

# Matrix metalloproteinase(MMP) sensitive hyaluronic acid hydrogel-nanoparticle complex와 rhBMP-2를 이용한 골재생

남정훈<sup>1,5</sup> · 박종철<sup>1</sup> · 유상배<sup>2</sup> · 정용일<sup>3</sup> · 태기용<sup>3</sup> · 김정주<sup>4</sup> · 박용두<sup>4</sup> · 장정원<sup>2</sup> · 이종호<sup>1</sup>

<sup>1</sup>서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, <sup>2</sup>치학연구소,

<sup>3</sup>광주 과학기술원 신소재공학과, <sup>4</sup>고려대학교 의과대학 의공학교실, BK21 의공학사업단, 한국인공장기센터

<sup>5</sup>한림대학교 의과대학 강남성심병원 구강악안면외과학교실

**Abstract** (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2009;35:137-145)

## BONE REGENERATION WITH MMP SENSITIVE HYALURONIC ACID-BASED HYDROGEL, rhBMP-2 AND NANOPARTICLES IN RAT CALVARIAL CRITICAL SIZE DEFECT(CSD) MODEL

Jeong Hun Nam<sup>1,5</sup>, Jong Chul Park<sup>1</sup>, Sang Bae Yu<sup>2</sup>, Yong Il Chung<sup>3</sup>,  
Gi Yoong Tae<sup>3</sup>, Jung Ju Kim<sup>4</sup>, Yong Doo Park<sup>4</sup>, Jeong Won Jahng<sup>2</sup>, Jong Ho Lee<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Oral and Maxillofacial Surgery, <sup>2</sup>Dental Research Institute, School of Dentistry, Seoul National University

<sup>3</sup>Department of Materials Science and Engineering, Gwangju Institute of Science and Technology

<sup>4</sup>Department of Biomedical Engineering, Biomedical Engineering, Brain Korea 21 2nd Project for Biomedical Science, Korea Artificial Organ Center, College of Medicine, Korea University

<sup>5</sup>Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Kangnam Sacred Heart Hospital, College of Medicine, Hallym University

As an efficient controlled release system for rhBMP-2, a functional nanoparticle-hydrogel complex, incorporated with matrix metalloproteinase(MMP) sensitive peptide cross-linker, was developed and used as a bone transplant. In vivo bone formation was evaluated by soft x-ray, histology, alkaline phosphatase(ALP) activity and mineral contents analysis, based on the rat calvarial critical size defect(8mm in diameter) model.

Significantly, effective bone regeneration was achieved with the rhBMP-2 loaded MMP sensitive hyaluronic acid(HA) based hydrogel-Nanoparticles(NP) complex, as compared to only MMP HA, the MMP HA-NP without rhBMP-2, or even with the rhBMP-2. These improvements included the formation pattern of bone and functional marrow, the degree of calcium quantification, and the ALP activity.

These results indicate that the MMP sensitive HA with nano-particle complex can be a promising candidate for a new bone defect replacement matrix, and an enhanced rhBMP-2 scaffold.

**Key words** : matrix metalloproteinase(MMP), hyaluronic acid, controlled release, rhBMP-2, nanoparticle, MMP sensitive hydrogel

### I. 서 론

rhBMP-2의 골 재생능을 증진시키기 위한 여러 가지 시도 중 rhBMP-2의 서방출이 가능한 지지체의 연구가 많이 시도되고 있는데, 이러한 전달체(delivery system)로는 inorganic hydroxyapatite(HAP), 콜라젠, 피브린, 알지네이트나 하이알루론산(Hyaluronic Acid, HA) 같은 천연 biopolymer나 PLGA, PLA, PGA와 같은 합성 polymer가 제시되고 있다<sup>1,4)</sup>.

HA는 세포외기질의 주성분 중 하나로서 신체의 결합조직에 존재하며<sup>5)</sup>, CD44, RHAMM, ICAM-I 등의 세포수용체

를 통해서 세포생존과 증식 그리고 조직의 유지와 재생 등에 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>6-8)</sup>. 특히 분자량에 따라 HA의 생물학적 활성도가 달라지며 고분자보다는 저분자량일 때 좀 더 많은 angiogenic activity를 가진다고 보고되었다<sup>9)</sup>. 이러한 특성으로 인해 골 결손부의 재생실험에 있어서 HA는 조직공학적 담체(scaffold)로서 빈번히 사용되고 있다.

그러나 기존의 HA에 기초한 hydrogel scaffold는 아크릴화(acrylation)된 HA를 기본으로 가교제로서 폴리에틸렌 글리콜(Polyethylene Glycol, PEG)를 사용하여 흡수가 적절치 못하였는데, 가교제로 polymer가 아닌 matrix metalloproteinase(MMP)에 분해되는 시퀀스를 가진 peptide를 사용할 경우 기존 scaffold의 문제점이던 분해속도를 증진시킬 수 있는 점이 보고되었다<sup>10-12)</sup>.

본 연구에서는 rhBMP-2의 보다 양호한 controlled release를 통해 골 형성능을 향상시키고자 in vivo 상에서 hyaluro-

#### 이 종 호

110-749 서울특별시 중로구 연건동 275-1

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Jong-Ho Lee

Department of OMFS, College of Dentistry, Seoul National University

#275-1 Yeongun-dong, Jongno-gu, Seoul, 110-749, Korea

Tel : 82-2-2072-2630, Fax : 82-2-766-4948

E-mail: leejongh@snu.ac.kr

\*본 논문은 보건복지부 보건의료기술진흥사업비 지원(A062480)에 의하여 연구되어짐.

nidase와 MMP의 이중효소작용(double enzyme action)에 의해서 분해되도록 한 MMP sensitive HA hydrogel-nanoparticle(NP) complex를 제조하였으며, 이의 골치유능을 백서 두개골 critical size defect(CSD)모델을 통해 알아보고자 하였다.

## II. 연구 재료 및 방법

### 2.1 MMP sensitive hydrogel의 제조

Hyaluronic acid (MW 50kDa)는 Lifecore Biomedical Co. (Chaska, MN, USA)에서, 1-hydroxybenzotriazole hydrate (HOBT)는 Fluka Chemical Co. (Buchs, Switzerland)에서, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodimide와 adipic acid dihydrazide(AAD) 및 triethanolamine(TEA)는 Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO, USA)에서 각각 구매하였다. N-acryloxysuccinimide(NAS)는 Acros organics (New Jersey, USA)에서, Poly(ethylene glycol) (PEG) tetra-thiols (PEG-SH<sup>4)</sup>) (MW 10kDa)는 Sun Bio Inc.(Orinda, CA, USA)에서 구입하였다. RGD 펩티드와 MMP 감응성 및 MMP 비감응성 펩티드는 AnyGen. Co. Ltd (Gwang-ju, Korea)에서 공급받았다.

