

## 돼지에서 창상치유에 대한 키토산의 영향

변홍섭 · 김명진 · 이재연 · 조성환 · 박창식\* · 김명철<sup>1</sup>

충남대학교 수의과대학

\*충남대학교 동물자원학부, 형질전환복제돼지연구센터

(게재승인: 2007년 4월 4일)

### Effects of Chitosan on Wound Healing in Pigs

Hong-sub Byun, Myung-jin Kim, Jae-yeon Lee, Sung-whan Cho, Chang-sik Park\* and Myung-cheol Kim<sup>1</sup>

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

\*Division of Animal Science & Resources, Research Center for Transgenic Cloned Pigs,  
Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

**Abstracts :** The objective of this study was to investigate the effects of implanted chitosan applied to surgically created wound in pigs. Six healthy 2~3 months old Landrace and Yorkshire mixed breeds of both genders were used. A 2 cm straight skin incision was made and undermined skin (2 × 2 cm ) over on the each pig's both sides of dorsal midline at 0, 7, 14 and 18 days. One wound (left side) was implanted 0.4 mg of cotton type chitosan and other wound was treated saline (3 ml). Each wound was closed with two interrupted suture of 2-0 sutures. The wounds created at 18, 14, 7 and 0 days were named post-wounding day (PWD) 3, 7, 14 and 21, respectively. At 21 days after initial wounding, each wound was taken for histological observations. Reepithelialization tended to be greater in the chitosan group than in the control group at PWD 3 and 14. Granulation tissue formation did not show especial differences in two groups. Number of inflammatory cells was lesser statistically in level in the chitosan group than those in the control group at 21 days after wounding (p < 0.05). Fibroblasts and neovasculature tended to be greater in the chitosan group than in the control group at PWD 3 and 7, and tended to be lesser in the chitosan group than in the control group at PWD 14 and 21. Collagen and fibrin were observed to be evenly distributed around the wound in the chitosan group. But collagen and fibrin were observed to be converged along the wound in the control group.

**Key words :** wound, pig, chitosan, healing, histological observation.

### 서 론

키토산은 자연계에서 풍부한 천연 생고분자로서 새우나 갑각류의 외골격을 이루는 주성분이며, 진균류나 곰팡이 또는 효모의 세포벽의 주성분을 구성하고 있는 매우 안정된 다당류이다(19,20,21,23). 키토산(1-4, 2-amino-2-deoxy-β-D-glucan)은 키토산을 고온의 강알칼리로 처리하여 측쇄를 탈아세틸화시켜 정제된 탄수화물 고분자로서 hyaluronic acid와 비슷한 구조이다(4,19,20,21). 키토산은 신체조직과 유사한 glucosamine 결합으로 생체적합성이 우수하며, 생분해되며 독성이 없으며 금속이온을 킬레이트화하고, 용액, 분말, 박편, 겔 및 얇은 필름 형태로 공급되고 특이한 화학구조와 생물학적인 성질로 인하여 다양한 분야의 생체재료로 이용되고 있다.

최근에는 의학 및 수의학 분야에서 사용되고 있으며, 특히

피부-창상 치료의 분야에서 이용이 되고 있다. 키토산과 키토산은 창상 드레싱에 대한 적용에서 매우 편리하고도 유익한 생물학적 특성을 갖고 있는데, 즉 생물적합성, 생물분해성, 지혈작용, 항염작용 및 창상치유 촉진작용이 있다(3,6,11,12,16,18).

Kojima 등(5)은 쥐에서 키토산 또는 키토산으로 충만된 polyester non-woven fabric의 적용이 창상치유과정의 초기에 안정된 collagen 합성을 유발시킨다고 하였다. 한편 면양(13) 및 소(9)에서 천지굴근근을 제거하고 키토산으로 충만된 polyester non-woven fabric의 적용한 결과 적용부위에 섬유증 및 창상강도가 증대 되었다고 보고된 바 있다. 그리고 정 등(23)은 쥐에서 키토산이 두개골결손부의 신생골 형성과 밀도를 증대시켰다고 보고하였으며, 남 등(10)은 키토산이 직장암 발생의 중요한 요인으로 증명된 ornithine decarboxylase의 활성을 억제하였다고 보고하였다.

