타났다(Fig. 8).

IV. 고 찰

외상이나 질병에 의한 안면골의 결손부가 작다면 특별한 처치를 하지 않더라도 치유가 잘 일어나지만 결손부의 크기가 크다면 부족한 양 만큼 자가골 이식을 하거나 골대체물을 이용하여 결손부를 수복하게 된다. 자가골이식이 가장 믿을 만한 치료술 식이기는 하나 이미 널리 알려진대로 골채취를 위한 수술을 또 해야하는 어려움이 따른다. 최근 조직공학이 발달함에 따라 골대체물을 만들고자 하는 연구들이 활발하게 이루어지고 있다. 골세포(osteocyte)역시 삼차원적 다공성 겔에서 표현형을 유지하면서 증식될 수 있다면 이를 이용하여 골재생에 사용할 수 있는 새로운 골 대체물의 개발이 가능할 것이다.

골이나 연골의 손상을 치료할 때 조골세포나 연골세포의 성장과 표현형 변환(phenotypic conversion)을 도와주는 생체활성물질이 있다면 조직 공학적인 측면에서 대단히 고무적인 일이다. 키토산은 N-글루코사민이나 하이알루론산과 화학 구조가 유사하며 상처 치유 작용이 있으나 인간의 조골세포와 연골세포를 증식시키는데 키토산이 어떠한 역할을 할 수 있는지에 대해 알