하이알루론산 수화젤은 이전의 연구에서 보고된 바와 같이 하이알루론산의 아크릴화 방식으로 제조하였다<sup>10)</sup>. 10%wt MMP sensitive 50kDa 하이알루론산 수화젤의 제조를 위해서, 아크릴화된 하이알루론산(50kDa)을 TEA buffer (0.3M, pH 8)에 용해시킨 후, 가교제 펩티드인 MMP 감응성 펩티드(GCRDGPQGIWQDRCG)<sup>11)</sup>를 아크릴기와 티올기를 같은 molar ratio비율을 가진 가교제로 첨가하였고<sup>9,12)</sup>, Hyaluronic acid-based hydrogel은 Michael-type의 첨가반응으로 형성하였다<sup>13)</sup>.

### 2.2 Nanoparticle 제조

Poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA, 75 mol% of lactide, MW 90,000)는 Boehringer Ingelheim(Ingelheim, Germany)에서, Heparin sodium(189 IU/mg, MW 12,500)은 Celsus Laboratories(Cincinnati, OH, USA)에서 각각 제공받았다.

이전의 연구에서 생체친화적이고 기능화된 Nanoparticle(NP)의 제조와 이를 이용한 실험을 보고한 바 있으며, 이는 소수성의 코어(PLGA)를 가지고, heparin을 융합시킨 hydrogel 표면층(Pluronic F-127)으로 구성된 heparin 기능화 나노입자이다<sup>14-16)</sup>. 40mg의 PLGA를 2ml DMSO에 용해시킨 후, 120mg heparin이 함유된 5% (w/v) Pluronic aqueous solution에 천천히 첨가하여 heparin 기능화 나노입자를 제조하였다.

NP는 멸균필터처리(0.45 $\mu$ m, Whatman, UK) 하였고, 1시간 동안 12,000rpm의 속도로 원심분리기(Supra 22K, Hanil Science Industrial Co., Korea)로 집적한 후, phosphate

buffered saline(PBS) 40 $\mu$ l에 재부유 과정을 거쳤다<sup>14-16)</sup>.

### 2.3 rhBMP-2 함유 MMP sensitive hydrogel-nanoparticle 이식체 준비

재부유화된 NP와 2 $\mu$ g rhBMP-2의 혼합체를 상기의 MMP sensitive hydrogel reaction mixture와 겔화를 위해 37°C에서 배양하였고, 직경 8mm의 원판형(disk) 형태로 molding과정을 거친 후 동물실험에 사용하였다.

### 2.4 동물 실험군 및 수술

8주령 (체중 250-300g) Sprague-Dawley 백서 (Oriental Bio Co, Charles River Korea, Korea) 48마리를 사용하였으며, 이 식체에 따라 4개 군으로 분류하여 실험하였다 (Table 1. mmp HA-NP-BMP군, n=12; mmp HA-BMP군, n=12; mmp HA-NP군, n=12; mmp HA군, n=12). 동물을 xylazine (Rompun<sup>®</sup>, 20mg/ml, Bayer Korea Ltd, Korea)과 ketamine hydrochloride(Ketara<sup>®</sup>, 50mg/ml, Yuhan Corp, Korea)의 혼합액 (1:4 부피비, dosage 0.15ml/100g, 복강내 주사)을 사용하여 마취하였다. 전두부를 삭모하고 포비돈 솜으로 소독한 후, 비골에서 후두골 사이의 두개골 시상봉합을 따라 약 2cm 가량의 절개를 가한 다음 골막을 포함하는 피판을 거상하여 두정골까지 노출시켰다.

8mm trephine bur와 소형 카바이드 라운드 버 (6R, SS White, USA) 그리고 저속 드릴 키트 (Max. 450 rpm. Hyup Sung, Korea)를 사용하여 두정부에 직경 8mm의 원형 결손부를 형성하였다. 수술용 현미경(Zeiss, Germany)을 이용하여 두정부 골 두께와 동일한 절단을 시행하였으며 골창을 제거한 후 정상 두정골의 calcium/phosphate 정량 측정에 사용하기 위해 냉동 보관하였다.

예상치 못한 출혈은 bipolar coagulation(Martin, Germany)과 oxidized cellulose (Surgicel<sup>®</sup>, Johnson & Johnson, USA)를 이용하여 지혈하였다. 골결손부에는 rhBMP-2(2 $\mu$ g)+ Nanoparticle+ MMP HA hydrogel, rhBMP-2(2 $\mu$ g)+ MMP HA hydrogel, Nanoparticle + MMP HA hydrogel, 그리고 MMP HA hydrogel을 각 군의 동물(n=12)에 이식하였으며(Table 1, Fig. 1), 피부는 5-0 nylon (Ethicon<sup>®</sup>, Johnson & Johnson, USA)를 사용하여 봉합하였다.

**Table 1.** Experimental grouping.

Group	N	Composition
mmp HA	12	mmp Hyaluronic Acid Hydrogel only
mmp HA-NP	12	Nanoparticle+mmp Hyaluronic Acid Hydrogel
mmp HA-BMP	12	rhBMP-2(2 $\mu$ g)+mmp Hyaluronic Acid Hydrogel
mmp HA-BMP-NP	12	rhBMP-2(2 $\mu$ g)+Nanoparticle+mmp Hyaluronic Acid Hydrogel



**Fig. 1.** Intraoperative photographs showing 8mm CSD and transplanted mmp HA-NP-BMP complex.

실험 4주 후 각 실험 동물들을 CO<sub>2</sub> 질식을 통하여 희생시킨 다음 결손부를 포함한 두개골을 채취하여 방사선학적, 조직형태학적, 정량적인 분석을 시행하였다.

## 2.5 방사선학적 분석

채취된 조직을 먼저 캐비닛형 soft x-ray unit(CMB-2, Softex co. Japan; 20kvp, 2mA, 2min 및 30kvp, 2mA, 1.5min)으로 방사선사진을 채득하였다. 방사선 필름 (Biomax, Kodak, USA) 상은 디지털카메라(D200, Nikon, Japan)를 이용하여 디지털영상으로 변환하였으며, 골재생부에서 무작위로 추출한 6개의 점 (고밀도 3부위, 저밀도 3부위)의 방사선 밀도를 영상분석기(OPTIMAS, version 6.51.199, Media Cybernetics, L.P., USA)를 이용하여 흑화도(Gray level)를 평균하였다. 또한 획득한 이미지에 결손부의 원래 면적과 새로 재생된 부위의 외형을 잡아 재생면적의 비율을 계산하였다(% Bone fill).