개(15) 및 소(17)에서 chitosan이 polymorphonuclear cells의 이주를 증진시켜서 창상치유의 촉진에 유리한 영향을 주

<sup>1</sup>Corresponding author.  
E-mail : mckim@cnu.ac.kr

었다고 보고되었다. 또한 Yu 등(18)은 창상치유의 초기에 토끼에서 키토산 올리고머의 적용은 개방창상의 치유를 촉진한다 하였고(18), 구 등(19)은 이온 빔 조사 처리가 키토산 스펀지의 세포친화성 및 활성을 쥐에서 증가시켰다고 하였다. 이 등(22)은 RGD 펩타이드의 공유결합으로 표면개질된 키토산막은 사람 조골세포의 부착능을 증진시킨다고 하였다.

이상과 같이 키토산을 이용한 동물이나 임상적 적용이 이루어지고 있지만, 돼지에서 창상치유에서의 키토산의 세부적인 영향에 관한 보고는 드문 편이다. 이에 본 연구에서는 돼지의 봉합창상에서 창상치유에 대한 키토산의 영향을 알아보는데 그 목적이 있다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

임상적으로 건강한, 2~3개월령의 랜드레이스와 요크셔의 교잡종 6두를 실험동물로 사용하였다. 이 돼지들은 충남대학교 부속동물사육장에서 제공되었으며, 암돼지 3두 및 수돼지 3두이었으며, 체중은 23~38 kg 이었다.

### 전처치와 마취

실험대상 돼지들을 마취전 24시간 동안 절식시켰고, 물은 공급하였다. 전마취제로서 atropine sulfate 0.04 mg/(황산아트로핀®, 대한약품, Korea)을 피하주사로 투여 하였으며, 마취제로서 tiletamine-zolazepam 4.4 mg/(Zoletil®, Virvac, France)을 근육주사로 투여하였다.

### 창상의 형성

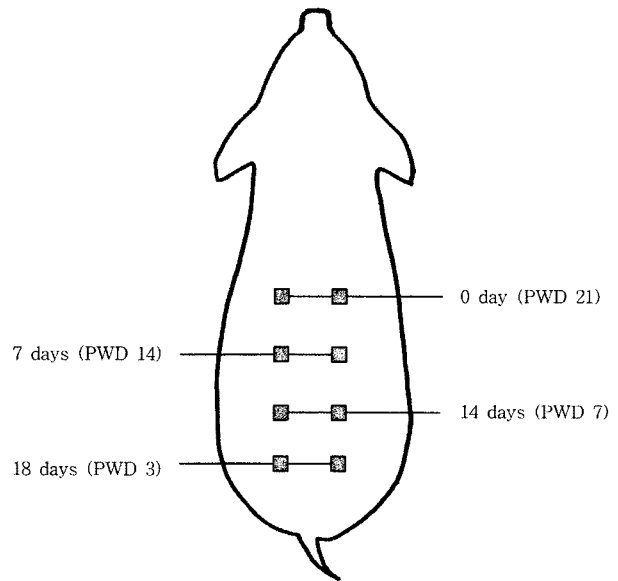
0, 7, 14 및 18일에, 각 돼지의 등쪽 정중선의 양쪽 측면 피부에 2 cm의 직선 피부전층 절개를 하고, 피부의 밑을 2 × 2 cm의 크기로 undermine하였다(Fig 1). 한쪽의 창상에는 0.4 mg의 면구상 키토산 (Chitopack® C, Eisai, Japan)을 삽입하였고, 다른 쪽의 창상에는 3 ml의 saline을 주입하였다. 각 창상은 2-0 봉합사로 결절봉합하여 폐쇄하였다.

### 조직학적 검사

18, 14, 7 및 0일에 형성된 창상들은 각각 창상후 경과일(post-wounding day, PWD) 3, 7, 14 및 21일이라고 명명하였다. 최초의 창상형성 후 21일에, 각 창상의 조직학적 검사를 위하여 창상조직을 절제하여 중성원충formalin에 충분히 고정하였다. 고정이 끝난 조직들은 일반적인 조직 처리과정을 거쳐 Hematoxylin and Eosin(H-E) 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

재상피화 및 육아조직형성의 정도를 0에서 3 또는 4까지로 다음과 같은 등급으로 구분하였다: 재상피화의 정도; 0 = 없음, 1 = 30% 이하, 2 = 31~60%, 3 = 61~99%, 4 = 완성됨, 육아조직형성; 0 = 없음, 1 = 얇음, 2 = 중등도, 3 = 전층.

