

키토산이 백서 태자 두개관세포의 세포외기질 발현과 석회화에 미치는 영향

김재철¹ · 최득철² · 김영준^{1,3} · 정현주^{1,3} · 김옥수^{1,3}

¹전남대학교 치과대학 치주과학교실, ²전남대학교 대학원 치의학과 및 ³치의학연구소

I. 서론

치주치료의 궁극적인 목적은 질환에 의해 손상된 치주조직을 재생시키는 것이라고 할 수 있다. 이는 염증에 이환된 치근면의 신생 백악질의 형성, 신생골의 침착, 이 두 조직간에 기능적으로 배열되는 신생 결합조직 섬유 및 상부 치은조직의 재형성을 의미한다. 그러나 치주조직 치유시 치근백악질, 치주인대, 치조골 및 치은조직으로부터 유래되는 다양한 세포들의 영향을 받아 치유되는 양태가 매우 다르다¹⁻³.

소실된 치주조직의 회복을 위해 여러 가지 방법들이 제안되어 왔는데, 창상부분의 세포부착능력을 향상시키기 위한 치근면 처치제의 사용⁴, 골결손부 재생을 위한 골이식재의 사용⁵, 특정 세포의 선택적 이주를 이용하는 조직유도 재생술⁶ 및 골형성단백질과 다양한 성장인자를 이용한 방법^{8,9} 등을 들 수 있다. 그러나 현재까지 제안된 많은 방법들은 그 임상적 결과에 대한 예지성이 낮으며 골재생 효과도 제한적이다^{4,8}.

2개의 경조직이 그 사이에 개재하는 결합조직으로 연결되는 치주조직의 특수한 구조적 특성을 근거로 한 치주조직의 이상적인 치유에는 치아와 치조골을 연결하는 치주인대의 재형성이 필수적이므로 치주인

대세포의 치면으로의 부착이 절대적으로 요구되며 지속적인 조골세포의 증식이 필요하다^{5,8}. 이를 위해서는 외과적인 시술 후 세포가 치주인대를 재형성하는데 영향을 미칠 수 있는 미세환경을 개선시킬 뿐 아니라 부작용과 독성이 없으면서 조골세포의 활성을 증가시킬 수 있는 약제나 방법의 개발이 필요하다.

키토산 (1-4, 2-amino-2-deoxy- β -D-glucan)은 키틴을 고온의 알칼리로 처리하여 정제한 탄수화물 고분자로서 hyaluronic acid와 비슷한 구조이다. 키토산은 생분해성이며 독성이 없고 800-1,500 KD의 분자량을 갖는 특이한 화학구조와 생물학적인 특성으로 인해 다양한 분야의 생체재료로 이용되고 있다¹⁰⁻¹⁶. 키토산은 지방 흡수를 억제하여 체중 감소에 도움을 주며¹¹, 콜레스테롤의 조절¹⁰, 결합조직의 치유향상^{13,14}, 항미생물 효과¹², 항암 효과¹², 지혈 효과^{15, 16} 등이 있다. 치의학 분야에서는 Sapelli 등¹⁷이 치주질환, 구개창상 및 발치와의 치유를 증진시키기 위해 키토산을 사용하여 양호한 임상적 결과를 얻었다고 보고하였으며 Muzzarelli 등¹⁸도 치주 결손부에 키토산을 적용한 결과 섬유성 증식(fibroplasia)이 감소하였으며, 발치창과 근단절제술 후 골 결손부에 키토산을 적용한 결과 방사선학적 소견 및 생검을 통하여

교신 저자: 김영준, 광주광역시 동구 학동 5 전남대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호: 501-757,
E-mail: youngjun@jnu.ac.kr

정상적인 골 형성이 촉진되었다고 하였다. 또한 국내에서도 계 등¹⁹⁾이 키토산 제제가 포함된 차폐막이 치주질환으로 파괴된 골조직 재생에 유용하다고 하는 등 키토산은 창상치유 과정 중에서 세포의 이동과 조직의 치유 과정을 촉진시켜 골 형성을 촉진시킨다고 알려져 있다.

지금까지의 연구결과로 볼 때 키토산은 창상 치유 과정 중에 세포이동과 기질형성을 촉진시키며 골 형성 증진의 효과가 있는 것으로 생각되며 조골세포의 활성화를 통한 치주질환으로 파괴된 골 조직의 재생에 유용한 제제 중의 하나임을 시사하였다. 그러나 아직까지 키토산에 의한 골 형성 효과를 세포학적 수준에서 연구한 것은 드물며, 특히 골 형성에 중요한 세포의 기질 합성시 키토산의 영향에 대한 연구보고는 없다. 이에 본 연구는 *in vitro* 상에서 키토산을 백서 태자 두개관세포에 적용하였을 때 키토산에 의한 백서 태자 두개관세포의 석회화 형성 능력 및 세포의 기질 발현을 관찰하고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 세포배양