## 2.6 조직형태학적 분석

Soft x-ray 촬영 후, 각 시료의 절반을 조직학 및 조직형태학적 분석을 위해 처리하였다. 각 조직은 10% buffered formaldehyde에 고정하였으며, 10% formic acid로 탈회하였다. 시상봉합에 직각으로 골 결손부의 적도를 포함하여 양 부위를 trimming한 후 파라핀에 포매하였다. 블록을 4 $\mu$ m 두께로 절단한 후 헤마톡실린-에오진(H&E)과 Masson Trichrome(MT) 염색을 하였다. MT염색을 시행한 슬라이드 영상은 ArtiScan 4000TF (Microtek, USA)으로 영상주사한 후, SPOT(version 4.6, Diagnostic Instrument, Inc, USA)으로 화상화 하였다. 골 결손부와 신생골 형성부의 길이를 OPTIMAS 소프트웨어 프로그램을 통해 분석하였고, 결손 재생부의 %길이, 결손부의 신생골 형성 면적과 잔존 Hydrogel의 면적을 구하였다.

## 2.7 ALP 활성도 및 Ca/PO<sub>4</sub>정량

Soft x-ray 촬영 후, 조직학 및 조직형태학적 분석을 위해 균별로 개체의 절반을 할당하고 남은 나머지 개체를 ALP

활성도 및 Ca/PO<sub>4</sub>정량분석에 이용하였다. 8mm 직경의 원형 결손부를 수술용 가위로 절단하고 골수와 혈액을 제거하기 위해 phosphate-buffered saline (PBS)에 담구어 4°C에서 overnight 한 후, 1ml의 extraction buffer <25mM NaHCO<sub>3</sub> (pH 7.4), 0.01% Triton X-100 in PBS>로 4°C, 72시간 동안 단백질을 추출하였다. 불용성 물질을 제거하기 위해 4°C, 13,000rpm, 10분 동안 원심 분리한 다음 동결건조기(Labconco, USA)에 넣어 overnight한 후 정밀저울을 사용해 건조중량을 측정하였다.

### 2.7.1 ALP 활성도 분석

ALP 활성도는 paranitrophenyl phosphate (pNPP)로부터 p-nitrophenolate의 시간 의존적인 형성에 의해 측정 (405nm에서 빛의 최대 흡수)되는 ALP kit (QuantiChrom™ alkaline phosphatase assay kit, Bioassay Systems, CA, USA)를 사용하였다. 96 microtiter plate well에 뼈 추출물 30 $\mu$ l를 첨가하였다. 반응을 시작하기 위해 샘플 well에 전체 반응양이 200 $\mu$ l가 되도록 working solution (Assay buffer, pH 10.5, 5mM Mg acetate, 10mM pNPP)을 신속히 첨가하고 잘 섞어주었다. 405nm에서 초기 흡광도와 4분 경과후 흡광도를 microtiter plate reader (Powerwave X340, Bio-Tek instruments, VT, USA)를 이용하여 측정하였다. ALP 활성도는 Units(U)/mg 뼈 건조중량으로 계산하였으며, 1 U는 실온에서 1분당 기질 1 $\mu$ mol의 산물로의 전환으로 정의하였다.

### 2.7.2 칼슘과 인산의 정량분석

칼슘과 인산의 정량측정은 상용 kit (QuantiChrom™ Calcium, Phosphate assay kit, Bioassay Systems, CA, USA)를 사용하여 분석하였다. 건조된 뼈를 회화로에 넣어 700°C, 2시간동안 회석재가 될 때 까지 태워 칼슘과 결합한 유기물 성분을 제거하였다. 회화가 끝난 시료는 6N 염산 3ml를 넣어 4°C overnight 시킨 다음, Whatman paper #1로 filtering 하였다. 칼슘양은 10배로 희석한 시료 5 $\mu$ l를 96-well plate에 첨가하고 working reagent 200 $\mu$ l 첨가후 실온에서 3분간 반응시켰으며 612nm에서 흡광도를 microtiter plate reader (Powerwave X340, Bio-Tek instruments, VT, USA)를 이용하여 측정하였다. 인산양 측정을 위해 100배 희석한 시료 50 $\mu$ l를 96-well plate에 첨가하고 Reagent 100 $\mu$ l 첨가후 실온에서 30분간 반응시키고 광밀도 620nm에서 흡광도를 측정 한 후 여러 standard의 농도를 비교하여 샘플의 농도를 산출하였다.

## 2.8 통계학적 방법

조직형태학적, 방사선학적, 정량적 분석을 통해 얻은 결과는 Stat View II program (version 5.01, The SAS Institute, USA)을 이용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) test로 통계 분석하였다. 유의성 있는 결과가 관찰되면 a

pairwise multiple test (Fisher's PLSD)를 이용하여 각 군을 비교하였다. p-value가 0.05 이하일 경우 유의성 있는 차이로 간주하였다.

### Ⅲ. 연구 성적 및 결과

#### 3.1. 실험 동물과 실험 술식

모든 동물은 수술 직후 회복되었으나 mmp HA-BMP군에서 2마리, HA군에서 2마리가 수술 후 사망하였다. 따라서 각 군의 실험동물은 다음과 같은 개체수를 보였다: n=12(mmp HA-NP-BMP군), n=10(mmp HA-BMP군), n=12(mmp HA-NP군), n=10(mmp HA군). 수술 후 4주 동안 창상의 감염이나 예상치 못한 조직반응은 발견되지 않았으며, 시편 채취시 흡수가 진행되고 일부가 남아있는 hyaluronic acid의 잔존을 육안으로 확인할 수 있었다.

#### 3.2. 방사선학적 분석 (광농도 분석)

각 군의 Soft X-ray영상 분석에서는 광농도에 의해 mmp HA-NP-BMP군에서는 전체 12개의 개체중 8개에서, 그리고 mmp HA-BMP군에서는 10개중 1개에서만 골형성이 관찰되었고, mmp HA-NP군에서는 12개중 7개, mmp HA군에서는 골형성이 관찰되지 않았다(Fig. 2). 따라서 광밀도와 %bone fill은 방사선 사진상에서 골형성이 인지되는 개체에서만 시행되었다. 통계적 분석 결과, 골 재생부에서 임의로 선정된 6 점에서의 평균 방사선밀도는 광밀도에 있어서 mmp HA-NP-BMP군( $90.056 \pm 7.297$ )이 제일 높았으나 mmp HA-BMP군( $68.800 \pm 9.728$ )에 비해 유의할 만한 차이를 보이지 않았으며, mmp HA군에 비해서는 현저히 높았다(Fig. 3).

mmp HA-NP-BMP군의 bone fill이 가장 높았으며 ( $30.678 \pm 4.691\%$ ), 그 다음으로는 mmp HA-NP 군이었다( $22.005 \pm 4.453 \text{ mm}^2$ ). mmp HA군도  $20.114 \pm 3.918\%$ 로 나왔으며, 전체 군간에 유의한 차이는 없었다(Fig. 4).