염증세포, 섬유아세포 및 맥관신생의 수는 0에서 3까지의 등급으로 다음과 같이 구분하였다: 0 = 정상, 1 = 경미함, 2 = 중등도, 3 = 심함.



**Fig 1.** Schematic illustration of the wounds (2 × 2 cm) on both sides of the dorsal midline of each dogs. In each dog, one wound (left side was treated with chitosan (chitosan group) and the other wound (right side) was treated with saline (control group).

### 통계처리

각각의 수치는 평균권 ± 표준편차(mean ± SD)로 산출하였고, 대조군과의 비교는 Student t-test로 통계처리한 후, p < 0.05인 경우 유의성이 있다고 인정하였다.

## 결 과

재상피화는 키토산 투여군이 대조군에 비하여 PWD 3 및 14에 상피재생이 다소 많은 경향이 있었다(Table 1). 육아조직은 군간의 비교에서 특별한 차이가 발견되지 아니 하였다(Table 2). 염증세포에 관한 조직학적 소견은 Table 3과 같다. 키토산 투여군이 대조군에 비하여 염증세포가 전반적으로 적은 경향을 나타내었으며, PWD 21에는 유의성 있는 차이를 나타내었다(p < 0.05).

섬유아세포의 형성은 키토산 투여군이 대조군에 비하여 PWD 3 및 7에는 더 높았으나, PWD 14 및 21에는 더 낮은 결과를 나타내었다(Table 4). 맥관신생의 증식은 두군 공히 PWD 7 및 14에 높은 상승치를 나타내었다. 군간의 비교에서, 맥관신생의 증식은 키토산 투여군이 대조군에 비하여 PWD 3 및 7에는 더 높았으나, PWD 14 및 21에는 더 낮은 결과를 나타내었다(Table 5).

PWD 21에 있어서 키토산 투여군의 현미경사진 소견은 Fig 2에 나타난 바와 같이 창상이 봉합선을 따라서 접합되어 있으며, collagen과 fibrin이 창상주위로 고르게 퍼져 있는 것이 관찰되었다. PWD 21에 있어서 대조군의 현미경사진 소견은 Fig 3에 나타난 바와 같이 collagen과 fibrin이 창상을 따라 집중되어 있으며, 창상부위가 함몰되어 있는 것이 관찰되었다.

Table 1. Reepithelialization of epidermis &amp; dermis in histological findings of wound

Group	Post wounding day 3	Post wounding day 7	Post wounding day 14	Post wounding day 21
Chitosan	0.3 ± 0.52	1.2 ± 0.84	2.5 ± 0.83	3.8 ± 0.45
Control	0.1 ± 0.17	1.3 ± 0.52	2.8 ± 0.41	3.5 ± 0.55

Table 2. Granulation tissue of epidermis &amp; dermis in histological findings of wound

Group	Post wounding day 3	Post wounding day 7	Post wounding day 14	Post wounding day 21
Chitosan	1.5 ± 0.55	2.2 ± 0.84	2.7 ± 0.52	2.2 ± 0.99
Control	1.5 ± 0.84	2.1 ± 0.41	2.8 ± 0.41	2.5 ± 0.55

Table 3. Inflammatory cells of epidermis &amp; dermis in histological findings of wound

Group	Post wounding day 3	Post wounding day 7	Post wounding day 14	Post wounding day 21
Chitosan	1.8 ± 0.41	2.2 ± 0.84	2.2 ± 0.41	0.9 ± 0.23*
Control	2.0 ± 0.89	2.5 ± 0.55	2.2 ± 0.75	2.0 ± 0.25

\* p<0.05; indicates a significant difference, compared to the control group.

Table 4. Fibroblasts of epidermis &amp; dermis in histological findings of wound

Group	Post wounding day 3	Post wounding day 7	Post wounding day 14	Post wounding day 21
Chitosan	1.5 ± 0.55	2.2 ± 0.84	2.7 ± 0.81	2.3 ± 0.82
Control	1.3 ± 1.03	2.2 ± 0.75	3.0 ± 0.21	2.5 ± 0.55

Table 5. Neovasculature of epidermis &amp; dermis in histological findings of wound

Group	Post wounding day 3	Post wounding day 7	Post wounding day 14	Post wounding day 21
Chitosan	1.3 ± 0.52	2.4 ± 0.55	2.3 ± 0.82	1.3 ± 0.52
Control	1.2 ± 0.41	2.2 ± 0.75	2.7 ± 0.52	1.7 ± 0.52



Fig 2. Photomicrograph of chitosan group at post wounding day 21. Wound was unionized along the suture line. Collagen and fibrin was evenly distributed around the wound (HE, × 100).