1) 백서 태자 두개관세포의 분리 및 배양

백서 태자 두개관세포의 분리는 McCarthy²⁰⁾ 등의 방법을 변형한 순차소화효소기법을 이용하여 분리 배양하였다. 태령 20-21일째의 백서 태자를 모체로부터 무균적으로 적출하고 태자의 두부로부터 두개관을 절제하여 골막과 연조직을 제거하였다. 절제한 두개관은 수술용 가위로 세절한 후 0.2% collagenase (GibcoBRL, U.S.A.)를 함유한 bone cell buffer (1 M NaCl, 0.3 M HEPES, 0.125 M CaCl₂, 0.5 M Mannitol, 0.1 M K₂HPO₄; pH 7.4) 1.5 ml과 함께 교반하면서 37 °C에서 15분간 소화시켰다. 3번의 소화과정중에 얻어진 세포현탁액은 버리고 4번째와 5번째의 세포현탁액을 모아서 1000 xg에서 10분간 원심분리한 후 bone cell buffer로 세척하고 다시 원심분리하여 분리된 세포를 수집하여 배양하였다. 수집된 세포들은 75 ml flask에 10% fetal bovine serum (FBS; GibcoBRL,

U.S.A.) 및 1% antibiotic-antimycotic solution (GibcoBRL, U.S.A.)이 첨가된 BGJb media (GibcoBRL, U.S.A.)에 배양하였다. 배양액은 3일 간격으로 교환하였으며 배양시 습도는 100%, 온도는 37°C로 95%의 공기와 5%의 CO₂를 계속 공급하였다. 실험에는 계대배양 1번째와 2번째 것을 이용하였다.

2) 배양접시내 키토산의 적용

수용성 키토산은 100% 키토산을 탈아세틸화시킨 후 염산과 물을 첨가한 수용액에 키토산 분해 효소를 이용해 분해시켜 정제 과정을 거쳐 건조한 분말 형태로 공급되며 (주)자광으로부터 제공받았다. 분말 형태의 키토산은 3차 증류수에 녹였으며 배지내 최종농도가 각각 0.01, 0.1, 1.0, 2.0 mg/ml이 되도록 stock solution으로 준비하여 실험에 사용하였다. 대조군은 키토산을 적용하지 않은 군을, 실험군은 해당 농도의 키토산을 적용한 군으로 하였다.

2. 염기성 인산 분해 효소 활성화도 측정

염기성 인산 분해 효소 활성화도 측정은 Cho 등²¹⁾의 방법에 준하여 시행하였다. 백서 태자 두개관세포를 배양한 후 12 well dish에 well당 1×10^5 cell을 분주하였다. 24시간 후 해당 농도의 키토산을 적용하고 3일과 7일간 배양하였다. 배지를 제거한 후 1% TritonX-100으로 세포를 용해시키고 초음파로 분쇄시켰다. 0.4 mM Tris HCl, 2 mM MgCl₂, 4 mM p-nitrophenol phosphate가 함유된 완충용액 50 µl/well을 가한 후 30분간 반응시키고, 150 µl의 1N NaOH를 가하여 반응을 중지시킨 후 분해된 p-nitrophenol을 405 nm에서 spectrophotometer (SmartSpec™, BioRad, CA, U.S.A.)로 비색 정량하였다.

3. 석회화 결절의 측정

석회화 결절 형성에 대한 키토산의 영향을 알아보기 위하여 백서 태자 두개관세포를 12 well plate에 1×10^5 개의 세포가 되게 분주한 후 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic solution, 50 µg/ml ascorbic

acid, 10 mM sodium β -glycerophosphate가 첨가된 BGJb solution에 키토산의 최종 농도가 0.01 mg/ml, 0.1 mg/ml, 1.0 mg/ml, 2.0 mg/ml가 되도록 처리하고 3 일마다 배지를 교환하면서 14일과 21일간 배양하였다. 배양 14일과 21일째에 cell을 4% formaldehyde에 1시간 고정한 후 1% Alizarin red S 염색 용액을 넣어 20분간 반응시켜 석회화 결절을 염색하였다. 염색된 표본들은 CCD camera (Sony, Japan)에서 촬영하고 Optimas image-processing program (Media cybernetics, Carlsbad, CA, U.S.A.)을 이용하여 모니터 상에서 석회화 결절 부분의 면적을 계측하였다.

4. 총 RNA 추출

100 mm dish (Corning-Coostar, U.S.A.)에 백서 태자 두 개관세포를 분주하고 10% FBS가 함유된 BGJb 배지에 배양하였다. 배양액은 세포가 밀생에 도달할 때까지 3 일 간격으로 교환하였다. 세포가 밀생에 도달하면 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic solution, 50 μ g/ml ascorbic acid, 10 mM sodium β -glycerophosphate가 첨가된 BGJb solution에 키토산 0, 0.01, 0.1, 1.0, 2.0 mg/ml가 되도록 처리하고 배양하였다. 배양 14일째에 세포의 RNA를 추출하였다. RNA의 분리는 배양액을 제거하고 2.0 ml의 Trizol (Promega, U.S.A.)을 첨가하여 각각의 키토산 농도로 처리한 세포를 1.8 ml tube에 수집하였다. 200 μ l의 chloroform을 첨가하여 RNA를 용해시킨 후 4 $^{\circ}$ C, 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 상층 액만을 취한 후 500 μ l isopropyl alcohol을 첨가하여 RNA를 침전시키고 4 $^{\circ}$ C, 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 분리한 RNA는 Tris-EDTA buffer 40 μ l에 녹인 후 Spectrophotometer (SmartSpecTM, BioRad, CA, U.S.A.)로 그 양을 측정하였으며 -70 $^{\circ}$ C 냉동고에 보관하였다.