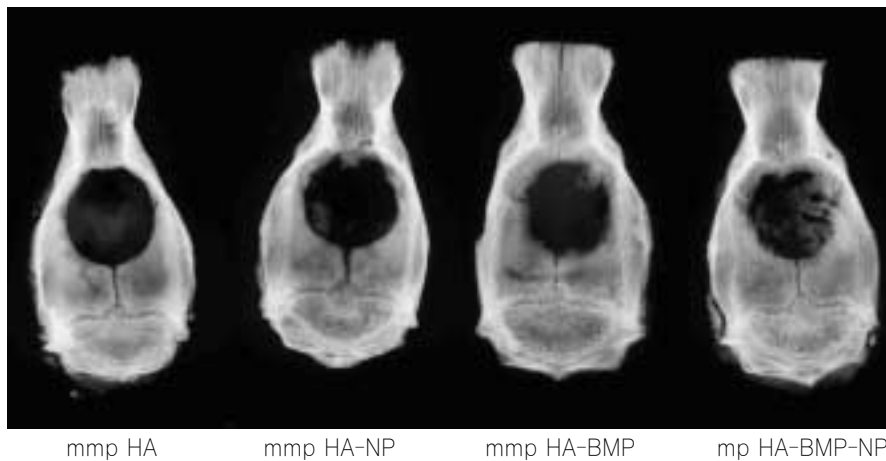


Fig. 2. Images of the Soft x-ray. Some new bone formation can be seen in the center area of CSD defect from mmp HA-NP-BMP and mmp HA-NP group.

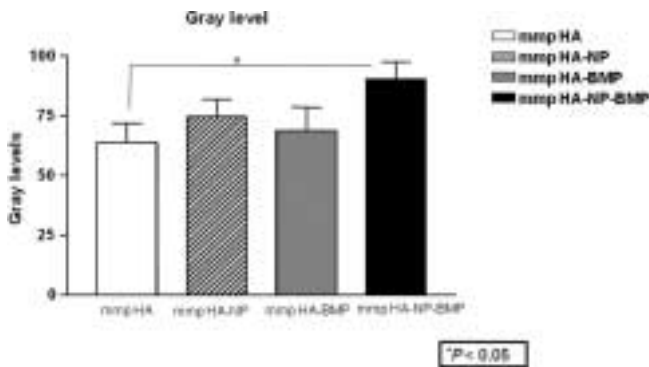


Fig. 3. Comparison of the radiodensity, the gray level in the regenerated bone area. mmp HA-NP-BMP group has higher bone density than mmp HA group with statistical significant differences.

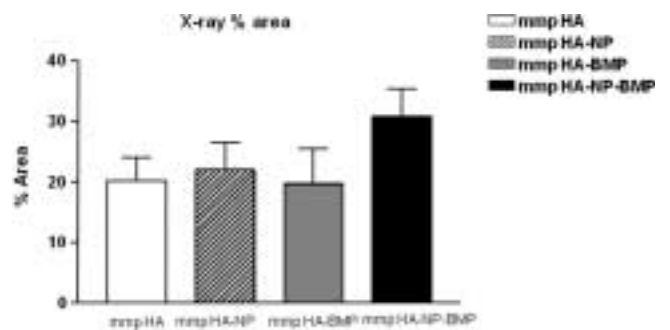


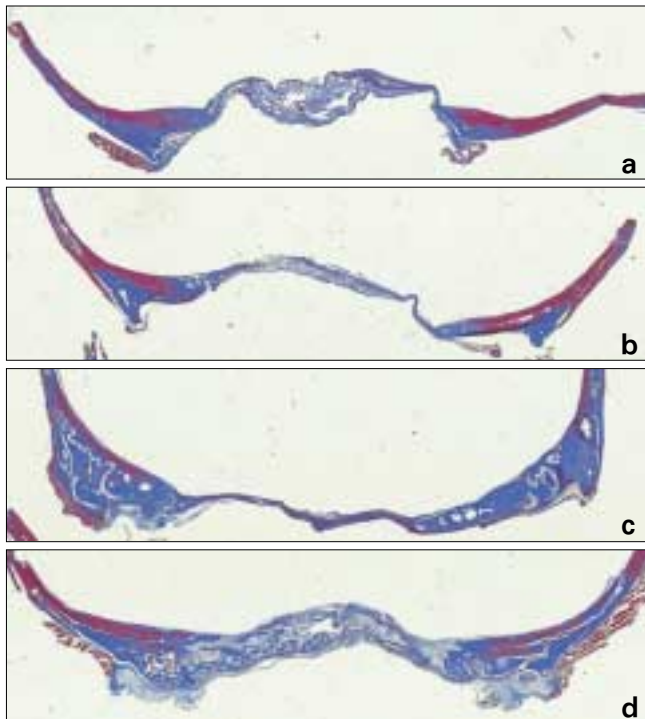
Fig. 4. Bone regeneration area of bone defect. mmp HA-NP-BMP group has more bone regeneration area than other groups. But there were no statistical significant differences between the groups.

### 3.3. 조직학 및 조직형태학적 분석

mmp HA-NP-BMP군에서 다량의 신생골 형성이 관찰되었다(Fig. 5). 동물을 희생시킬 시 육안적으로는 골형성이 미미한 것으로 관찰되었으나, 현미경상에서는 이식체 계면을 따라서 신생골이 형성되고 있었다. 그리고 hyaluronic acid base의 scaffold는 상당부분이 잔존하고 있었으며, 특이한 것은 이식체가 전반적으로 흡수되는 것보다는 fragmentation되면서 이것들 사이사이로 신생골이 형성되는 양상이었다.