Fig 3. Photomicrograph of control group at post wounding day 21. Collagen and fibrin was converged along the wound. Wound area was sunk (HE, × 100).

## 고 찰

창상 치유는 우선적인 생물학적 과정이며, 창상조직을 회복시키거나 또는 collagen 으로 대체시키는 물리학적, 화학적 및 세포 역할의 조합이다. 치유는 수용자 요인, 창상의 특징

및 다른 외적요인들에 영향을 받는다(1,2,14).

개방창에서 상피화는 적절한 육아조직 바탕이 형성될 때에 (통상적으로 4~5일), 진행이 된다. 그러나 봉합창에서는 육아조직이 채워야 할 공간이 없기 때문에 양호한 창연 병치가 된 봉합창은 상피화가 대부분 직접적으로(24~48시간)

일어난다. 본 연구에서 봉합창의 재생피화는 키토산 투여군이 대조군에 비하여 PWD 3 및 14에 상피재생이 다소 많은 경향이 있었으며(Table 1), 키토산의 적용이 치유에 유리한 영향을 나타내었던 것으로 사료된다.

새로운 모세혈관, 섬유아세포 및 섬유조직은 손상후 3~5일에 밝은 적색의 육질의 육아조직을 형성한다. 본 연구에서의 봉합창의 육아조직은 키토산 투여군이 대조군과 유사한 결과를 나타내었으며(Table 2), 육아조직에서는 키토산 투여로 인한 특별한 차이가 발견되지 아니 하였다.

Okamoto 등(12)은 개의 개방창상에서 키틴과 키토산의 적용은 PWD 28에 대조군에 비하여 염증세포의 수가 적은 결과를 나타내었다고 보고하였다. 본 연구에서도 염증세포의 수는 PWD 3, 7 및 21에 키토산 투여군이 대조군에 비하여 염증세포가 적은 경향을 나타내었으며(Table 3), 이것은 키토산이 창상에서 자극을 덜 일으키고, 정상 피부를 재생하는 것을 뒷받침하는 것으로 판단된다.

섬유아세포는 염증기가 감퇴되면서(2~3일), 새로운 상피아의 직전에 창상내로 이동한다. 그리고 2~3주에 collagen의 양이 최대치에 도달하는 복구기의 말기에 섬유아세포의 수와 collagen 합성의 비율은 감소된다(2). 본 연구에서의 섬유아세포의 형성은 키토산 투여군이 대조군에 비하여 PWD 3 및 7에는 더 높았으나, PWD 14 및 21에는 더 낮은 결과를 나타냄으로서(Table 4), 키토산이 창상치유의 진행을 더 신속하게 하는 것으로 판단되었다.

모세혈관은 이동하는 섬유아세포에 이어서 창상내로 침윤된다. 모세혈관은 기존의 혈관에서 기시되며, 다른 모세혈관아 또는 붕괴된 혈관과 결합된다. 새로운 모세혈관은 창상내의 산소장력을 증가시켜서 섬유형성을 증대시킨다(2). Minami 등(8)은 chitin을 개에서 피하에 삽입후 4일에 관찰한 결과 혈관신생의 화학적 매개체인 prostaglandin E2가 대조군에 비하여 5배 증가되었다고 보고하였다.

본 연구에서 맥관신생의 증식은 두군 공히 PWD 7 및 14에 높은 상승치를 나타내었다. 군간의 비교에서, 맥관신생의 증식은 키토산 투여군이 대조군에 비하여 창상 초기인 PWD 3 및 7에는 더 높았으나, PWD 14 및 21에는 더 낮은 결과를 나타내었으며(Table 5), 이러한 결과는 Minami 등(8)의 결과에서 처럼 키토산이 창상초기에 맥관신생을 촉진시켜서 치유에 유리하게 작용한 것으로 사료된다.