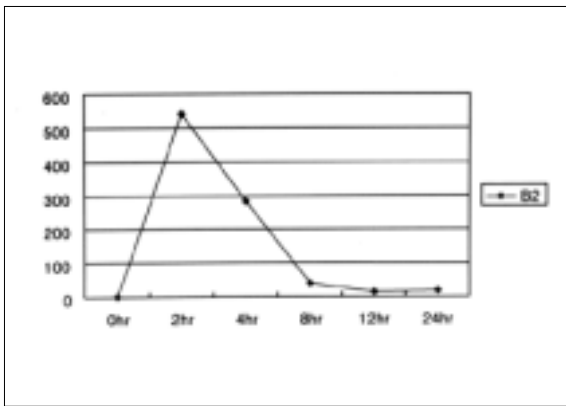


Fig. 5. BMP-2

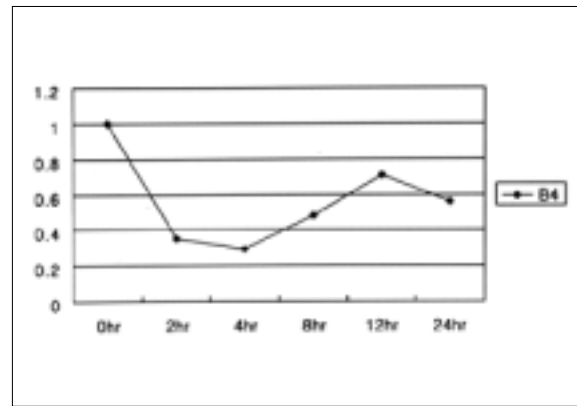


Fig. 6. BMP-4

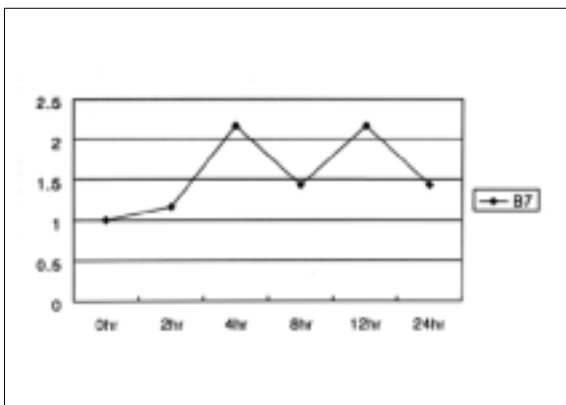


Fig. 7. BMP-7

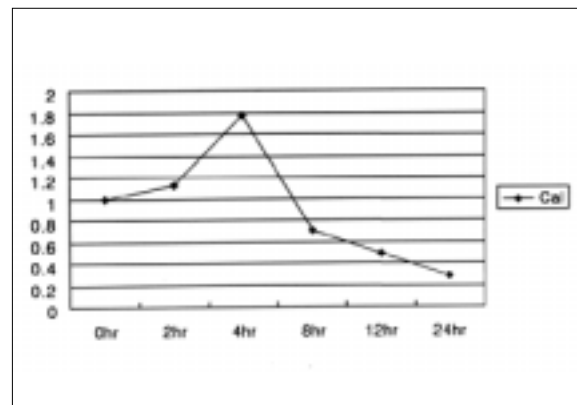


Fig. 8. Osteocalcin

려진 바는 거의 없다. 키토산이 결합조직의 재형성을 촉진시켜 창상 치유를 빠르게 한다고 알려져 있으나 역시 그 기전에 대하여는 별로 알려진 바가 없다. Peluso 등¹⁰은 실험실 연구를 통해 키토산이 macrophage nitrogen oxide 생산과 화학주성(chemotaxis)를 촉진하는 효과가 있다고 하였고, Ueno 등^{17,18}은 L929 마우스 섬유아세포를 키토산으로 배양하고 세포외기질의 생성에 관해 실험실 연구를 한 결과, 제 1, 3형 콜라겐과 피브로넥틴이 키토산과 관계없이 L929에서 분비되었지만 세포외기질의 양에는 키토산으로 배양한 것과 대조군간에 차이가 없다고 하였고, 또한 대식세포를 키토산으로 자극하여 TGF 1과 platelet-derived growth factor(PDGF) mRNA 발현과 단백질 형성을 검정해 본 결과 키토산이 직접적으로 섬유아세포에 의한 세포외기질의 형성을 촉진하는 것이 아니라 성장 요소들을 자극하여 세포의 기질의 형성을 촉진한다고 하여 키토산이 창상치유 초기에 다형핵백혈구에 영향을 미쳐서 오스테오폰틴의 합성을 촉진한다고 하였다.

Klokkevold 등¹⁹은 조골세포의 분화와 골형성에서 키토산이 골전구세포(osteoprogenitor cell)들의 분화 잠재력을 높이고 골형성을 촉진시킬 수도 있는 것으로 보고하였고, Lu 등⁸은 쥐의 무릎 연골에서 키토산이 골단 성장과 관절 연골의 치유에 영향을 미칠 수 있는 것으로 보고하였다. Lahiji 등²⁰은 키토산이 사람 조골세포와 연골세포의 성장과 기능을 지속적으로 할 수 있게 해주는 기질로 역할을 할 수 있으므로 골이나 연골 결손을 치료할 수 있는 재료로의 가능성을 제시하였다.

한편 키토산을 골형성 단백질 등과 같은 성장 요소들의 전달자(carrier)로 사용하고자 하는 시도도 최근 활발하게 연구되고 있다. Mattioli-Belmonte 등²¹은 손상된 연골의 치유 개시와 촉진을 위하여 골형성단백질을 N,N-dicarboxymethyl 키토산을 전달물질로 하여 동물 실험 해본 결과 BMP-7이 관절환경내에서 연골세포 형상을 보이는 세포들이 증식하면서 관절면 병소의 일부가 치유되기 시작하는 것을 관찰하여 N,N-dicarboxymethyl 키토산이 분자나 약물 전달에 유용하게 사용될 수 있다고 하였다.

Lee 등⁹은 키토산-삼인산 스폰지를 3차원적인 골세포 배양 알개로 하여 응서의 두개골 조골세포를 사용한 결과 알카린포스파타제 활동성이 증가하는 것으로 보아 조골세포의 증식과 분화가 활발해짐을 알 수 있었으며 조골세포들이 알개 내에 잘 부착되어 골세포로 분화되면서 56일째 조건에서는 일부 석회화한 조직이 알개 내에 형성되었다고 보고하였다. 그는 키토산/TCP 스폰지가 골이 결손되어 골이 재생되어야 할 부위에 조골세포들이 성장하여 골이 잘 만들어질 수 있는 알개로써의 역할을 할 수 있다고 하였다. Zhao 등⁸은 키토산-젤라틴/수산화인회석 복합물을 자가 조골세포의 전달 알개로 사용할 가능성이 있다고 하였다.

Kawakami 등²²은 키토산과 수산화인회석을 혼합한 반죽이 골전도 효과가 있는지를 방사선 검사와 조직학적 검사를 통해 연구한 결과 골전도성이 있으며 생체활성의 골대체물로 사용할 수 있다고 하였다. Muzzarelli 등^{6,7}은 가토 경골에 결손부를 형성하고 냉동건조한 methylpyrrolidinone 키토산으로 채운 다음 60일 경과 후 methylpyrrolidinone 키토산의 양이온과 킬레이팅 능력이 광화

(mineralization)를 쉽게 해주어 골양조직이 형성되고 난 후 광화가 일어나면서 막내골화 형성이 일어났다고 하였다. 또한 Muzzarelli^{6,7}은 골전도 효과가 있다고 알려진 겔 상태의 methylpyrrolidinone 키토산을 지지 받치 후에 발생한 받치창에 매식한 후 방사선 관찰을 해 본 결과 6개월 후 라이소자임에 의해 완전히 분해되면서 골로 충전되었고 1년이 경과된 후에도 특이 소견이 관찰되지 않았다고 하였다. Ito 등²³은 키토산과 베타삼인산 칼슘(beta tricalcium phosphate)을 혼합하여 골충전 물질로 사용이 가능하다고 하였다.

