

키토산이 치은섬유아세포에 미치는 영향

김옥수 · 정현주

전남대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

조직형성을 유도하는 적절한 생물질을 이용하여 동일한 생체조직을 만들고자 하는 새로운 접근으로서 조직공학을 이용하여 다양한 흡수성 기질에 분주된 세포를 배양하여 조직형성 할 수 있다. 이런 조직공학의 골조직과 연조직 기질로는 인산칼슘, polylactic acid와 같은 다양한 합성물을 비롯하여 교원질, 섬유소, 키토산 같은 천연 중합체 등이 이용된다¹⁾.

키토는 자연계에서 풍부한 천연 생고분자로서 새우나 게와 같은 갑각류의 외골격을 이루는 주성분이며, 진균류나 곰팡이 또는 효모의 세포벽의 주성분을 구성하고 있는 매우 안정된 다당류이다²⁾. 키토산(1-4, 2-amino-2-deoxy- β -D-glucan)은 키토를 고온의 강알칼리로 처리하여 측쇄(side chain)를 탈아세틸화하고 아민화하여 정제한 탄수화물이며 800-1500 Kd 고분자로서 hyaluronic acid와 비슷한 구조이다³⁾. 키토산은 신체 조직과 유사한 글루코즈아민 결합으로 생체적합성이 우수하며, 생분해되며 독성이 없으며 금속이온을 킬레이트화하고⁴⁾, 용액, 분말, 박편, 겔 및 얇은 필름 형태로 공급되고 특이한 화학구조와 생물학적인 성질로 인하여 다양한 분야의 생체재료로 이용되고 있다. 키토산은 생체 재료로서 화상부

위를 보호하면서 신생 조직의 재생 촉진의 목적으로 인공피부재로 이용되며 기계적 강도가 우수하고 물질의 투과 조절이 용이하므로 생체흡수성 봉합사로도 활용성이 크다. 키토산은 배양피부의 진피를 만드는데 교원질과 함께 이용되기도 한다⁵⁾. 키토산은 피부 창상 치유에 도움이 되고⁶⁾ good-looking healing skin surface를 얻을 수 있으며^{7~9)}, Sapelli 등¹⁰⁾은 치주낭, 구개부 상처 및 발치창의 치유에 키토산 분말을 이용하여 만족할 만한 임상적 결과를 얻었다고 보고하였다.

섬유아세포는 치주조직의 연조직을 이루는 주요 세포이며 정상적인 기능, 병리학적인 변형에 있어 중요한 역할을 한다. 섬유아세포는 다양한 형태의 결합조직을 합성하고 유지하며, 재생 및 형성 동안 조직의 구조화에 있어 형태 유지하는데 도움을 준다. 이들 세포는 구조 단백질 합성을 통해 상처 치유에 관여하며 세포외 기질의 재조직화와 상처의 수축을 촉진시킨다. 이런 세포와 생물질과의 관계가 세포배양 방법을 이용하여 연구되고 있다¹¹⁾. 세포의 부착, 증식, 형태 및 기능적 변화는 호르몬, 성장인자 등과 같은 생체 성분과 합성물 표면의 생화학적 특성에 의해 달라질 수 있다. 키토산을 이용한 세포 수준의 연구로 Klokkevold 등¹²⁾은 키토산을 세포 배양접시

에 피복하여 백서의 두개관세포를 배양한 결과 키토산이 골전구세포의 분화를 돕고 골조직 형성을 촉진함을 보여주었다. 김 등¹³⁾은 키토산이 치주인대세포, 두개관세포, 치은섬유아세포에 미치는 영향을 평가하였는데 치은섬유아세포의 증식이 억제되었다고 하였다. Chuang 등¹⁴⁾은 PVA/chitosan의 혼합된 막이 세포배양을 위한 생물질로 이용될 수 있다고 보고하였다.

그러나 현재까지 키토산이 세포에 미치는 작용은 아직 분명하지 않으며 이에 대한 연구는 드문 편이다. 이에 본 연구에서는 키토산이 치은섬유아세포의 부착, 증식, 형태 및 기능에 미치는 영향을 관찰하여 향후 치주조직 재생에 이용될 수 있는지 알아보고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 배양접시내 키토산 피복처리

0.1% 초산에 키토산(평균 분자량 : 400 KDa, (주)자광)을 0.02, 0.2, 2mg/ml의 농도로 용해시킨 후 96-microwell plate (Nunc, Denmark)에 35 μ l, 24-microwell plate (Costar, USA)에 60 μ l씩 넣고 자외선 하 배기기 내에서 하루 동안 두어 건조하였다. Phosphate-buffered saline (PBS ; Sigma, USA)으로 세척한 다음 다시 자외선 하 배기기 내에서 건조시켰다.

2. 치은섬유아세포의 배양

건강한 치은 조직을 2% 항생제가 함유된 PBS로 5회 세척한 후 0.2% dispase (Gibco, USA)가 함유된 Hank's balanced salt solution (Gibco, USA)에 담고 4 $^{\circ}$ C, 16 ~ 22시간 두어 상피와 결합조직을 분리하였다. 얻어진 결합조직을 2% 항생제가 함유된 PBS로 세척하고 약 1 x 1 x 1mm 크기로 세절한 후 35mm 배양 접시에 조직을 부착 시킨후 1% 항생제와 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 첨가하여 이산화탄소배양기에 두었고 다음날부터 배지를 교환하고 그 후로는 3

일마다 교환하였다.