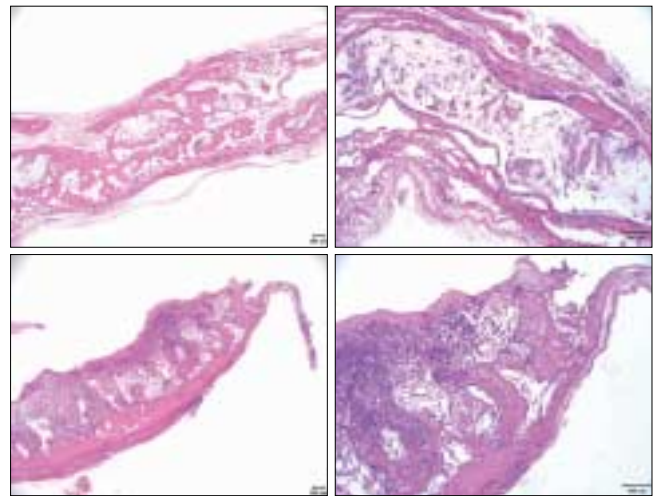
각 군의 H/E 염색표본에서도 mmp HA-NP-BMP군에서는 비교적 골형성이 잘되어 있으나, hyaluronic acid의 잔존은 여전히 관찰되고 있다(Fig. 6). mmp HA-BMP군에서는 신생골 형성이 미약하였으며, 역시 잔존하는 scaffold도 관찰되었다(Fig. 7). mmp HA군에서는 골형성이 관찰되지 않았고, scaffold가 많이 잔존하고 있었다(Fig. 8).

각 군에서 new bone length% 와 new bone formation area ( $\text{mm}^2$ ) 및 잔존 HA 면적분석에서는 조직형태학적으로 mmp HA-NP-BMP군에서 골재생이 제일 높게 관찰되었으며(new bone length%:  $18.582 \pm 11.635\%$ ), mmp HA-BMP군에서는 골형성이 관찰되지 않았다( $0.000 \pm 0.000\%$ ). mmp

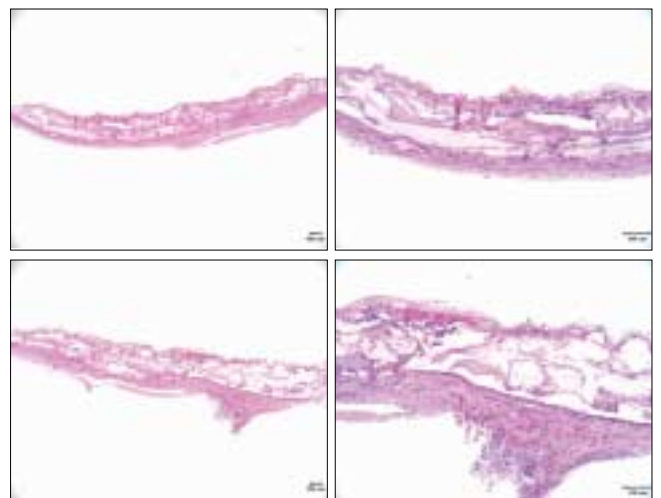


**Fig. 5.** Histological image of bone regeneration in defect (MT staining, from above) (a) mmp HA, (b) mmp HA-BMP, (c) mmp HA-NP and (d) mmp HA-NP-BMP group, x10 magnification with full specimen image). New bone formation through fragmentation of hydrogel can be seen in mmp HA-NP-BMP group. There is no new bone formation in center of defect in other groups.

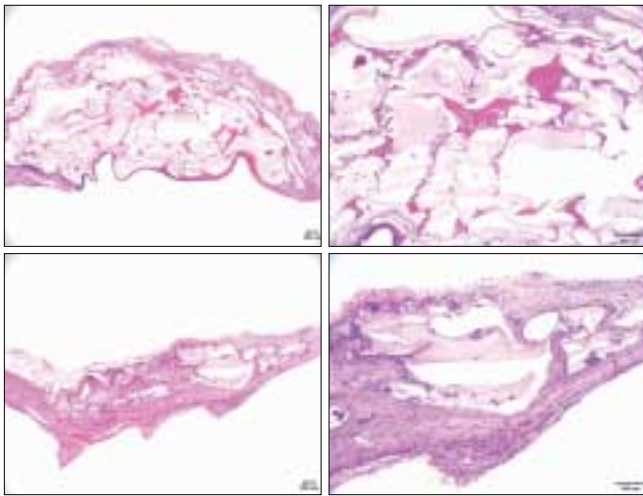
HA군과 mmp HA-NP군에서도 골 변연에 한정된 골 재생이 관찰되었다( $10.272 \pm 5.177\%$ ;  $11.033 \pm 7.528\%$ ). 골형성 면적은 mmp HA-NP-BMP군이 제일 많았고( $0.308 \pm 0.196 \text{ mm}^2$ ), mmp HA-BMP군에서는 골형성이 아주 미미하였다. 골결손부 절단면에서 상당 부분의 hyaluronic acid 이식체가 남아 있었는데 이것의 면적은 mmp HA-NP-BMP군에서  $0.692 \pm 0.230 \text{ mm}^2$ , mmp HA-BMP군에서는  $0.656 \pm 0.428 \text{ mm}^2$ , mmp HA-NP군은  $0.614 \pm 0.273 \text{ mm}^2$  그리고 mmp HA군에서는  $0.327 \pm 0.169 \text{ mm}^2$ 이었다(Table. 2, Fig. 9-11).



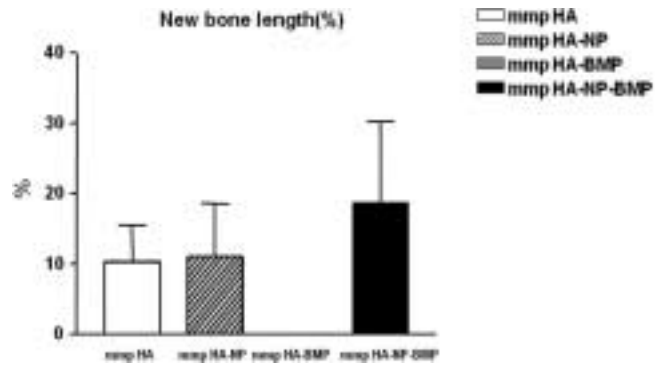
**Fig. 6.** H/E staining histological images of mmp HA-NP-BMP group (Left side: x40 magnification, Right side: x100 magnification). There is new bone formation along margin of grafted materials with homogeneous fragmented degradation of hyaluronic acid scaffold.