5. 역전사 중합효소연쇄반응 (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction; RT-PCR)

추출된 총 RNA 중 5 μ g을 Superscript II(GibcoBRL,

U.S.A.)를 이용하여 70 $^{\circ}$ C에서 10분, 42 $^{\circ}$ C에서 70분, 37 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 역전사 중합반응을 유도하여 cDNA를 합성하였다.

백서의 cDNA 염기서열에 의거하여 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), bone sialoprotein (BSP), type I collagen, osteocalcin (OCN) primer를 제작한 후 (Figure 1), PCR 완충용액 (GibcoBRL, U.S.A.) 5 μ l, 1.5 mM MgCl₂ 3 μ l, 10 mM dNTP mix 1 μ l, 각각의 primer 2.5 μ l, 5 unit Taq polymerase 0.2 μ l, cDNA 2 μ l와 3차 증류수를 넣어 50 μ l가 되게 하여 Thermal cycler (Perkin Elmer, U.S.A.)를 이용하여 증폭하였다 (Figure 1). 증폭된 PCR 산물들을 1.5% agarose gel에서 전기영동을 시행하여 얻은 유전자 영상을 Gel Image Analysis System (QualityOne[®], BioRad, U.S.A.)에서 house keeping gene인 GAPDH의 발현을 기준으로 각 primer의 유전자 발현정도를 평가하였다.

6. 통계학적 분석

실험에서 얻어진 수치는 one-way ANOVA와 사후 검정에 Duncan 법을 시행 하였다.

III. 결과

1. 염기성 인산분해 효소 활성도 검사

키토산을 넣지 않은 대조군과 각 해당농도의 키토산을 접종하고 배양한 실험군들의 염기성 인산 분해 효소 활성도를 측정하였다. 배양 3일에 대조군은 314.9 U였고, 키토산 농도 0.01mg/ml~2.0 mg/ml에서는 350.6 - 418.7 U로 키토산 농도 0.1 mg/ml와 1.0 mg/ml에서 대조군에 비해 효소 활성도가 유의하게 높게 나타났다 (Table 1, p<0.05). 배양 7일에 대조군은 434.5 U였고, 키토산 농도 0.01mg/ml~2.0 mg/ml에서는 482.4 - 615.2 U로 모든 군에서 배양 3일째에 비하여 효소 활성도가 증가하였다. 키토산 농도 0.01 mg/ml~1.0 mg/ml까지 대조군에 비해 효소 활성도가 유의하게 높게 나타났다 (Table 1, p<0.05).

PCR primers

Primer	Expected base pairs	Sequence (5' -3')
GAPDH-sense (+)	418	CACCATGGAGAAGGCCGGGG
GAPDH-antisense (-)		GACGGACACATTGGGGGTAG
COL I-sense (+)	250	TCTCCACTCTTCTAGGTTCTT
COL I-antisense (-)		TTGGGTCAITTCACATGC
BSP-sense (+)	1068	AACAATCCGTGCCACTCA
BSP-antisense (-)		GGAGGGGGCTTCACTGAT
OCN-sense (+)	198	TCTGACAAACCTTCATGTCC
OCN-antisense (-)		AAATAGTGATACCGTAGATGCG

PCR programs

GAPDH	94°C 1 min	94°C 1 min	60°C 2 min	72°C 1 min	72°C 10 min
	25 Cycles				
COL I	94°C 1 min	94°C 1 min	55°C 2 min	72°C 1 min	72°C 10 min
	30 Cycles				
BSP OCN	94°C 1 min	94°C 1 min	50°C 2 min	72°C 1 min	72°C 10 min
	30 Cycles				

Figure 1. Amplification primer sets and conditions used in polymerase chain reaction. GAPDH indicates glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; COL I, type 1 collagen; BSP, bone sialoprotein; and OCN, osteocalcin.

Table 1. Alkaline phosphatase activity of rat calvarial cells treated with chitosan

Conc. (mg/ml)	Alkaline phosphatase activity (U/10 ⁵ cells)	
	3 day	7 day
control	314.9±29.5	434.5±33.8
0.01	350.6±43.2	575.8 ±43.2*
0.1	418.7 ±34.3*	615.2 ±71.1*
1.0	395.4 ±30.2*	556.2 ±48.7*
2.0	385.6 ±47.9	482.4 ±71.2

*: indicates significant difference compared to the control (p<0.05).

2. 석회화 결절 형성율의 측정

백서 태자 두개관세포를 석회화 결절 형성용 배지

에서 배양하고 배양 14일과 21일에 alizarin red S로 염색을 실시하고 석회화 결절 형성 면적을 측정하였다. 결절은 원형으로 주위에 세포가 밀집되어 있었고 결

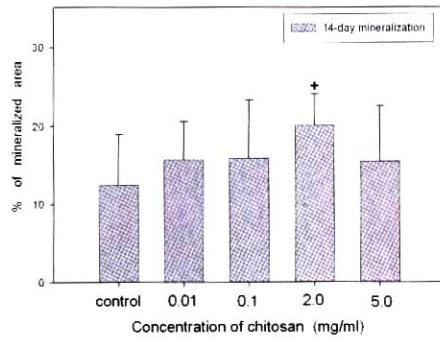
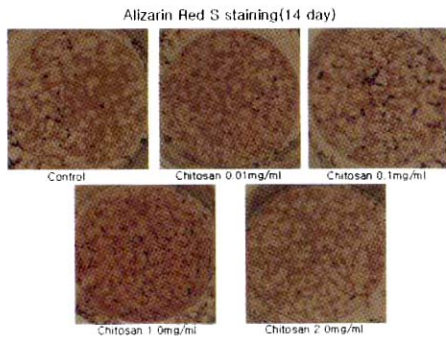


Figure 2. Representative in vitro mineralization data obtained from 14-day cultures of primary rat calvarial cells. +: indicates significant difference from the control ($p < 0.01$).