최근 Finisic 등⁹은 키토산과 수산화인회석으로부터 바이오세라믹을 만들었다. 키토산은 칼슘이온이 있는 곳에서는 물에 녹지 않는 겔을 형성하며 골전도성을 가지고 있다. 그는 이러한 성질을 지닌 겔을 고체상의 수산화인회석 입자와 혼합하면 생체적합성이 좋은 바이오세라믹 골 대체물을 제작할 수 있다고 하였다. 이와 함께 키토산을 이용하여 차단막을 제작하고 이를 유도골 재생술에 이용하고자 하는 연구도 최근 이루어지고 있다. Hidaka 등은 65, 70, 80, 94 및 100% 탈아세틸화한 키토산(키토산)으로 차단막을 만들어 응서 두개골의 골결손부를 피개하고 유도골 재생효과를 연구한 결과 65, 70, 80% 탈아세틸화된 차단막의 경우 초기에 심한 염증 반응을 보였으나 육아조직에서 오스테오칼신에 양성 반응을 보이는 세포가 검출되었다. 이에 반해 94와 100% 탈아세틸화 된 키토산에서는 경도의 염증반응을 보였으나 골재생효과가 미약하다고 하였다.

이제까지 행해진 키토산 연구는 상기한 바와 같이 키토산의 골전도성이나 전달물질로써의 능력에 대한 것들이었다. 그러나 본 연구자는 키토산이 직접 골을 유도할 수 있는 성질이 있을 것으로 추측하고 골유도능에 대한 연구를 시행한 결과, 조골세포가 키토산에 노출되었을 때 일어나는 변화 중에서 가장 특징적인 것은 BMP-2의 강력한 과발현이었다. 이는 노출 2시간 경과시 542.63배로까지 발현량이 증가되었고, 이는 24시간 경과시까지 16.60배로 비교적 높은 수준을 유지하였다. 이에 비하여 BMP-4는 전반적으로 발현이 억제되는 것으로 나타났는데, 이는 BMP-2의 과발현이 알려지지 않은 기전을 통하여 BMP-4의 발현을 억제하여 나타나는 것으로 생각된다. 특히 4시간 후에 발현량은 키토산에 접하지 않은 경우에 비하여 약 3분의 1 수준을 유지하였다. 또한 BMP-7은 발현양상이 두 차례(4시간, 12시간 경과후)에 걸쳐서 최고치를 보이는 것으로 보였는데, 4시간 경과후 2.16배의 발현량은 키토산에 조골세포가 접촉하여 발생한 세포 내 변화로 보이며, 12시간후 다시 2.16배의 발현량을 보이는 것은 초기에 합성되어 세포외로 배출된 BMP-2가 조골세포의 세포막에 신호를 주어 BMP-7의 발현량을 다시 증가시킨 것으로 추정된다. osteocalcin의 발현은 초기에는 증가하다가 계속 감소되는 양상을 보이는 데, 이는 키토산에 접촉시 조골세포에서 osteocalcin의 발현이 유도되나, 이보다 훨씬 많이 만들어진 BMP-2가 세포외로 배출되어 조골세포에 영향을 미치면 BMP-2의 영향으로 osteocalcin의 발현이 억제되어 발생한 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구는 키토산의 골 형성능의 기전을 밝히기 위하여 키토산을 코팅한 배지에 조골세포를 배양하여 조골세포 내에서 골형성과 연관된 BMP 2, 4, 7과 osteocalcin의 발현을 RT-PCR을 이용하여 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. BMP-2의 강력한 과 발현으로 노출 2시간 경과 시 542.63배까지 발현량이 증가하였고 24시간 경과 시 16.60배였다.
2. BMP-4는 전반적으로 발현이 억제되었다.
3. BMP-7은 발현양상이 두 차례의 최고치를 보였다.
4. Osteocalcin의 발현은 초기에 증가하다가 계속 감소되는 양상을 보였다.

이러한 결과를 통하여 키토산이 골 유도를 할 수 있는 능력을 가지고 있음을 알 수 있었지만 향후 지속적인 연구를 통해 골 유도기전에 대한 연구가 필요하다고 사료된다.