약 20 ~ 30일 후 조직절편으로부터 성장된 세포가 밀생에 도달한 후 0.05% trypsin/0.53mM EDTA (Gibco, USA)를 첨가하여 세포를 배양접시로부터 분리하였고 10% FBS가 함유된 DMEM 배지 1ml를 첨가한 후 1000rpm에서 10분간 원심분리하여, 계대배양하였고 4 ~ 7세대의 세포를 실험에 사용하였다.

3. 세포 부착 및 세포 활성 측정

계대배양한 치은섬유아세포를 0.02 ~ 2mg/ml 농도의 키토산이 피복된 96-microwell plate에 1 X 10⁴ 세포 밀도로 분주하고 37 $^{\circ}$ C, 5% 이산화탄소 배양기 내에서 배양하여 0.5, 1.5, 3, 6, 24시간 후 도립 위상차 현미경(Olympus, Japan) 하에서 세포의 부착 및 형태 변화를 관찰하였다. 0.05% trypsin/0.53mM 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 활성의 평가를 위하여 각 well 당 배지 양의 1/10인 20 μ l MTT (Dimethyl thiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma, USA)액을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% 이산화탄소 배양기 내에서 3시간 배양한 후 용액을 제거하였다. DMSO (Dimethyl sulfoxamide, Sigma, USA) 50 μ l를 첨가하여 formazan 결정을 녹였고 ELISA 판독용 immunoplate (Nunc, Denmark)에 옮긴 후 ELISA reader (Emax[®] precision microplate reader, Molecular Devices Corp, USA)를 이용하여 630nm를 기준으로 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 키토산이 함유되지 않은 용매만을 피복한 경우의 검사액을 대조군으로 하였다.

4. 세포 증식 및 세포 활성 측정

계대 배양한 치은섬유아세포를 키토산 처리된 96-microwell plate에 1 X 10⁴ 세포 밀도로 분주하고 배양하였다. 3일 간격으로 배지를 교환하였으며 배양 후 2, 7 일에 세포 수를 산정하고 MTT 검사를 통하여

세포 활성도를 측정하였다.

5. 알칼리성 인산분해효소 활성 측정

계대 배양한 치은섬유아세포를 키토산 처리된 96-microwell plate에 1×10^4 세포 밀도로 분주하고 이산화탄소 배양기 내에서 배양하였다. 배양 4일과 7일 후에 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후 0.1% Triton-X 100 (Sigma, USA) 50 μ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 세포를 용해시켰다. 40 μ l 표본에 알칼리성 인산분해효소 완충액(Sigma, USA)을 첨가하여 405nm에서 1분과 2분 후 p-NPP (p-nitrophenyl phosphate)의 비색 반응을 측정하여 효소 활성을 산출하였다.

6. 석회화 결절 수의 측정

키토산 처리된 24-microwell plate에 치은섬유아세포를 3×10^4 세포 밀도로 분주하고 석회화결절 형성을 유도하기 위하여 50 μ g/ml ascorbic acid (Sigma, USA), 10mM β -glycerophosphate (Sigma, USA), 10^{-7} M dexamethasone (Sigma, USA)이 함유된 DMEM 배지를 첨가하였다. 3일마다 배지를 교환하여 21일간 배양하였다. 키토산 자체가 골형성을 유도할 수 있는지 알아보기 위하여 석회화결절 유도 물질을 첨가하지 않은 경우와 비교하였다.

Ca⁺⁺의 침착 부위를 확인하기 위하여 alizarin red 염색을 다음과 같이 시행하였다. 배양접시의 배지를 제거한 후 3% formalin - PBS 용액 500 μ l를 첨가한 다음 10분 동안 실온에서 고정하여 2% alizarin red S 용액 (pH 4.1 ~ 4.3, Sigma, USA)으로 염색한 후 도립 위상차 현미경을 이용하여 X100 배율 하에서 염색된 석회화결절의 수를 세었다.

7. 통계 분석

각 실험은 4 ~ 6배수로 시행하였고, 세포 부착률, 세포 증식률, 세포 활성도, 알칼리성 인산분해효소 활성도 및 석회화 결절 수의 평균치와 표준 오차를

산출하였고 대조군과 키토산 처리한 각 군과의 차이가 통계적으로 유의한지 평가하기 위하여 Student's *t* test (*P* (0.05)를 시행하였다.

III. 결과

1. 형태변화

대조군의 경우, 배양 30분 후에 일부 세포의 부착이 관찰되었고(Fig. 7) 3시간 이후 부착된 세포는 방추 형태를 보였다. 키토산 피복하여 배양한 실험군에서는 3시간 후 둥근 세포들이 여러 개씩 응집되어 부착되어 있었는데 이는 0.02mg/ml 농도에서 가장 두드러졌고, 2mg/ml 농도에서는 두 세 개씩 둥근 세포의 응집이 있거나 단층의 둥근 세포가 관찰되었다. 6시간 이후 세포의 응집이 관찰되어 24시간 이후 완전히 응집되어 결절양상을 보였다(Fig. 8, 9).

대조군의 경우 배양 7일에 완전히 밀생에 도달하였으나 실험군에서는 세포의 밀생은 관찰되지 않았으며 부착된 둥근 세포의 응집이 관찰되었다. 0.02mg/ml 농도에서 가장 많은 세포의 응집과 결절처럼 응집된 거대세포도 관찰되었다(fig. 10). 2mg/ml 농도에서는 주로 부착된 둥근 세포가 관찰되었다. Trypsin 처리시 결절처럼 응집된 부위에서는 많은 세포들이 관찰되었고 방추형으로 부착되어 있던 세포보다 잘 분리되지 않았다(Fig. 11a, b).