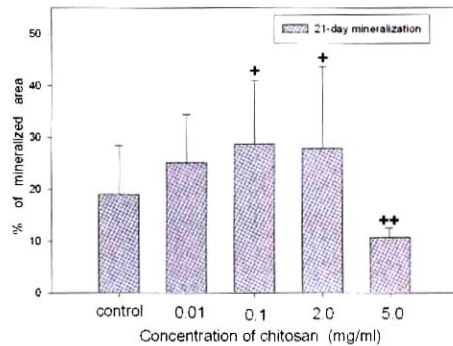
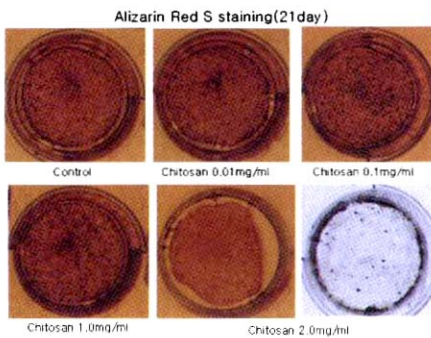


Figure 3. Representative in vitro mineralization data obtained from 21-day cultures of primary rat calvarial cells. +: indicates significant difference from the control ($p < 0.01$), ++: indicates significant difference from other groups ($p < 0.01$).

절 중앙쪽으로 진한 적색으로 염색되어 있었다.

배양 14일에 대조군의 석회화 결절의 형성 비율은 12.5%, 키토산 0.01 mg/ml은 15.7%, 0.1 mg/ml은 15.9%, 1.0 mg/ml은 20.2%, 2.0 mg/ml은 15.5%로 키토산 1.0 mg/ml를 투여한 군에서 대조군보다 높은 석회화 결절 형성율을 보였다 ($p < 0.01$, Figure 2).

배양 21일 석회화 결절 형성 비율은 14일에 비하여 더 증가하는 경향을 보였다. 대조군의 석회화 결절의 형성율은 19.1%, 키토산 0.01 mg/ml은 25.2%, 0.1 mg/ml은 28.7%, 1.0 mg/ml은 27.8%, 2.0 mg/ml은 10.7%로 키토산 0.1 mg/ml와 1.0 mg/ml를 투여한 군에서 대조군보다 높은 석회화 결절 형성율을 보였고, 키토산 2.0 mg/ml군은 다른 군에 비해 유의하게 낮았다 ($p < 0.01$, Figure 3).

3. RT-PCR에 의한 골기질 유전자 발현

0.01 mg/ml에서 2.0 mg/ml까지의 키토산이 함유된 배지에 백서 태자 두개관세포를 14일간 배양한 후 RNA를 분리하여 type I collagen, osteocalcin, bone sialoprotein의 발현 정도를 관찰하였다. 그 결과 대조군을 포함한 키토산으로 처리한 모든 군에서 type I collagen 유전자의 발현이 비교적 균일하게 관찰되었다. Osteocalcin 유전자 발현은 1.0 mg/ml과 2.0 mg/ml의 키토산군이 대조군 및 키토산 0.01 mg/ml, 0.1 mg/ml군에 비하여 그 발현이 증가하였다. Bone sialoprotein 유전자는 키토산 적용군들과 대조군 모두에서 발현되지 않았다 (Figure 4).

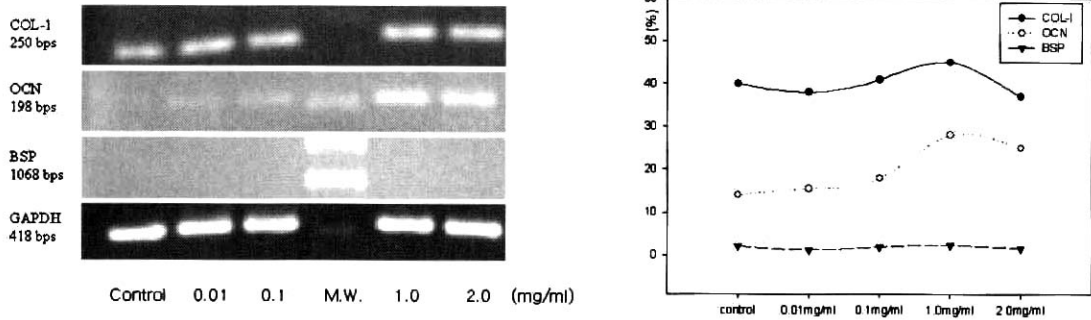


Figure 4. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of type I collagen (COL-I), bone sialoprotein (BSP), osteocalcin (OCN), and glyceral-dehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) messenger RNA expression in primary rat calvarial cells.