Minami 등(7)은 개에서 키토산을 피하로 투여한 연구에서 50 mg/kg이상에서 식욕부진이 발생하였고, 150 mg/kg이상에서 폐사가 일어났으며 부검소견으로 심한 출혈성 폐염이 관찰되었다고 보고하였다. 본 연구에서는 2×2 cm의 크기의 창상에 0.4 mg의 면구상 키토산을 적용하여 창상치유를 증진시키는 결과를 얻었으므로, 키토산은 창상치유에 적용시 독성이 없는 것으로 사료된다.

본 연구에서의 현미경사진 소견은 대조군은(Fig 3)은 collagen과 fibrin이 창상을 따라 집중되어 있으며, 창상부위가 함몰되어 있었으나, 키토산 투여군(Fig 2)에서는 창상이 봉합선을 따라서 접합되어 있으며, collagen과 fibrin이 창상

주위로 고르게 퍼져 있는 것이 관찰됨으로서, 현미경학적인 관찰에서 키토산이 창상치유에 유리하게 작용한 결과를 얻었다고 발표한 종전의 자료(12)와 일치되는 결과를 나타내었다.

향후 화학적, 물리적 성질을 변경한 여러 키토산을 이용한 다양한 동물의 여러 조직에서의 세부적인 연구가 필요하며, 조직공학 분야의 기질로 이용할 경우 어떤 형태가 가장 적합할지에 대한 부가적인 연구가 병행되어야 할 것으로 생각된다.

## 결 론

본 연구는 돼지에서 외과적으로 유발된 창상에 키토산을 적용시의 영향을 평가하기 위해 실시하였다. 임상적으로 건강한, 2~3개월령의 랜드레이스와 요크셔의 교잡종 6두를 실험동물로 사용하였다. 0, 7, 14 및 18일에, 각 돼지의 등쪽 정중선의 양쪽 측면 피부에 2 cm의 직선 피부전층 절개를 하고, 피부의 밑을 2×2 cm의 크기로 undermine하였다. 한쪽의 창상에는 0.4 mg의 면구상 키토산을 삽입하였고, 다른 쪽의 창상에는 3 ml의 saline을 주입하였다. 각 창상은 2-0 봉합사로 결절봉합하여 폐쇄하였다. 18, 14, 7 및 0일에 형성된 창상들은 각각 창상후 경과일 (post-wounding day, PWD) 3, 7, 14 및 21일이라고 명명하였다. 최초의 창상형성 후 21일에, 각 창상의 조직학적 검사를 위하여 창상조직을 절제하였다. 재생피화는 키토산 투여군이 대조군에 비하여 PWD 3 및 14에 상피재생이 다소 많은 경향이 있었다. 육아조직은 군간의 비교에서 특별한 차이가 발견되지 아니 하였다. 키토산 투여군이 대조군에 비하여 염증세포가 전반적으로 적은 경향을 나타내었으며, PWD 21에는 유의성 있는 차이를 나타내었다( $p < 0.05$ ). 섬유아세포와 맥관신생은 키토산 투여군이 대조군에 비하여 PWD 3 및 7에는 더 높았으나, PWD 14 및 21에는 더 낮은 결과를 나타내었다. 키토산 투여군에서는 collagen과 fibrin이 창상주위로 고르게 퍼져 있는 것이 관찰되었다. 그러나 대조군에서는 collagen과 fibrin이 창상을 따라 집중되어 있었다.

## 감사의 글

이 논문은 2005년도 충남대학교 학술연구비의 지원에 의하여 연구되었으며, 또한 일부는 한국과학재단 우수연구센터(R11-2002-100-00000-0) 지원으로 수행되었음.

## 참 고 문 헌

- Hedlund GS. Wound management. In: Small animal surgery, 2nd ed. St Louis: Mosby. 2002: 134-144.
- Hosgood G. Wound repair and specific tissue response to injury. In: Textbook of small animal surgery, 3rd ed. Philadelphia: Saunders. 2003: 66-86.
- Ishihara M, Ono K, Sato M, Nakanishi K, Saito Y, Yura H, Matsui T, Hattori H, Fujita M, Kikuchi M, Kurita A. Acceleration of wound contraction and healing with a