2. 세포 부착에 대한 영향

키토산 피복처리 시 30분의 초기 부착률이 대조군의 10% 미만으로 크게 억제되었고 3시간 후부터 키토산 농도가 증가에 비례하여 억제효과가 크게 나타났다. 0.02 ~ 2mg/ml 농도에서는 24시간 후 대조군에 비해 72, 52, 24%의 부착률을 보여 유의하게 감소되었다(*P* (0.01)(Fig. 1).

총 부착세포의 활성도도 실험군에서 초기에는 억제되었고 0.02mg/ml 처리 시 6시간 이후부터는 대조군과 유사하였다. 그러나 0.2, 2mg/ml 농도에서의 세포 활성도는 24시간 후까지 대조군에 비해 유의하게

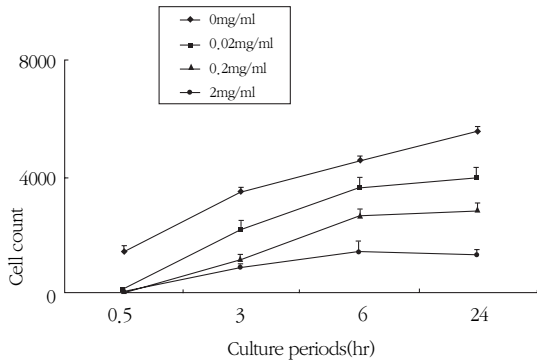


Figure 1. Effect of chitosan on the attachment of human gingival fibroblasts

적었다($P < 0.05$). 그러나, 부착된 세포수 단위당 세포 활성도는 키토산 처리군의 모든 농도에서 대조군보다 높았으며 키토산의 농도에 비례하여 활성도가 높았다(Fig. 2)

3. 세포 증식에 대한 영향

실험군에서 키토산 피복 처리 후 증식된 세포의 수는 대조군에 비해 2mg/ml 농도에서 2일에는 19%, 7일에는 45% 수준이었으나($P < 0.01$) 0.02, 0.2mg/ml 농도에서는 2일과 7일 모두 대조군의 90%, 80%의 수준으로 통계적으로 유사한 것으로 나타났다. 부착세포 수를 기준으로 증식률을 평가한 결과 0.02, 0.2mg/ml 농도에서는 대조군과 유사하였으나 2mg/ml 농도에

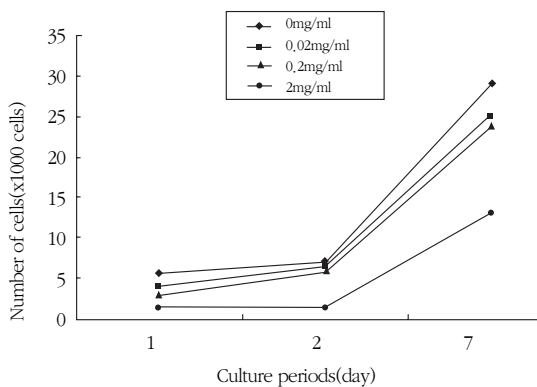


Figure 3. Effect of chitosan on the proliferation of human gingival fibroblast

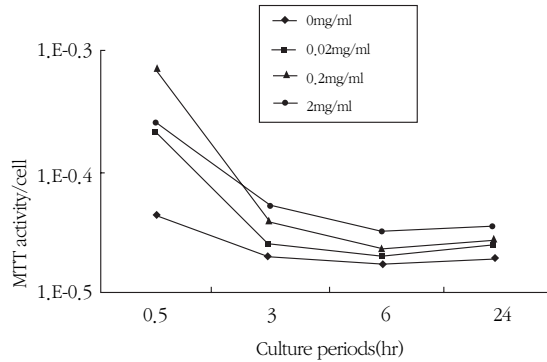


Figure 2. MTT activity per a gingival fibroblast attached on chitosan-coated well

서는 매우 낮았다(Fig. 3). 실험군에서 총 세포수의 세포 활성도는 대조군에 비해 적었으나 증식된 세포수 단위당 활성도는 부착 24시간 이내의 활성도보다 전반적으로 1/10정도로 낮았고 0.02, 0.2mg/ml 농도에서는 대조군과 유사하였으나 2mg/ml 농도에서만 배양 7일은 다른 군에 비해 현저하게 낮았다(Fig. 4).

4. 알칼리성 인산분해효소 활성에 대한 영향

대조군, 실험군 모두 배양 4일에 비해 7일의 효소 활성이 감소되었으며, 0.02mg/ml 농도에서는 대조군과 유사하였으나 그 이상의 농도에서는 효소 활성이 매우 낮았다(Fig. 5, 6). 그러나 증식된 세포수 단위당 알칼리성 인산분해효소 활성은 배양 4일에는 0.2

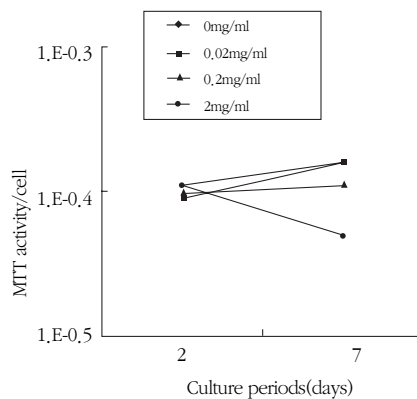


Figure 4. MTT activity per a gingival fibroblast proliferated on chitosan-coated well

