

# 히알루론산이 골 형성에 미치는 영향에 관한 실험적 연구

조용민 · 민승기 · 김수남 · 유용욱\*

원광대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, 구강생화학교실\*

**Abstract** (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2002;28:216-225)

## THE EFFECT OF HYALURONIC ACID ON MOUSE CALVARIA PRE-OSTEOBLASTS OSTEOGENESIS IN VITRO

Yong-Min Cho, Seung-Ki Min, Soo-Nam Kim, Yong-Ouk You\*  
*Department of Oral & Maxillofacial Surgery, Dept. of Oral Biochemistry\*,  
School of Dentistry, Won-kwang University*

Hyaluronic acid (HA) is an almost essential component of extracellular matrices. Early in embryogenesis mesenchymal cells migrate, proliferate and differentiate, in part, because of the influence of HA. Since the features of embryogenesis are revisited during wound repair, including bone fracture repair, this study was initiated to evaluate whether HA has an effect on calcification and bone formation in an in vitro system of osteogenesis.

Mouse calvaria Pre-osteoblast (MC3T3-E1) cells were cultured in  $\alpha$ -MEM medium with microorganism-derivative hyaluronic acid that was produced by Strep. zooepidemicus which of molecular weight was 3 million units. The dosages were categorized in each 0.5, 1.0 and 2.0 mg/ml concentration experimental groups.

After 2 and 4 days cultures in experimental and control groups, the tendency of cell proliferation, MTT assay, protein synthesis ability, collagen synthesis and alkaline phosphatase activity were analysed and bone nodule formation capacity were measured with Alizarin Red S stain after 29 days cultures.

The cell proliferation was increased in time, especially the group of 0.5 and 1.0 mg/ml concentration of HA were showed prominent cell proliferation. After 2 and 4 days culture, experimental groups in general were greater cell activity in MTT assay.

The protein synthesis was increased in all experimental groups compared to control group, especially most prominent in 1.0 mg/ml concentration group. The collagen synthesis capacity were increased in HA experimental groups, especially prominent in 1.0 mg/ml group and the activity of alkaline phosphatase were increased, especially also prominent in 1.0 mg/ml group, compared to control group.

Above these, the activity of mouse calvarial pre-osteoblast cells was showed greater bone osteogenesis activity in all applied HA experimental group, especially group of 1.0 mg/ml concentration of HA.

**Key words** : Hyaluronic acid (HA), Mesenchymal cell, Pre-osteoblast, Bone osteogenesis

### I. 서 론

골 형성 (bone formation)이란 골조직이 구조적, 기능적으로 새롭게 되는 것을 의미하며, 이는 골조직 치유의 궁극적인 목표라 할 수 있다. 상실된 골조직 재생 (bone regeneration)을 위한 과거의 전통적인 치료방법으로는 자가골, 동종골, 이종골 및 합성 수지물로서 골 대체물들이 있으나 이 중 자가골 이식술이 면역학

적 관점에서 많이 사용되어 왔다. 그러나 자가골 이식술은 이차적인 골 공여부를 형성하여야 하며 이로 인한 술 후 감염, 술 후 불편감, 지연된 창상 치유 시간, 공여부의 한계성 등 여러 단점들이 있어 그 사용 여부가 제한적이다. 최근에는 많은 효과적인 골 조직 재생을 위하여 골 대체물등의 개발이 활발히 이루어지고 있으며 특히 골 전도 물질, 골 유도 물질 및 골원성 물질을 사용하여 골 조직 재생을 도모하고자 연구되고 있다<sup>1)</sup>.