참고문헌

1. 이용찬, 이유현, 조병욱, Chitosan coated dental implants: a new concept, 대한치과의사협회지, 36(6): pp.394-396, 1998.
2. 박연천, 안병근, 박영주, 이용찬, 조병욱, Confocal laser scanning microscopy study on interface bone and titanium implant coated chitosan, 대한구강악안면외과학회지, 24(4): pp.440-447, 1998.
3. 김관식, 조병욱, 이용찬 : 가토경골 골결손부에서 Nylon membrane 과 Teflon membrane의 골유도 재생효과, 대한구강악안면외과 학회지 26(2): 146-153, 2000.
4. Lu JX, Prudhommeaux F, Meunier A, Sede L & Guillemin G, Effects of chitosan on rat knee cartilage, Biomaterials, 20(20): pp.1937-1944, 1999.
5. Lee YM, Park YJ, Lee SJ, Ku Y, Han SB, Choi SM, Klokkevold PR & Chung CP, Tissue engineered bone formation using chitosan/tricalcium phosphate sponges, J Periodontol, 71(3): pp.410-417, 2000.
6. Muzzarelli RA, Biagini G, Bellardini M, Simonelli L, Castaldini C & Fratto G, Osteoconduction exerted by methylpyrrolidinone chitosan used in dental surgery, Biomaterials, 14(1): pp.39-43, 1993.
7. Muzzarelli RA, Zucchini C, Ilari P, Pugnali A, Mattioli Belmonte M, Biagini G & Castaldini C, Osteoconductive properties of methylpyrrolidinone chitosan in an animal model, Biomaterials, 14(12): pp.925-929, 1993.
8. Zhao F, Yin YJ & Song XF, Study on chitosan-gelatin/hydroxyapatite composite scaffolds-preparation and morphology, Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 15(5): pp.276-279, 2001.
9. Finisic MR, Josue A, Favere VT & Laranjeira MC, Synthesis of

- calcium-phosphate and chitosan bioceramics for bone regeneration, An Acad Bras Cienc, 73(4): pp.525-532, 2001.
10. Urist MR, Bone formation by autoinduction, Science, 150: pp.893-899, 1965.
11. Urist MR & Strates BS, Bone morphogenetic protein, J Dent Res, 50: pp.1392-1406, 1971.
12. Wang EA, Rosen V & Cordes P, Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors, Proc Natl Acad Sci USA, 85: pp.9484-9488, 1988.
13. Cook SD & Rueger DC, Osteogenic protein-1: Biology and application, Clin Orthop Relat Res, 324: pp.29-38, 1996.
14. Schmitz JP & Hollinger JO, The critical sized defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions, Clin Orthop, 205: pp.299-308, 1986.
15. Boyne PJ, Marx RE & Nevins M, A feasibility study evaluation rhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus augmentation, Int J Periodont Res Dent, 17: pp.11-25, 1997.
16. Peluso G, Petillo O, Ranieri M, Santin M, Ambrosio L, Calabro D, Avallone B & Balasamo G, Chitosan-mediated stimulation of macrophage function, Biomaterials, 15(15): pp.1215-1210, 1994.
17. Ueno H, Murakami M, Okumura M, Kadosawa T, Ueda T & Fujinaga T, Chitosan accelerates the production of osteopontin from polymorphonuclear leukocytes, Biomaterials, 22: pp.1667-1673, 2001.
18. Ueno H, Nakamura F, Murakami M, Okumura M, Kadosawa T & Fujinaga T, Evaluation effects of chitosan for the extracellular matrix production by fibroblasts and the growth factors production by macrophages, Biomaterials, 22(15): pp.2125-2130, 2001.
19. Klokkevold PR, Vandemark L, Kenney EB & Bernard GW, Osteogenesis enhanced by chitosan(poly-N-acetyl glucosaminoglycan) in vitro, J Periodontol, 67(11): pp.1170-1175, 1996.
20. Lahiji A, Sohrabi A, Hungerford DS & Frondoza CG, Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes, J Biomed Mater Res, 15:51(4): pp.586-595, 2000.
21. Mattioli-Belmonte M, Gigante A, Muzzarelli RA, Politano R, De Benedittis A, Specchia N, Buffa A, Biagini G & Greco F, N-N-dicarboxymethyl chitosan as delivery agent for bone morphogenetic protein in the repair of artificial cartilage, Med Biol Eng Comput, 37(1): pp.130-134, 1999.
22. Kawakami T, Antoh M, Hasegawa H, Yamagishi T, Ito M & Eda S, Experimental study on osteoconductive properties of a chitosan-bonded hydroxyapatite self-hardening paste, Biomaterials, 13(11): pp.759-763, 1992.
23. Ito M, Miyazaki A, Yamagishi T, Yagasaki H, Hashem A & Oshida Y, Experimental development of a chitosan-bonded beta-tricalcium phosphate bone filling paste, Biomed Mater Eng, 4(6): pp.439-449, 1999.