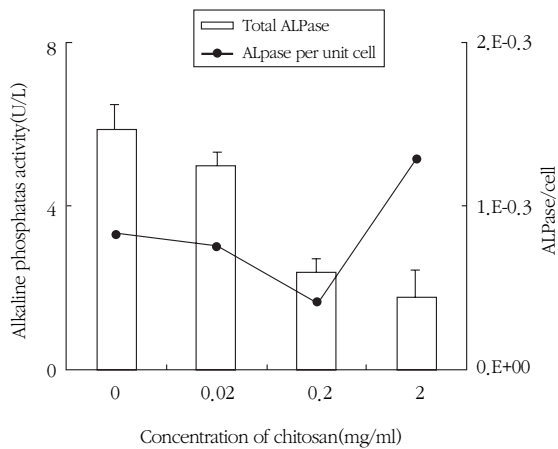


Figure 5. Alkaline phosphatase activity of gingival fibroblasts on chitosan-coated well after 4 days

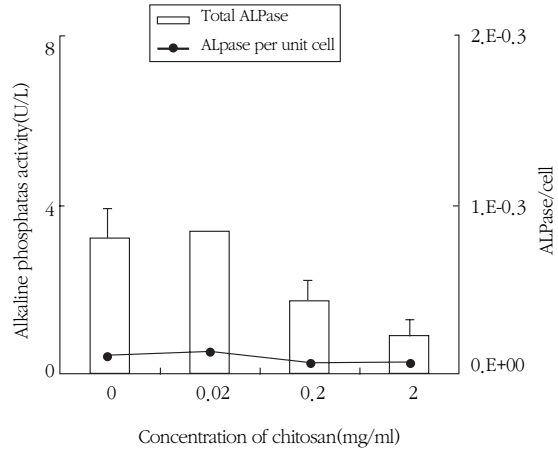


Figure 6. Alkaline phosphatase activity of gingival fibroblasts on chitosan-coated well after 7 days

mg/ml의 농도에서만 대조군과 다른 농도에 비해 낮았고 2mg/ml 농도에서 가장 높았다. 7일에는 대조군과 0.02mg/ml 농도에서의 효소 활성은 유사하였으나 0.2, 2mg/ml 농도에서는 대조군에 비해 약간 낮았다 (Fig. 5, 6).

5. 석회화결절 형성에 대한 영향

키토산 피복 부위의 세포들은 서로 응집되어 완전히 밀생에 도달하지 않았으며 대조군과 나머지 농도에서는 석회화결절 형성이 없었다. 그러나 2mg/ml 농도에서는 세포의 부착이나 증식이 매우 적었지만 남아있는 세포들이 응집되어 결절을 형성하였는데 석회화결절은 원형으로 주위에 세포가 밀집되어 있고 결절 중앙 부위가 진한 오렌지색으로 염색되었고 그 주위가 연하게 염색되는 양상을 보였다(Fig. 12). 2 mg/ml 농도에서 석회화결절 유도물질을 첨가한 경우 21일 후 well 당 6.2 ± 2.4 개, 첨가하지 않은 경우 2.0 ± 1.4 개의 석회화결절 형성이 관찰되었다.

IV. 고찰

치주조직의 재생을 목적으로 여러 이식 재료가 어

는 정도 성공적으로 이용되어 왔지만 이런 이식재들은 각기 한계점을 가지고 있다. 최근에는 부작용과 독성이 없으면서 치주재생을 자극하는 생약제, 한약제 개발이 꾸준히 시도되고 있으며, 천연 중합체인 키토산을 치주조직 재생에 이용하려는 시도들이 있다⁵⁾. 키토산은 자연으로부터 얻기 쉬운 물질로 항염유아세포 작용을 하여 상처 치유에 도움이 되며 항미생물 작용을 한다. 이러한 키토산의 생체실험은 많이 이루어졌으나 세포 수준의 연구가 아직까지는 드물어서 치주조직의 한 부분인 치은의 주요 구성세포인 치은섬유아세포의 기능에 어떤 영향을 미치는가에 대한 연구가 필요하였다.

본 연구에서는 0.02 ~ 2mg/ml 농도로 배양접시에 키토산을 피복하여 치은섬유아세포의 24시간 이내의 초기 부착률과 부착된 세포의 활성도를 측정하였다. 모든 농도에서 치은섬유아세포의 부착이 억제되었으며 0.02mg/ml 농도에서는 치은섬유아세포의 부착 억제가 24시간 후 회복되었다. 그러나 부착된 세포의 세포수 단위당 세포 활성도는 대조군보다 증가하는 경향을 보였으며 농도가 높아질수록 증가하였다. 이 결과로 키토산 처리시 치은섬유아세포의 초기 부착은 억제하지만 세포활성은 증가시킴을 알 수 있었다.

부착후 세포의 증식을 평가한 결과 치은섬유아세포는 0.02, 0.2mg/ml 농도로 처리 시 7일 후에 대조군과 거의 유사한 증식양상과 세포 활성도를 보였으나, 2mg/ml 농도에서 부착된 세포가 가장 적어 증식된 세포수도 적었으며 세포 활성도도 다른 군에 비해 낮아 농도가 높아질수록 증식이 억제됨을 알 수 있었다.

김 등¹³⁾은 0.04mg/ml의 농도로 키토산을 배지에 첨가한 후 치주인대세포, 두개관세포, 치은섬유아세포의 증식을, 단백질 합성능, 알칼리성 인산분해효소 활성도 및 석회화 결절 수를 측정했다. 치은섬유아세포는 대조군보다 증식이 더 낮았지만 통계학적으로 유의하지 않았다고 하였다. 본 연구에서도 유사한 농도인 0.02mg/ml에서 치은섬유아세포의 증식이 약간 억제되는 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.