IV. 고찰

치주인대는 인체의 다른 부위에서는 발견할 수 없는 높은 정도의 경조직 즉 백악질과 치조골 사이에 존재하는 치밀한 결합조직으로 치아를 경조직인 치조골에 연결하고 있을 뿐만 아니라 다양한 세포들로 구성되어 복합적인 잠재기능을 가지고 있어 그 해부학적 특성으로 인해 소실된 조직의 재생을 위한 임상적 환경설정이 복잡하다^{1, 22)}.

치주질환은 부착치은의 소실과 함께 치주낭 형성과 지지조직인 치은결합조직, 백악질 치주인대 그리고 치조골의 파괴를 수반하고 임상적으로 증상이 뚜렷하지 않음으로 인해 내원시 대부분 중증 이상으로 진행되어 있는 경우가 많다.

치조골내에서는 조골세포와 파골세포가 동시에 존재하며 조골세포의 작용이 증가하거나 파골세포의 작용 능력이 감소하는 경우 신생골의 형성이 시작된다^{9, 22)}. 치조골은 치주질환으로 인하여 소실되기도 하고 매식치 시술시 많은 양의 골조직이 필요하기 때문에 조골 기능을 경우에 따라서 증강시켜야 할 필요가 있다.

임상적으로 골 조직 재생을 위한 다양한 종류의 이식재와 차단막이 연구되고 또한 실제 임상에서 응용되고 있지만 아직까지 여러 한계점이 있다^{5, 6)}. 골 조직 재생을 위해 사용되는 생약 제제는 생체 거부 반응이나 생분해시 나타나는 독성의 위험이 적고 그

효과가 지속적이며 임상에 응용될 경우 경제적으로 사용될 수 있다.

키토산은 키틴(chitin)을 강알칼리로 처리하여 탈아세틸화시킨 유도체로, 구조적으로는 hyaluronic acid와 유사한 polycationic complex carbohydrate이며 분자량은 800-1,500 KD인 생체분해성 물질로 생체적합성이 우수하고 항균 작용, 창상 치유 촉진등의 생물학적 작용과 우수한 기계적 특성¹⁰⁻¹⁶⁾으로 인하여 치주조직의 재생에 관심이 증가하고 있다.

골재생에 있어서 키토산의 작용은 키토산내 N-acetylglucosamine 잔기에 기인하는데 주로 직접적인 역할로는 성장인자들과 결합하여 골아세포의 분열자극을 통하여 신생골의 형성을 촉진하며 간접적으로는 섬유아세포의 부착과 증식을 방해함으로써 나타난 결과로 설명되고 있다²³⁻²⁶⁾.

Klokkevold 등²⁵⁾은 백서 태자 두개골에서 채취한 두개관세포에 키토산을 처리하였을 때 조골세포로 분화하여 석회화되는 양상을 나타낸다고 하였다. 그는 이 연구에서 키토산이 직접적으로 조골세포의 골생성을 촉진하고 간접적으로는 섬유아세포를 억제함으로써 골생성에 저해되는 인자를 억제하여, 결과적으로 조골세포로의 분화와 골생성을 촉진한다고 하여 치주조직 결손부에 적용 가능성을 시사하였다.

이에 본 연구에서는 백서 태자 두개관세포에 여러 키토산 농도를 적용하였을 때 골 형성에 중요한 세포외기질 형성에 적절한 키토산의 농도를 알아보고

조골세포로의 분화능력을 관찰하고자 하였다.

키토산의 농도와 투여 방법은 연구자마다 다양하다. Klokqvold 등²⁵⁾은 0.2% acetic acid에 2 mg/ml 농도로, Lahiji 등²⁶⁾은 2% acetic acid에 4 mg/ml 농도로 키토산을 만든 후 미량 피펫을 이용하여 배양 접시 바닥에 줄을 긋듯이 위치시키고 소독 후 세포 배양 hood에서 acetic acid를 휘발시켜 실험에 이용하였다. 그러나 이 방법은 준비과정이 복잡하며 또한 잔존하는 산도 (acidity)를 제거하기 위하여 0.5 M의 NaOH로 세척해야하며, 세포 배양용 접시가 염기성으로 변화되지 않도록 다시 Hank's balanced salt solution으로 세척하여 pH를 7.4로 조정하는 등 그 과정이 번거로우며 세척 과정 중에 키토산이 회석될 우려가 있다. 한편 백 등²⁷⁾은 수용성 키토산 0.01mg/ml~2.0 mg/ml를 사용하였는데 이 방법은 그 과정이 번거롭지 않으며 필요에 따라서는 여러 번 키토산을 배양 접시에 적용할 수 있으며 정확한 양의 조절도 가능하다. 이에 본 연구에서는 여러 가지 점을 고려하여 수용성 키토산으로, 분말 형태의 것을 3차 증류수에 녹여 사용하였다. 본 연구에 사용된 키토산의 농도는 본 교실의 키토산에 관한 다른 연구 결과를 토대로 결정하였다. 키토산 처리 후 세포의 증식을 관찰한 실험에서 배양 1일째에는 1.0 mg/ml 이상에서는 대조군 및 0.01 mg/ml군과 비교하여 유의한 활성감소가 나타났다. 배양 3일째에서는 2.0 mg/ml 이상의 농도에서는 대조군 및 0.01 mg/ml군과 비교하여 활성감소가 유의하게 나타났다. 본 실험은 그 관찰기간이 14일에서 21일간으로 비교적 장기간인 점을 고려하여 키토산의 농도를 0.01, 0.1, 1.0, 2.0 mg/ml로 하였다.