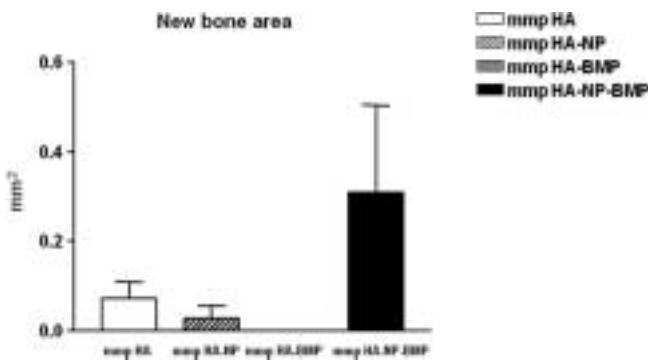
**Fig. 7.** H/E staining histological images of mmp HA-BMP group (Left side: x40 magnification, Right side: x100 magnification). There is little new bone formation along margin of grafted materials, but homogeneous fragmented degradation of hyaluronic acid scaffold is seen similarly to mmp HA-BMP-NP group.



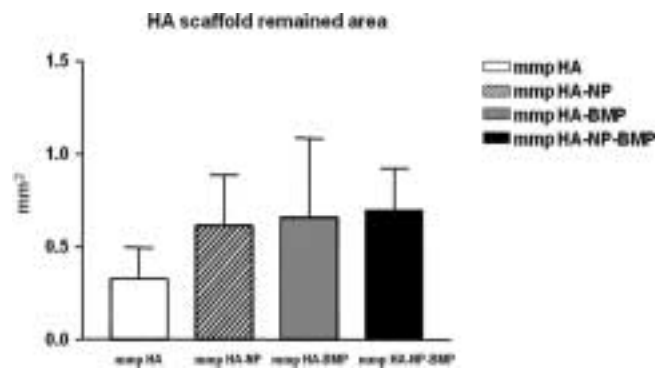
**Fig. 8.** H/E staining histological images of mmp HA group (Left side: x40 magnification, Right side: x100 magnification). There is no new bone formation along margin of grafted materials with more homogeneous fragmented degradation of hyaluronic acid scaffold.



**Fig. 9.** New bone length(%) analysis. Histomorphometrically, mmp HA-NP-BMP group has higher tendency of bone regeneration length in defect area than other groups.



**Fig. 10.** New bone area(mm<sup>2</sup>) analysis. mmp HA-NP-BMP group has higher tendency of new bone formation area in defect area than other groups.



**Fig. 11.** HA scaffold degradation analysis. Histomorphometrically, although mmp HA group showed high level of hyaluronic acid gel resorption, there is no statistical significance among all groups.

**Table 2.** Bone regeneration length, new bone formation area, remained mmp HA area.

Group	N	% length	Area (mm <sup>2</sup> )	remained mmp HA area
mmp HA	5	10.272 ± 5.177	0.072 ± 0.037	0.327 ± 0.169
mmp HA-NP	6	11.033 ± 7.528	0.028 ± 0.028	0.614 ± 0.273
mmp HA-BMP	5	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.656 ± 0.428
mmp HA-NP-BMP	6	18.582 ± 11.635	0.308 ± 0.196	0.692 ± 0.230

(there is no statistical significant differences among all groups.)

### 3.4. Dry weight, ALP 및 Ca/PO<sub>4</sub>정량

#### 3.4.1 Dry weight

각 샘플의 건조무게는 mmp HA-NP-BMP군(7.10 ± 2.83 mg), mmp HA-NP군(5.72 ± 0.93 mg), mmp HA군(2.74 ± 0.66 mg), mmp HA-BMP군(1.40 ± 0.24 mg) 순서이었다(Table. 3).

mmp HA-NP군 중에서 연조직이 다소 많이 부착되어 있던 2개체를 배제한 후 다시 통계분석을 하였어도(4.45 ± 0.72 mg)군 간의 순서에는 차이가 없었다. 이는 예상대로 mmp HA-NP-BMP군의 건조무게가 가장 높았으나, mmp HA-BMP군이 mmp HA-NP군 보다 낮은 건조증량을 보였다.

### 3.4.2 ALP 활성도

Biom mineralization의 과정상 중요한 효소중 하나인 ALP는 값이 높을수록 인산함유 substrate의 hydrolysis를 증진시켜 orthophosphate를 형성하고 칼슘흡수를 증가시키므로 골재생의 좋은 지표가 될수 있다.<sup>17,18)</sup> ALP 활성도는 mmp HA-NP 군과 mmp HA-NP-BMP군이 다른 군에 비해 높았으나, 통계적 차이를 보이지는 않았다(Fig. 12).

### 3.4.3 칼슘과 인산의 정량분석

칼슘 정량(Ca content)은 mmp HA-NP-BMP군이 mmp HA-BMP군에 비하여 통계적으로 유의하게 증가되어 있었다. 하지만 인산 정량(Pi content)은 mmp HA군과 mmp HA-NP군이 MMP HA-BMP군에 비하여 유의하게 증가되어 있었다(Fig. 13).

## IV. 총괄 및 고찰

본 연구에서는 조직공학적 골재생을 위한 여러가지 시도 중 특히, 성장유도인자의 조절되면서도 서방형 방출이 가

능한 지지체를 통한 골재생을 평가해 보고자 하였다.

지지체를 개발하기 위한 여러가지 시도중 적절한 생체적 합성과 저분자량에서의 좀 더 활성화되는 신생혈관화 작용등의 효용성으로 hyaluronic acid는 조직공학적 골재생에서 많이 이용되어 지고 있다.

또한, 지지체로서의 생물학적 물성과 조직공학적 효용성을 더욱 강화하기 위해 amino기, aldehyde기 또는 methacrylate기를 이용한 화학적 기능변화로 좀더 안정적인 cross-linked network를 형성하는 시도도 이루어 지고 있다.

골재생능뿐 아니라 지지체의 적절한 분해능도 조직개조와 재생에 있어서 중요한 요소가 될수 있으며, 조직재생능에 따라 지지체의 분해능이 적절히 조절되는 것이 이상적인 stimulus responsive degradation의 요건이 될 것이다.

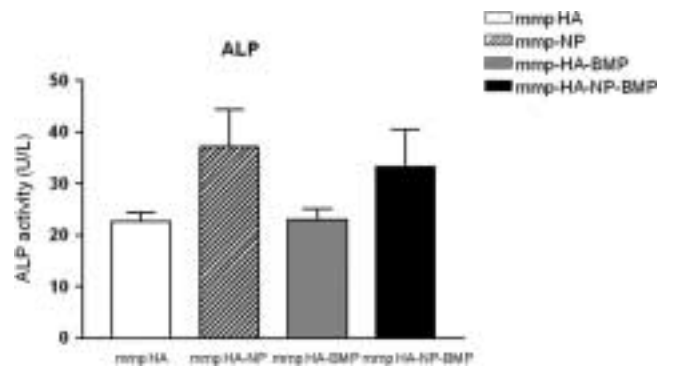
본 실험에 사용된 MMP-sensitive 펩티드를 가교제로 가지는 Hyaluronic acid based hydrogel은 조직에서 분비되는 hyaluronidase에 의해 분해되거나 또는 세포에서 분비되는 MMP에 의해 기능화된 MMP-sensitive 펩티드 가교제가 분해되는 기전을 가지고 있다.