이전의 연구에서 피복 키토산의 치주인대세포에 대한 영향을 관찰하였는데¹⁶⁾ 이를 비교하면 세포부착은 치은섬유아세포와 치주인대세포의 모든 농도에서 유사하게 억제되었다. 0.02, 0.2mg/ml 농도의 경우 7일 후 대조군에 비해 치주인대세포의 증식이 증가되었으며 2mg/ml 농도에서만 세포 증식이 억제되었다. 반면 치은섬유아세포는 0.02, 0.2mg/ml 농도로 처리 시 7일 후에 대조군과 거의 유사한 증식상을 보였으나, 2mg/ml 농도에서는 더 낮은 증식률을 보였다. 이로부터 피복 키토산 농도가 높아질수록 부착 및 증식에 방해가 됨을 알 수 있었다.

Mori 등¹⁷⁾은 키틴과 키토산을 배지에 첨가하여 rat 피부의 섬유아세포를 배양한 결과 세포증식은 촉진되지 않고 고농도의 키토산이 증식을 억제시킴을 보여주었고 섬유아세포의 증식은 키틴 유도체에 의해 간접적으로 촉진된다고 하였다. 키토산이 헤파린과 다전해질 복합체(polyelectrolyte complex)를 형성한다는 보고들^{18,19)}도 있는데, 헤파린은 항응고, 혈관형성능을 보이며, 섬유아세포 성장인자에 의해 mitogenesis를 증진시키며 섬유아세포 성장인자를 안정화시킨다.

키토산 피복된 배양접시에 세포를 접종한 후 세포 부착과 증식이 이뤄지는 동안 세포형태 변화를 도립 위상차 현미경으로 관찰한 결과, 치은섬유아세포가 둥근 모양으로 부착되었고 세포 접종 후 약 6시간부터 둥근 세포들이 서로 응집됨을 보였다. 이런 응집이 세포 배양 1일에는 불완전하였지만 2 ~ 3일 이후로는 세포의 응집이 잘 유지되었다. 대조군의 세포들은 7일 이내에 밀생에 도달하였으나 키토산 피복 한 실험군에서는 밀생에 도달하지 않았고 세포들이 응집되어 있었으며 세포 자체의 활발한 증식은 관찰되지 않았다. Hamano 등^{20,21)}은 키토산을 다전해질 복합체와 혼합하여 피복한 후 치주인대세포를 배양하여 이런 세포의 응집이 있음을 보여 주었다. 이런 응집의 형성은 세포들의 fibronectin 흡착이 방해되기 때문이라고 하였으며 응집이 일어남으로서 분화가 촉진되었다고 하였다. 또한 이들은 부착되지 않고 응집된 세포들을 세포 배양접시에 재 접종해서 10일간 배양했을 때 세포는 방추형의 퍼져 있는 세포로 완전히 분리되어 증식하였고 alizarin red 염색이 거의 염색되지 않아 세포 내 칼슘 이온이 감소됨을 관찰하였고 이는 키토산에 의한 분화 과정이 가역적일 수 있음을 보여준다고 하였다. 일반적으로 세포 배양접시에 배양된 세포들은 주로 단층으로 성장하고 탈분화된다. 그러나, 각화세포²²⁾, 골세포²³⁾는 몇몇 기질에서 3차원적인 세포의 응집을 보였다는 보고가 있었다. 이들을 미루어보아 키토산이 피복된 부위에서의 치은섬유아세포의 응집은 기능적인 분화의 한 과정이라고 추정할 수 있다. 또한 이런 응집된 세포는 트립신 처리 시 배양접시로부터 잘 분리되지 않았는데 이는 세포의 응집된 결합이 강하여 trypsin이 잘 투과되지 않았기 때문이거나 트립신 기능을 억제하는 세포간 응집 기전 때문으로 추정된다.

알칼리성 인산분해효소는 placental, intestinal, germ cell, tissue non-specific (TNAP)으로 분류되는 zinc metalloprotein이다. TNAP는 간, 골격계, 신장조직에 많이 존재하며 이를 간/골/신장 알칼리성 인산분해효소라고 한다. Hui 등²⁴⁾은 이 효소는 형성 중인 치아 및 그 주위 치주인대에 많이 분포하며, 광화과정에 중요한 역할을 하고 골아세포의 칼슘 uptake

및 섬유아세포에 의한 교원질 탐식작용에 관여한다고 보고되었다. Groeneveld 등²⁵⁾은 치주인대와 치간부 치은의 결합조직에서 알칼리성 인산분해효소의 활성이 관찰되었다고 하였으며 이는 치주인대세포와 치은의 내부에 존재하는 섬유아세포가 백악질 형성과 관련이 있다고 하였다. 세포의 표현형을 구분하는 데 있어 내재성 알칼리성 인산분해효소의 활성도가 있음은 골아세포의 표현형을 가짐을 의미한다. 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 등²⁶⁾은 *in vitro* 실험에서 치주인대세포가 같은 환자로부터 얻은 치은섬유아세포보다 더 높은 알칼리성 인산 분해효소 활성도를 보이며 석회화 결절을 형성한다고 확인하였고 알칼리성 인산분해효소 활성도의 증가는 석회화가 촉진됨을 반영한다고 보고하였다.