백서 태자 두개관세포의 조골세포로의 분화를 관찰하기 위하여 염기성 인산 분해 효소 활성도를 측정하였다. 염기성 인산 분해 효소는 유기인산 에스테르를 가수분해하여 석회화가 이루어지는 부위에서 국소적으로 인산이온의 농도를 증가시키는 효소로서 세포외기질에 calcium phosphate를 침착시킴으로서 석회화를 유도하는 기능을 갖는다^{28, 29)}. 그래서 염기성 인산 분해 효소의 활성도가 증가한다는 것은 석회화가 촉진된다는 것을 의미한다. 백서 태

자 두개관세포의 경우 배양 3일째에 대조군에 비하여 키토산 적용군에서 더 높은 효소 활성도를 보였으며 특히 0.1 mg/ml과 1.0 mg/ml에서 대조군에 비해 더 유의하게 높은 활성도를 보였다. 배양 7일째에서도 대조군에 비하여 키토산 적용군에서 더 높은 효소 활성도를 보였으며 특히 0.01 mg/ml에서 1.0 mg/ml까지의 농도에서 대조군에 비해 더 유의하게 높은 활성도를 보였다($p < 0.05$). 이는 배양 7일까지도 백서 태자 두개관세포에서 키토산에 의한 석회화 과정과 관련된 것으로 보인다.

본 연구의 석회화 결절을 측정한 결과, 키토산을 투여한 군에서 농도 0.1 mg/ml에서는 대조군과 비교하여 더 많은 석회화 결절 형성을 보였으나 2.0 mg/ml에서는 대조군과 유사한 정도의 석회화 결절을 형성하였다.

키토산이 백서 태자 두개관세포의 세포외기질 형성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 키토산을 함유한 배지에 배양을 하여 type I collagen, osteocalcin, bone sialoprotein 유전자 발현을 RT-PCR로 관찰하였다. 그 결과 type I collagen의 발현은 키토산 처리 유무에 상관없이 잘 발현되었다. 이 결과는 치주인대 세포에 0.1 mg/ml의 키토산을 적용 후 RT-PCR로 type I collagen을 관찰시 키토산 적용군에서 대조군에 비하여 type I collagen 유전자 발현이 증가하였다는 백 등²⁷⁾의 결과와는 차이가 있다. 그러나 백 등의 결과와 본 결과가 다른 이유는 첫째 사용한 세포가 본 실험의 백서 태자 두개관세포가 아닌 치주인대세포를 사용한 것이다. 치주인대세포는 섬유아세포의 성질을 갖는 것과 골아세포의 성질을 갖는 것이 있어 치주인대 세포의 분리 및 배양시 상태에 따라 그 양상에 큰 차이를 보이게 된다. 또한 백 등은 세포가 밀생에 도달한 후 3일간 키토산을 적용 후 RNA를 추출하여 type I collagen 유전자 발현을 관찰하였던 결과로 본 실험의 14일간 키토산 적용 후 관찰과는 차이가 날 것으로 추정된다. Type I collagen 유전자는 골조직의 주된 구성 성분으로 본 실험에서 이 유전자 발현이 비교적 균일하게 나왔다는 것은 키토산 적용 유무에 관계없이 백서 태자 두개관세포가 밀생에 도달한 후 계속 배양시 조골세포로 분화함을 의

미한다. Bone sialoprotein과 osteocalcin은 조골세포가 분비하는 비교원성 단백질로 골형성과 흡수에 중요한 단백질 중 하나이다³⁰⁾. 특히 bone sialoprotein은 골의 광물화 (mineralization) 초기에 잘 발현되며 결정핵 (crystal nucleus)으로 알려져 있다³¹⁾. Osteocalcin은 초기 골 형성시기에는 관찰되지 않지만 골이 형성되고 성숙되는 시기에 잘 발현이 된다. 또한 osteocalcin은 파골세포의 주화성 인자 (chemoattractant)로 골 형성과 흡수를 조절하는 단백질로 알려져 있다³¹⁾. 본 실험 결과 bone sialoprotein 유전자는 모든 농도에서 발현되지 않았지만, osteocalcin 유전자 발현은 키토산 농도 1.0, 2.0 mg/ml에서 증가하였다. 이는 백서 태자 두개관세포가 밀생에 도달한 후 14일간 배양에 의하여 bone sialoprotein의 분비가 이미 완료된 후 키토산에 의하여 osteocalcin 유전자의 발현이 증가되었기 때문으로 생각된다. 본 교실에서 백서 태자 두개관세포를 이용한 다른 연구³²⁾에서 7일째의 RT-PCR 결과를 보면 bone sialoprotein의 발현이 관찰되었으나 osteocalcin은 관찰되지 않았고 14일째에는 osteocalcin 유전자만 관찰되었다.