Hyaluronic acid-based hydrogel은 자체의 에스테르 결합

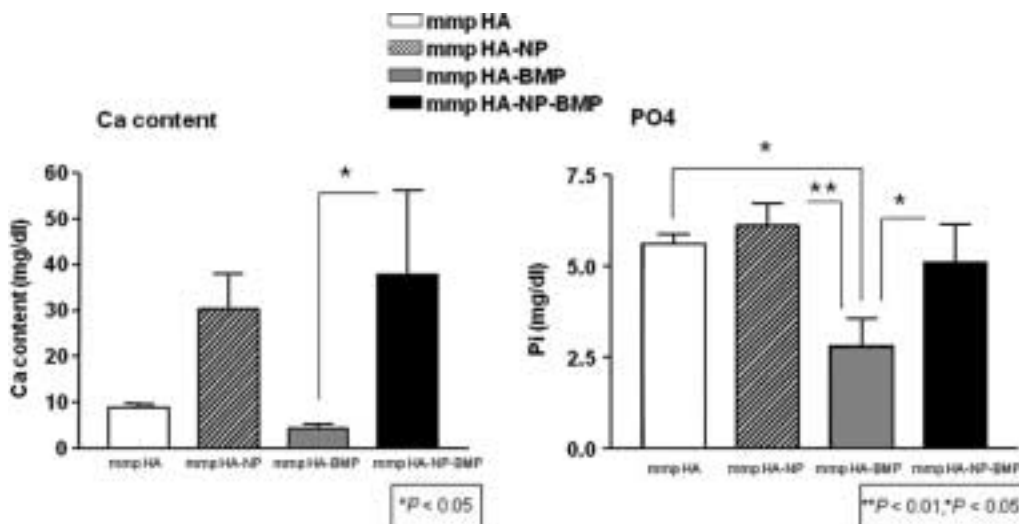
**Table 3.** Dry weight of regenerated tissue within the critical size defect.

Group	N	Dry weight (mg)
mmp HA	5	2.74 ± 0.66
mmp HA-NP	6	5.72 ± 0.93
mmp HA-BMP	5	1.40 ± 0.24
mmp HA-NP-BMP	6	7.10 ± 2.83

(there is no statistical significant differences among all groups.)



**Fig. 12.** Quantification of alkaline phosphatase(ALP) activity of regenerated tissue.



**Fig. 13.** Quantification of Ca/PO<sub>4</sub> of the regenerated tissue.

때문에 가수분해에 의해 느리게 분해되지만, *in vitro* 실험에서 24시간 이내에 50 U/ml의 hyaluronidase에 의해 젤의 분해와 collagenase에 의해 MMP sensitive 펩티드 가교제의 분해를 보이기도 하였다<sup>12)</sup>.

최근에는 다당류-기능화 나노입자 및 수화젤 담체를 포함하는 복합체와 이를 포함하는 서방형 약물전달체체나 골대체, 충전제등의 연구가 조직공학적 골재생을 위해 활발히 시도되어 지고 있다.

이러한 복합체의 구조는 생분해성 고분자로 이루어진 코어(core)와 생체적합성 고분자 유화제로 이루어진 외부의 수화젤막, 그리고 이러한 코어와 수화젤막에 물리적으로 고정되어 있는 다당류를 포함하는 다당류-기능화 나노입자로 구성되어 있다. Core로는 D,L-락티드-co-글리콜리드, 락탄산, 글리콜산,  $\epsilon$ -카프로락톤등의 생분해성 고분자 polymer가 제시되고 있으며, 유화제 외부막으로는 poloxamer, poloxamine, 비닐 알코올등의 polymer가 시도되고 있다. 다당류-기능화 나노입자로는 heparin, alginate, hyaluronic acid, 키토산등이 선택되고 있으며 이들 다당류와 특이적으로 결합하고 있는 성장인자로 BMP나 TGF- $\beta$ , VEGF, FGF, PDGF등이 있다<sup>14-16)</sup>.

여러가지 조직공학적 골재생능 평가를 위한 표준 실험방법중 하나인 백서 두개골의 critical size defect(CSD) 모델을 이용한 이번 실험에서 방사선학적 광농도분석, 조직형태학적 계측분석과 ALP활성도 및 건조중량과 칼슘인산 정량분석을 통한 matrix mineralization 평가를 통해서 볼 때 다른 군에 비해서 mmp HA-NP-BMP군에서 상대적으로 우수한 골재생능을 보여 주고 있다. 또한 특별한 이물반응이나 염증반응 없이 우수한 신생골의 형성과 더불어 mmp HA 만을 사용한 실험군에 비해서 많은 잔존량을 보여주고 있어서 기능화된 mmp HA-NP-BMP군에서 서서히 분해가 조절되어지는 측면이 있음을 보여주고 있다.

신생골의 건조중량에 따른 칼슘과 인산량의 비율과 정량 분석을 통해 기질광화의 정도를 평가할 수 있으며, mmp HA-NP-BMP군이 상대적으로 높은 건조중량과 ALP활성도 및 칼슘/인산정량을 보여주면서 우수한 기질광화능을 나타내었다. 정상골조직의 건조중량과 칼슘/인산 정량분석치를 비교하면 mmp HA-NP-BMP군에서 얻어진 신생골조직의 성숙도를 가늠할 수 있으리라 여겨진다.

기존의 백서 CSD 모델상에서 BMP-지지체에 의한 골재생능에 대한 몇몇 실험에서는 8주 이내에 골결손부의 완전한 재생능을 보고하고 있고, BMP의 투여량과 줄기세포등의 조합여부에 의한 각기 다른 결과를 보여주고 있다<sup>16,19)</sup>. 또한 BMP의 glycosylation에 의한 용해도 조절로 기질내의 BMP-2의 장기간 유지상태와 그에 따른 강화된 골재생능도 보고되고 있다<sup>20)</sup>.

그리고, 조직공학적 연구에서 줄기세포의 분화유도체나 세포나 성장인자의 지지 및 전달체로서 hyaluronic acid-based hydrogel의 가능성도 제시되고 있다<sup>9,10)</sup>.