키토산 피복 후의 치주인대세포에 대한 연구¹⁶⁾와 비교시, 알칼리성 인산분해효소 활성은 치주인대세포의 경우 배양 4일에 0.02mg/ml 농도에서 대조군보다 높았으며 시일이 지남에 따라 증가하였고 전체 세포수에 대한 효소 활성은 치은섬유아세포보다 더 높은 수치를 보였다. 세포수 단위당 효소 활성은 치은섬유아세포가 배양 4일에 모든 농도에서 치주인대세포보다 높았으나 배양 7일에는 치주인대세포가 모든 농도에서 더 높았다. 치주인대세포의 효소 활성도는 7일 동안 시일이 지남에 따라 증가되었으나 치은섬유아세포의 경우에 시일이 지남에 따라 오히려 감소하였다. 치주인대세포의 경우 세포수 단위당 알칼리성 인산분해효소의 활성도가 배양 4일에 0.02mg/ml 농도에서 가장 높았고 치은섬유아세포의 경우는 2mg/ml 농도에서 가장 높았다. 치주인대세포의 경우 0.02mg/ml 농도에서 석회화결절 형성이 가장 많았는데, 치은섬유아세포의 경우 2mg/ml 농도에서 높아진 효소 활성도가 석회화결절 형성과 관련이 있을 것으로 추정된다. Ivanovski 등²⁷⁾은 치주인대세포와 치은섬유아세포 사이의 알칼리성 인산분해효소의

mRNA 표현에 유의한 차이가 없었으며 치은섬유아세포에서도 osteocalcin, osteopontin의 mRNA가 관찰되어 이는 치은섬유아세포에도 상당한 이질성이 존재하여 골형성의 표현형을 보인다고 하였다. 본 연구에서도 치은섬유아세포의 알칼리성 인산분해효소 활성이 치주인대세포와 유사하였으며 오히려 배양 4일에 더 높아 치은섬유아세포도 이질성을 갖고 있어 골형성의 표현형을 가지고 있음을 추정할 수 있다.

본 연구에서는 특이하게 치은섬유아세포의 경우 ascorbic acid, β -glycerophosphate, dexamethasone의 골유도물질의 첨가 유무에 관계없이 2mg/ml 농도로 키토산 피복 부위에서 석회화결절이 형성되었다. 치주인대세포가 섬유아세포, 또는 골아세포의 표현형을 가지듯이^{26,28)} McCulloch와 Knowles²⁹⁾는 치은섬유아세포에서도 이런 표현형 세포가 포함되어 이질성을 가진다고 하였다. 치은의 기원세포도 잠정적으로 골아세포의 과정으로 분화할 수 있으며 적절한 환경에서 치은섬유아세포가 *in vitro*에서 골양 조직을 형성할 수 있다고 보고되어 있다³⁰⁾. 본 연구에서 2mg/ml 농도의 키토산 피복한 배양접시에 배양된 치은섬유아세포에서 결절이 형성되었는데 이는 고농도의 키토산에 의해 치은섬유아세포의 골아세포로의 분화가 촉진되어 석회화결절의 형성이 유도되었다고 사료된다. 이런 결과로 보아 키토산이 골형성을 촉진시키는 것을 알 수 있었다. 골유도물질과 관련없는 그외 다른 요인의 활성화의 가능성을 추측할 수 있다. 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 성장인자에 붙어 중요한 세포 활성 과정을 기시하며³¹⁾ chito-oligomer는 hyaluronic acid 합성에 기시 물질로 작용한다고 한다³²⁾. 키토산은 hyaluronic acid와 유사한 구조를 가지고 있어서 석회화결절을 형성하기 위한 골원세포의 기질로서 작용하거나 골결절 형성을 위한 발판으로 작용할 수 있다³³⁾.

이상의 연구에서 키토산 처리시 치은섬유아세포

는 모든 농도에서 부착은 억제되었지만 증식은 대조군에 비해 2mg/ml의 고농도에서만 증식이 억제되었고 석회화결절을 형성하였다. 그리고 키토산의 피복 부위에 등근 형태로 응집되어 3차원적 배양이 가능하다고 한 다른 보고들^{20,21)}을 확인시켜 주었다. 향후 화학적, 물리적 성질을 변경한 여러 키토산을 이용한 세포 수준의 연구가 필요하며 조직공학 분야의 기질로 이용할 경우 어떤 형태가 가장 적합할지에 대한 부가적인 연구가 필요하리라 생각된다.

V. 결론

세포의 부착, 증식, 형태 및 기능은 호르몬, 성장인자 등과 같은 생체 성분과 합성물 표면의 생화학특성에 의해 달라질 수 있다. 키토산이 치은섬유아세포의 특성에 어떤 영향을 주는 지 알아보기 위하여 배양접시에 0.2 ~ 2mg/ml 농도로 키토산을 피복한 후 치주수술시 얻어진 치은조직의 치은섬유아세포를 배양하여 세포의 부착, 증식, 형태 및 기능적 변화를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 키토산을 피복한 부위에서 치은섬유아세포는 등근 형태로 부착되었고 6시간 이후 응집되어 24시간 후 결절 양상으로 관찰되었다. 대조군의 치은섬유아세포는 배양 7일 후 밀생에 도달하였지만 키토산 피복부위의 응집된 세포들은 밀생에 도달하지 않았다.
2. 키토산은 모든 농도에서 배양 초기의 치은섬유아세포 부착을 억제하였으며 피복키토산의 농도가 증가할수록 세포 부착률이 떨어졌다 ($P < 0.01$). 그러나, 부착된 세포 수 단위당 활성도는 피복 키토산 농도가 증가할수록 대조군에 비해 높았다.
3. 치은섬유아세포의 증식은 2mg/ml 농도에서는 억제되었고($P < 0.01$) 나머지는 대조군과 유사하였다. 세포 활성도는 모든 농도에서 대조군보다 낮았으며($P < 0.01$) 키토산의 농도에 비례하여 세포의 증식 및 활성도가 감소하였다.
4. 총 세포수에 대한 알칼리성 인산분해효소 활성

도는 키토산 농도의 증가에 따라 억제되었고 배양 기간이 경과함에 따라 감소하였다. 그러나, 증식된 세포수 단위당 알칼리성 인산분해효소 활성도는 배양 4일에 2mg/ml의 농도에서 대조군과 다른 농도에 비해 높았다.