키토산이 골 결손치유, 즉 골 재생에 미치는 영향에 대해서는 여러 가지 동물 실험을 통해 입증된 바 있다. Malette 등²⁴⁾은 키토산을 이용한 개 실험에서 다리에서의 골 재생을, 또 Muzzarelli 등³³⁾은 양의 대퇴부 관절 실험에서 대조군과 비교해 골 치유가 향상된 결과를 보고하였다. 본 실험에서 키토산이 백서 태자 두개관세포의 세포외기질 합성을 증진시킨다는 결과로 볼 때, 본 실험 결과는 동물 실험에서의 키토산의 골 재생 효과를 세포수준에서 뒷받침하고 있다. 본 실험결과로 볼 때 키토산 농도 0.1 mg/ml과 1.0 mg/ml은 백서 태자 두개관세포가 골아세포로의 분화를 도와주며 골 형성과 흡수에 관련된 비교원성 단백질의 분비를 증진시킨다고 사료된다. 그러나 본 실험은 전골아세포라고 할 수 있는 백서 태자 두개관세포를 이용한 실험결과로 실험에 이용된 세포의 종류에 따라서 키토산의 효과가 다르게 나타날 수 있다. 향후 인간의 치주인대세포, 치조골의 골아세포에 대한 키토산의 효과와 적절한 농도 등 실험실

분야에서의 연구가 필요할 것으로 생각되며 키토산의 작용기전에 대한 더 많은 연구도 필요할 것으로 사료된다.

V. 결론

이 연구는 키토산이 창상치유와 조직재생을 촉진시키고 골 형성을 증진시킨다는 연구보고에 근거하여 백서 태자 두개관세포의 석회화 형성 및 세포외기질 발현 능력을 알아보고자 하였다.

백서 태자 두개관세포에서의 골기질 형성능력을 알아보기 위하여 염기성 인산 분해 효소 활성도와 석회화 기질 형성 능력을 측정하였다. 또한 백서 태자 두개관세포에서의 세포외기질 분비를 알아보기 위하여 collagen type I (COL-I), osteocalcin (OCN), bone sialoprotein (BSP) gene expression을 RT-PCR을 통해 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 배양 3일에 염기성 인산 분해효소 활성도는 키토산 농도 0.1 mg/ml와 1.0 mg/ml에서 대조군에 비해 효소 활성도가 유의하게 높았으며 ($p < 0.05$), 배양 7일에도 키토산 농도 0.01 mg/ml - 1.0 mg/ml에서 대조군에 비해 효소 활성도가 유의하게 높았다 ($p < 0.05$).
2. 석회화 결절 형성율을 측정한 결과 키토산을 투여한 군에서 농도 0.1 mg/ml, 1.0 mg/ml에서 대조군과 비교하여 더 많은 석회화 결절을 형성하였으나 ($p < 0.01$), 2.0 mg/ml에서는 대조군과 유사한 정도의 석회화 결절을 형성하였다.
3. collagen type I 유전자는 대조군, 키토산 처리군 모두 유사하게 발현되었다. Osteocalcin 유전자는 키토산 농도 1.0 mg/ml, 2.0 mg/ml에서 대조군보다 그 발현이 더 현저하였다. Bone sialoprotein 유전자는 대조군, 키토산 처리군 모두 발현되지 않았다.

이상의 결과는 0.1 mg/ml, 1.0 mg/ml의 키토산은 백서 태자 두개관세포의 석회화와 세포외기질 형성을 촉진시키는 것으로 나타났으며 따라서 적정농도의

키토산 처리는 치조골 결손부 재생에 유용하리라 사
료된다.

VI. 참고문헌

1. Melcher AH: On the repair potential of peri-
odontal tissue. *J Periodontol* 1976;47:256-260.
2. Iglhaut J, Aukhil I, Simpson DM, Johnston MC,
Kock G: Progenitor cell kinetics during tissue
regeneration in experimental periodontal
wounds. *J Periodont Res* 1988;23:107-117.
3. McCulloch CAG, Bordin S: Role of fibroblast
subpopulations in periodontal physiology and
pathology. *J Periodont Res* 1991;26:144-154.
4. Ripamonti U, Petit JC, Lemmer J, Austin JC:
Regeneration of the connective tissue attach-
ment on surgically exposed roots using a fibrin-
fibronectin adhesive system. *J Periodont Res*
1987;22:320-326.
5. Mellonig JT, Bowers GM, Bright RW, Lawlence
JJ: Clinical evaluation of freeze-dried bone allo-
grafts in periodontal osseous defects. *J*
Periodontol 1976;47:125-131.
6. Pitaru S, Tal H, Soldinger M, Noff M: Collagen
membranes prevent apical migration of epitheli-
um and support new connective tissue attach-
ment during periodontal wound healing in
dogs. *J Periodontal Res* 1989;24:247-253.
7. Ripamonti U, Reddi AH: Periodontal regenera-
tion; potential role of bone morphogenic pro-
teins. *J Periodont Res* 1994;29:225-235.
8. Matsuda N, Kumar M, Ramakrishnan PR, Lin WL,
Genco RJ, Cho MI: Evidence for up-regulation of
epidermal growth factors on rat periodontal liga-
ment fibroblastic cells associated with stabiliza-
tion of phenotype in vitro. *Arch Oral Biol*
1993;38:559-569.
9. Casser-Bette M, Murray AB, Closs EI, Erfle V,
Schmidt J: Bone formation by osteoclast-like cells
in a three-dimension cell culture. *Calcif Tissue*
Int 1990;46:46-56.
10. Petet MG: Applications and environmental
aspects of chitin and chitosan. *J.M.S-Pure Appl*
Chem 1995;32:629-640.
11. Aspinall GO: Chitin and chitosan in the polysac-
charides. New York: Academic press, 1983:386-
390.
12. Muzzarelli RA, Baldassarre M, Conti F, Ferrara P,
Biagini B: Biological activity of chitosan.
Biomaterials 1988;9:247-252.
13. Sanford PA: Chitosan: Commercial uses and
potential applications In *Chitin and Chitosan*
(Skjak-Braek G, Anthonsen T, Sanford P, eds).
Elsevier Applied Science, London, 1989:51-70.
14. Prudden JF, Migel P, Hanson P, Friedrich L,
Balassa L: The discovery of a potent pure chemi-
cal wound-healing accelerator. *Am J Surg*
1970;119:560-564.
15. Brandenburg G, Leibroch LG, Shuman R,
Malette WG, Qiugley H: Chitosan; A new topical
agent for diffuse capillary bleeding in brain tis-
sue. *Neurosurg* 1984;15:9-13.
16. Klokkevold PR, Lew DS, Ellis DG, Bertolami CN:
Effect of chitosan on lingual hemostasis in rab-
bits. *J Oral Maxillofac Surg* 1991;49:858-863.
17. Sapelli PL, Baldessare V, Muzzarelli RAA,
Emanuelli M: Chitosan in dentistry. In: *Chitin in*
Nature and Technology, 1986:507-512.
18. Muzzarelli RA, Biagini G, Pugnalone A,
Baldassarre V: Reconstruction of periodontal tis-
sue with chitosan. *Biomaterials* 1993;14:39-43.
19. 계승범, 손성희, 최상묵: Chitosan과 chitosan-cel-
lulose를 이용한 차폐막의 골조직 재생유도능력
에 관한 연구. *대한치주과학회지* 1998;28:611-
630.
20. McCarthy TL, Centrella M, Canalis E: Further bio-
chemical and molecular characterization of pri-
mary rat parietal bone cell culture. *J Bone Min*