- photocrosslinkable chitosan hydrogel. *Wound Rep Reg* 2001; 9: 513-521.
4. Kim SK, Nghiep ND, Rajapakse N. Therapeutic prospectives of chitin, chitosan and their derivatives. *J Chitin Chitosan* 2006; 11: 1-10.
  5. Kojima K, Okamoto Y, Kojima K, Miyatake K, Fujise H, Shigemasa Y, Minami S. Effects of chitin and chitosan on collagen synthesis in wound healing. *J Vet Med Sci* 66: 1595-1598, 2004.
  6. Mariappan MR, Alas EA, Williams JG, Prager MD. Chitosan and chitosan sulfate have opposing effects on collagen-fibroblast interactions. *Wound Rep Reg* 1999; 7: 400-406.
  7. Minami S, Oh-oka M, Okamoto Y, Miyatake K, Matsuhashi A, Shigemasa Y, Fukumoto Y. Chitosan-inducing hemorrhagic pneumonia in dogs. *Carbohydrate Polymers* 29: 241-246, 1996.
  8. Minami S, Okamoto Y, Matsuhashi A, Sashiwa H, Saimoto H, Shigemasa Y, Tanigawa T, Suzuki T, Tanioka S, Tanaka Y. Polymeric N-acetyl-D-glucosamine (chitin) induces prostaglandin E<sub>2</sub> in dogs. *J Vet Med Sci* 57: 377-378, 1995.
  9. Minami S, Okamoto Y, Miyatake K, Matsuhashi A, Kitamura Y, Tanigawa T, Tanaka Y, Shigemasa Y. Chitin induces type collagen and elastic fiber in implanted non-woven fabric of polyester. *Carbohydrate Polymers* 29: 295-299.
  10. Nam KS, Cho HJ, Shon YH. Effect of chitosan oligosaccharide on chemopreventive enzymes of colon cancer. *J Chitin Chitosan* 2006; 11: 171-174.
  11. Okamoto Y, Minami 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* 55: 743-747, 1993.
  12. Okamoto Y, Shibasaki K, Minami S, Matsuhashi A, Tanioka S, Shigemasa Y. Evaluation of chitin and chitosan on open wound healing in dogs. *J Vet Med Sci* 57(5): 851-854, 1995.
  13. Okamoto Y, Southwood L, Stashak TS, Norrdin RW, Nelson AW, Minami S, Matsuhashi A, Kato K, Shigemasa Y. Effect of chitin on nonwoven fabric implant in tendon healing. *Carbohydrate Polymers* 33: 33-38, 1997.
  14. Thomson RG. Granulation tissue and wound healing. In: *General veterinary pathology*, 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders. 1984: 252-261.
  15. Usami Y, Minami S, Okamoto Y, Matsuhashi A, Shigemasa Y. Influence of chain length of N-acetyl-D-glucosamine residues on direct and complement-mediated chemotactic activities for canine polymorphonuclear cells. *Carbohydrate Polymers* 32: 115-122, 1997.
  16. Usami Y, Okamoto Y, Minami A, Kumazawa NH, Tanioka S, Shigemasa Y. Migration of canine neutrophils to chitin and chitosan. *J Vet Med Sci* 56: 1215-1216, 1994.
  17. Usami Y, Okamoto Y, Minami S, Matsuhashi A, Kumazawa NH, Tanioka S, Shigemasa Y. Chitin and chitosan induce migration of bovine polymorphonuclear cells. *J Vet Med Sci* 56: 761-762, 1994.
  18. Yu Y, Park WH, Lee SC, Ko BM. Effects of chitooligosaccharide on the early stage of wound healing. *J Chitin Chitosan* 8: 35-39, 2003.
  19. 구 영. 이온 빔 조사 처리된 키토산 스펀지의 세포적합도에 관한 연구. *대한치주과학회지* 1998; 28: 281-291.
  20. 김옥수, 정현주. 키토산이 배양중인 치주인대세포에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 2001; 31: 163-180.
  21. 김옥수, 정현주. 키토산이 치은섬유아세포에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 2002; 32: 235-247.
  22. 이창균, 황정효, 이용무, 구영, 류인철, 이승진, 한수부, 최상묵, 정종평. RGD 펩타이드로 표면개질된 키토산막의 생물학적 영향. *대한치주과학회지* 2003; 33: 27-35.
  23. 정의원, 서종진, 최성호, 조규성, 채중규, 김종관. 백서 두개골 결손부에서 키토산의 골조직 재생 유도 효과. *대한치주과학회지* 2000; 30: 851-870.