5. 석회화결절 형성 유도물질 유무에 관계없이 2 mg/ml 농도에서 석회화결절 형성을 보였다.

결론적으로 키토산은 농도에 따라 치은섬유아세포의 부착 및 증식에 미치는 영향이 달랐으며 본 연구로 미루어보아 적정 농도(0.02mg/ml)를 선택하여 이용한다면 치은섬유아세포의 증식에 대한 억제가 치은의 재생을 위한 조직공학적 기질로 응용할 수 있을 것이다.

VI. 참고문헌

1. Lynch SE, Genco RJ, Marx RE. Tissue Engineering ; Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics, Quintessence, 1999:3-5.
2. Aspinall GO. The polysaccharides: Chitin and Chitosan, Academic Press Inc, 1983:386.
3. Sandford PA. Chitosan: Commercial uses and potential application. In: Skajak-Braek G, Anthonson T, Sandford P(eds). Chitin and Chitosan, Elsevier Applied Science, 1989: 51-70,.
4. Peter MG. Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. J.M.S.-Pure Appl Chem 1995;32:629-640.
5. 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 1993;73:175-180.
6. Muzzarelli RAA. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. Cell Biol Life Sci 1997;53:131-141.
7. Chang S, Puryear J, Funkhouser EA, Newton RJ, Cairney J. Cloning of a cDNA for a chitinase

- homologue which lacks chitin-binding sites and is down-regulated by water stress and wounding. *Plant Mol Biol* 1996;31:693-696.
8. Chandy T, Sharama CP. Chitoisan-as a biomaterial. *Biomater Artif Cells Artif Organs* 1990;18:1-24.
 9. Okamoto Y, Minamii S, Matsuhashi A, Sashiwa H, Saimoto H, Shigemasa Y, Tanigawa T, Tanaka Y, Tokura S. Application of polymeric N-acetyl-D-glucosamine(chitin) to veterinary practice. *J Vet Med Sci* 1983;55:743-747.
 10. Sapelli PL, Baldessare V, Muzzarelli RAA, Emanuelli M. Chitosan in dentistry. *Chitin in Nature and Technology*, 1986:507-512.
 11. Inoue T, Cox JE, Pilliar RM, Melcher AH. Effect of the surface geometry of smooth and porous-coated titanium alloy on the orientation of fibroblasts in vitro. *J Biomed Mater Res* 1987;28:107-26.
 12. Klokkevold PR, Vandemark L, Kenney EB, Bernard GW. Osteogenesis enhanced by chitosan(poly-N-Acetyl Glucosaminoglycan) in vitro. *J Periodontol* 1996;67:1170-1175.
 13. 김선희, 권영혁, 이만섭, 박준봉, 허익. Chitosan 이 치주인대, 두개관 및 치은섬유아세포의 성장에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 1998;28:17-35.
 14. Chuang WY, Young TH, Yao CH, Chiu WY. Properties of the poly(vinyl alcohol)/chitosan blend and its effect on the culture of fibroblasts in vitro. *Biomaterials* 1999;20:1479-1487.
 15. Muzzarelli RAA, Biagini G, Pugnaroni A, Filippini O, Baldassarre V. Reconstruction of parodontal tissue with chitosan. *Biomaterials* 1993;14:39-43.
 16. 김옥수, 정현주. 키토산이 배양중인 치주인대세포에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 2001; 31:163-177.
 17. Mori T, Okumura M, Matsuura M, Ueno K, Tokura S, Okamoto Y, Minami S, Fujinaga T. Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro. *Biomaterials* 1997;18:947-951.
 18. Beena MS, Chandy T, Sharma CP. Heparin immobilized chitosan-polyethyleneglycol interpenetrating network: antithrombogenicity. *Artif Cell Blood Subs* 1995;23:175-192.
 19. Kikuchi Y. Polyelectrolyte complex of heparin with chitosan. *Die Makromolekulare Chemie* 1974;175:2209-2211.
 20. 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* 1998;41:257-269.
 21. 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* 1998;41:270-277.
 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* 1989;138:8-16.
 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* 1994;9:389-394.
 24. Hui MZ, Tenenbaum HC, McCulloch CA. Collagen phagocytosis and apoptosis are induced by high level alkaline phosphatase expression in rat fibroblasts. *J Cell Physiol* 1997;172:323-333.
 25. Groeneveld MC, Everts V, Beertsen W. Alkaline phosphatase activity in the periodontal ligament and gingiva of the rat molar: Its relation to

- cementum formation. *J Dent Res* 1995;74:1374-1381.
26. Arceo N, Sauk JJ, Moehring J, Foster RA, Somerman MJ. Human periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro. *J Periodontol* 1991;62:499-503.
 27. Ivanovsky S, Li H, Haase HR, Bartold OM. Expression of bone associated macromolecules by gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Periodont Res* 2001;36:131-141.
 28. 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* 1992;50:459-467.
 29. McCullouch CAG, Knowles G. Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. *J Periodont Res* 1991;26:144-154.
 30. Carnes DL, Maeder CL, Graves DT. Cells with osteoblastic phenotypes can be explanted from human gingiva and periodontal ligament. *J Periodontol* 1997;68:701-707.
 31. Varki A. Does DG42 synthesize hyaluronan or chitin?: A controversy about oligosaccharides in vertebrate development. *Pro Natl Acad Sci* 93:4523-4525,1996.
 32. Hirz GA, Gardner PJ, Christensen GR. The effect of chitosan on glaucoma filtering surgery. *Ann Ophthalmol* 1996;28:158-163.
 33. 우명수, 김정근. 수용성 키토산이 조골세포의 활성화와 파골세포의 생성에 미치는 영향. 단국대학교 대학원 박사학위논문. 2000.