- Res 1988;3: 401-408.
21. 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.
 22. Melcher AH, McCulloch CAG, Cheong T, Nemeth E, Shiga A: Synthesis of cementum-like tissue in vitro by cells cultured from bone; a light and electron microscope study. *J Periodont Res* 1986;25:592-612.
 23. Marletta G, Iacona F: Chemical and physical property modifications induced by ion irradiation in polymers. In: *Material and Processes for surface and interface engineering*. (Y, Pauleau eds) vol 290, NATO-ASI Series, 1995:597-640.
 24. Mallette WG, Quigley HJ, Adickes ED: Chitin in nature and technology. New York, Pleum Press, 1986:435-442, .
 25. Klokkevold PR, Vandemark L, Kenney EB, Bernard GW: Osteogenesis enhanced by chitosan in vitro. *J Periodontol* 1996;67:1170-1175.
 26. Lahiji A, Sohrabi A, Hungerford D, Frinzoza C: Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. *J Biomed Mater Res* 2000;15;51:586-595.
 27. 백정원, 이현정, 유윤정, 조규성, 김종관, 최성호: 키토산이 치주인대 섬유아세포에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 2001;31:823-832.
 28. Beertsen W, Theo Van Den B: Calcification of dentinal collagen by cultured rabbit periodontium. The role of alkaline phosphatase. *Matrix* 1989;9:159-171.
 29. Anderson HC: Mechanism of mineral formation in bone. *Lab Invest* 1989;60:320-330.
 30. Roach HI: Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralization and resorption. *Cell Biol Interntl* 1994;18:617-628.
 31. Glowacki J, Rey C, Glimcher MJ, Cox KA, Lian J: A role for osteocalcin in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 1991;45:292-302.
 32. Muzzarelli RA, Zucchini C, Ilari P, Pugnaroni A, Belmonte MM, Biagini G, Castaldini C: Osteoconductive properties of methylpyrrolidone chitosan in an animal model. *Biomaterials* 1993;14:925-929.

Effect of chitosan on bone matrix expression and mineralization in primary rat calvarial cell

Jae-Cheol Kim¹, De-Zhe Ciu², Young-Joon Kim^{1,3}, Hyun-Ju Chung^{1,3}, Ok-Su Kim^{1,3}

¹Dept. of Periodontology, ²Graduate School, Dept. of Dental Science, and
³Dental Science Research Institute, Chonnam National 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, 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 expression of extracellular matrix proteins in primary rat calvarial cells in vitro. In the control group, cells was cultured with BGJb media. In the experimental groups, cells were cultured with chitosan in concentration of 0.01, 0.1, 1.0 and 2.0 mg/ml. Then each group was characterized by examining alkaline phosphatase activity at 3 and 7 days, and the ability to produce mineralized nodules of rat calvarial cells at 14 and 21 days. Synthesis of type I collagen (COL-I), osteocalcin (OCN), bone sialoprotein (BSP) was evaluated by RT-PCR at 14 days.

The results were as follows:

1. Alkaline phosphatase activity was significantly higher in the concentration of chitosan 0.01mg/ml, 0.1mg/ml and 1.0mg/ml compared to control ($p < 0.05$).
2. The percentage of mineralized bone nodule was more in the concentration of chitosan 0.1mg/ml and 1.0 mg/ml than the control.
3. At 14 day culture, the expression of OCN was increased by chitosan in concentration of 1.0 mg/ml and 2.0 mg/ml.

These results suggested that chitosan in concentration of 0.1 and 1.0 mg/ml stimulate the extracellular matrix of primary rat calvarial cells and may facilitate the formation of bone.