요약하건대, 이번 연구를 통해서 BMP-2에 의한 신생골의 remodeling 과정이 기능화된 MMP 감응성 하이알루론산 수화젤-나노입자 복합체에 의해 유의하게 강화되었으며, 이 지지체를 통해서 광화되고 성숙된 신생골조직의 발생을 방사선 광농도분석, 조직계측학적 분석과 골기질의 정량분석을 통해 확인하였으며 이는 새로운 골결손 대체제로서의 가능성을 시사하고 있다고 생각되어 진다.

또한, 향후 MMP sensitive HA based hydrogel-nanoparticle 복합체의 기능을 극대화하기 위한 줄기세포나 성장유도인자의 적절한 조합을 찾는 부가적인 연구가 필요하리라 사료되었다.

## V. 결 론

본 연구에서는 백서 두개골 결손부의 골재생 실험에서 MMP sensitive Hyaluronic Acid based Hydrogel, Nanoparticle 그리고 2 $\mu$ g의 rhBMP-2를 조합하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 4주 기간 동안 mmp sensitive HA scaffold가 분절형태로 분해되어 양호하게 흡수되는 조직학적 소견이 관찰되었으며, 염증이나 이물반응 등은 관찰되지 않았다.
2. mmp HA-NP-BMP군에서 조직학적으로 뚜렷한 골 형성이 관찰되었으나, mmp HA-BMP군은 상대적으로 골 형성이 현저하게 이루어지지 않은 상태였다.
3. 이는 나노입자가 scaffold의 흡수에 따른 rhBMP-2의 용해도를 적절히 조절하여 서방출의 기능성도 있지만, BMP의 incorporation processing상의 영향도 고려해 볼 필요가 있을 것이다.
4. 동일한 HA based transplant를 이용하여 좀 더 장기적인 기간의 동물실험을 추가하여 젤의 흡수 진행에 따른 나노입자의 효과를 고찰해 보는 것이 필요할 것이며 아울러 MMP sensitive HA hydrogel의 흡수가 좀더 빠르게 제조하는 방법도 좀 더 연구되어야 할 것이다.
5. 위 실험결과를 볼 때 골재생에 있어서 BMP의 전달체 및 비계체로서 MMP sensitive HA based hydrogel-nanoparticle 복합체가 유효하게 사용되어 지리라 생각되었다.

## 참고문헌

1. Geiger M, Li RH, Friess W. Collgen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:1613-29.
2. Sakiyama SE, Hubbel JA. Development of fibrin derivatives for controlled release of heparin-binding growth factors. *J Control Release* 2000;65:389-402.
3. Kim HD, Valentini RF. Retention and activity of BMP-2 in hyaluronic acid-based scaffolds in vitro. *J Biomed Mater Res* 2002; 59:573-84.
4. Saito N, Okada T, Horiuchi H, Ota H, Takahashi J, Murakami M, et al. Local bone formation by injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 contained in polymer carriers.



- Bone 2003;32:381-386.
5. Laurent TC, Laurent UB, Fraser JR. Functions of hyaluronan. *Ann Rheum Dis* 1995;54:429-32.
  6. Entwistle J, Hall CL, Turley EA. HA receptors: regulations of signaling to the cytoskeleton. *J Cell Biochem* 1996;61:569-77.
  7. Ladeda V, Ghiso JA, E Bal de Kier Joffe. Function and expression of CD44 during spreading, migration, and invasion of murine carcinoma cell. *Exp Cell Res* 1998;42:515-27.
  8. Zhang S, Chang MC, Zylka D, Turley S, Harrison R, Turley EA. The hyaluronan receptor RHAMM regulates extracellular-regulated kinase. *J Biol Chem* 1998;273:11342-8.
  9. Kim JJ, Park YD, Tae GY, Lee KB, Hwang CM, Hwang SJ, et al. Characterization of low-molecular-weight hyaluronic acid-based hydrogel and differential stem cell responses in the hydrogel microenvironments. *J Biomed Mater Res A* 2009;88:967-75.
  10. Kim JJ, Kim IS, Cho TH, Lee KB, Hwang SJ, Tae GY, et al. Bone regeneration using hyaluronic acid-based hydrogel with bone morphogenic protein-2 and human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2007;28:1830-7.
  11. Lutolf MP, Lauer-Fields JL, Schmoekel HG, Metters AT, Weber FE, Fields GB, et al. Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: engineering cell-invasion characteristics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:5413-8.
  12. Kim JJ, Park YD, Tae GY, Lee KB, Hwang SJ, Kim IS, et al. Synthesis and characterization of matrix metalloprotease sensitive-low molecular weight hyaluronic acid based hydrogels. *J Mater Sci Mater Med* 2008;19:3311-8.
  13. Hong SR, Chong MS, Lee SB, Lee YM, Song KW, Park MH, et al. Biocompatibility and biodegradation of cross-linked gelatin/hyaluronic acid sponge in rat subcutaneous tissue. *J Biomater Sci Polym Ed* 2004;15:201-14.
  14. Chung YI, Tae GY, Yuk SH. A facile method to prepare heparin-functionalized nanoparticles for controlled release of growth factors. *Biomaterials* 2006;27:2621-6.
  15. Chung YI, Lee SY, Tae GY. The effect of heparin on the gelation of Pluronic F-127 hydrogel. *Colloid Surf A: Physicochem Eng Aspects* 2006;284:480-4.
  16. Chung YI, Ahn KM, Jeon SH, Lee SY, Lee JH, Tae GY. Enhanced bone regeneration with BMP-2 loaded functional nanoparticle-hydrogel complex. *J Control Release* 2007;121:91-9.
  17. Piattellie A, Scarano A, Corigliano M, Piattelli M. Effects of alkaline phosphatase on bone healing around plasma-sprayed titanium implants a pilot study in rabbits. *Biomaterials* 1996;17:1443-9.
  18. Hosseinkhani H, Hosseinkhani M, Khademhosseini A, Kobayashi H. Bone regeneration through controlled release of bone morphogenetic protein-2 from 3-D tissue engineered nanoscaffold. *J Control Release* 2007;117:380-6.
  19. Ahn SH, Kim CS, Suk HJ, Lee YJ, Choi SH, Chai JK, et al. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-4 with carriers in rat calvarial defects. *J Periodontol* 2003;74:787-97.
  20. Schmoekel H, Schense JC, Weber FE, Gratz KW, Gnagi D, Muller R, et al. Bone healing in the rat and dog with nonglycosylated BMP-2 demonstrating low solubility in fibrin matrices. *J Orthop Res* 2004;22:376-81.