사진부도 설명

- Figure 7. Control group of gingival fibroblasts after 30 minutes of inoculation(X100). Cells were attached and had spindle shape.
- Figure 8. Gingival fibroblasts attached on 2 mg/ml chitosan-coated well after 6 hours of inoculation(X100). Cells were round and aggregated.
- Figure 9. Gingival fibroblasts attached on 0.2 mg/ml chitosan-coated well after 24 hours of inoculation(X100). Round aggregated cells were observed.
- Figure 10. Gingival fibroblasts on 0.2 mg/ml chitosan-coated well after 2 days of culture (X100). Many aggregation of cells were observed.
- Figure 11. Gingival fibroblasts on 0.02 mg/ml chitosan-coated well after 7 days of culture **a**. Before trypsinization **b**. After trypsinization (X100).
- Figure 12. Gingival fibroblasts produced mineralized nodules on 2 mg/ml chitosan-coated well after 21 days of culture (X100). Mineralized nodule was surrounded by many cells, showed red orange color by Alizarin red staining.

사진부도 (1)

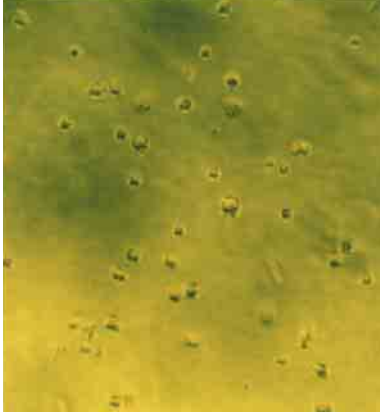


Figure 7



Figure 8



Figure 9

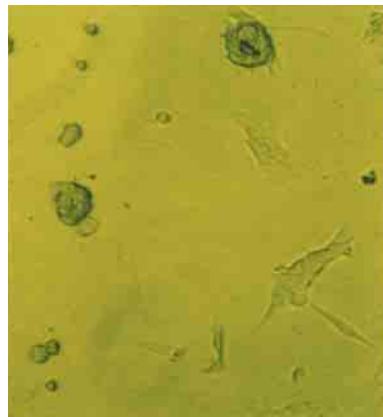


Figure 10

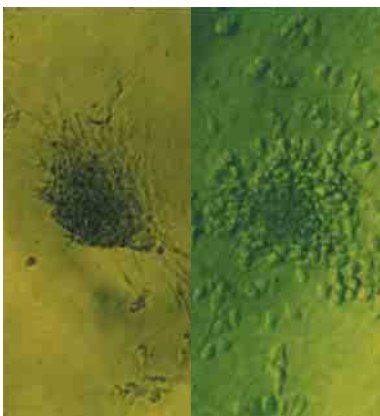


Figure 11a

Figure 11b

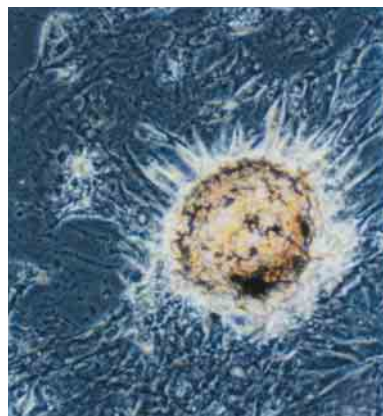


Figure 12

-Abstract-

Effects of Chitosan on Human Gingival Fibroblasts *in Vitro*

Ok-Su Kim, Hyun-Ju Chung

Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Chonnam National University

The aim of this study was to evaluate the effects of chitosan coating on the attachment, proliferation, functional and morphological change of human gingival fibroblasts.

Primary culture of human gingival fibroblasts were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotics. In experimental group, cells were inoculated in the multiwell plates coated with chitosan in concentration of 0.02, 0.2, and 2 mg/ml. Cell counting and MTT assay were done after 0.5, 1.5, 3, 6 and 24 hours of incubation to evaluate the cell attachment, and then after 2 and 7 days of culture to evaluate the cell proliferation. The alkaline phosphatase activity was measured after 4 and 7 days of culture and the ability to produce mineralized nodules was evaluated after 21 days of culture.

The results were as follows : The morphology of cells on the chitosan-coated well was round or spheric. Round cells were aggregated since 6 hours of culture and showed nodule-like appearance after 24 hours of culture and did not achieved confluency at 7 days. The attachment of gingival fibroblasts was inhibited by chitosan coating with a tendency of dose dependent pattern. But, cellular activity of unit cell was higher than control. The proliferation of gingival fibroblasts was inhibited by chitosan coating at 2 mg/ml ($P < 0.01$), while the cell proliferation at 0.02, 0.2 mg/ml was comparable to the control well. Total alkaline phosphatase activity was inhibited by chitosan coating and decreased in the course of time. While ALP activity of unit cell was the highest at 2mg/ml after 4 days of culture. Finally, gingival fibroblasts produced the mineralized nodule at 2 mg/ml.

In summary, the attachment, proliferation, and alkaline phosphatase activity of gingival fibroblasts were influenced differently by the concentration of coated chitosan. From this study, it could be used as the matrix of tissue engineering for gingiva without inhibition on proliferation of gingival fibroblasts using chitosan at the optimal concentration (0.02mg/ml).