알려진 바와 같이 골조직의 재생 폴리펩타이드로서 골형성 단백질 (bone morphogenetic protein)은 골조직으로 부터 추출되어 실험실에서 연구한 바 골 조직 형성에 관여한다는 검정을 받고 있다. 그러나 이들 물질의 대량 생산과정에서의 유전공학적 개발 방법이 아직 미흡함으로써 골조직 및 치조골 재생재료로서는 아직 임상에서 많이 응용이 되지 못하고 있는 실정이다. 폴리펩타이드 성장인자 중 혈소판유래 성장인자 (platelet-derived growth

#### 조 용 민

570-749, 전라북도 익산시 신용동 344-2

원광대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Yong-Min Cho

Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Won-Kwang Univ.

#334-2, Sinyong-Dong, Iksan-Si, Jeollabuk-Do, 570-749, Korea

Tel : 82-63-850-1922 Fax : 82-63-852-4939

E-mail : omsmin@wonkwang.ac.kr

factor; PDGF)에 관한 연구에서 Piche와 Graves는 골유래세포 배양시 PDGF를 첨가한 경우 세포의 증식율이 촉진되었다고 보고하였고, 인슐린유사성장인자 (Insulin-like growth factor)가 골 및 치주조직재생에 많은 가능성이 있음을 제시되기도 하였다<sup>2)</sup>. 그러나 이들 성장인자는 인체를 구성하는 모든 섬유아세포의 성장과 증식에 많은 영향을 미치게 되므로 특정조직의 재생에는 임상시술과정에 고도의 기술을 요하게 된다. 또한 이들 성장인자는 각종 종양조직에서 다량 발견되므로 임상적용에 있어 안정성 연구가 부족하고 부작용에 관해 명확히 규명되어 있지 않기 때문에 아직 연구단계에 있는 실정이다<sup>3)</sup>. 손상을 받거나 결손된 조직의 재생은 반드시 세포의 부착과 이주, 성장 및 분화 과정을 거쳐 필요로 하는 새로운 조직을 합성하게 된다.

세포의 기질 (extracellular matrix)은 세포의 활동을 조절하는 기능이 있으며 세포의 성장과 이동, 형태, 대사 등에 영향을 미친다<sup>4)</sup>. 다당류 글리코사미노글리칸 (Polysaccharide glycosaminoglycans, GAGs)은 교원질, elastin, fibronectin 등과 같이 접착성이 있는 단백질로 세포의 기질을 형성하며 히알루론산과 같이 겔상태를 형성한다<sup>4,5)</sup>. 히알루론산은 결합조직의 기저물질로 1934년 Meyer와 Palmer에 의해 소의 눈 초자체 (bovine vitreous)에서 처음 발견되었고 음이온의 뮤코 다당체 (polyanionic mucopolysaccharide)로써 생체 고 분자 물질이며 골세포에서도 세포의 기질 중 하나로 존재하는 것으로 알려져 있다<sup>6)</sup>. 1970년대초, Kvistand Finnegan<sup>7)</sup>, Tooleand Gross<sup>8)</sup> 등은 히알루론산이 모든 동물의 조직 액속에 다 존재하며 특히 태아기 초기에는 매우 풍부하다고 하였다. 특히 태아기에 장기 발달에 있어 중요한 역할을 담당한다고 하였으며 최근에는 여러 학자들이 창상 치유과정에서 히알루론산의 중요성을 연구 보고하였다.

1950년대초 Maurer과 Hudack<sup>9)</sup>는 골절된 장골 (long bones)의 치유과정에서 가골을 형성하는 초기 단계에서 상당한 양의 히알루론산이 합성되는 것을 보고하였다. 그 이후 히알루론산이 골 형성과정 (bone morphogenesis) 동안에 관련됨을 많은 연구자들이 보고한 바 있으며 1973년 Iwata<sup>10)</sup>와 Urist<sup>11)</sup>는 쥐의 탈회 동종골 피질골 기질을 근육내 이식하였을 때 이식 후 2일째 히알루론산의 농도가 가장 높았음을 보고하였으며 12일째 골수가 형성됨을 확인하였다. Liu 등<sup>12)</sup>은 조직공학적으로 교원 섬유들과 변형된 히알루론산의 공유결합체를 만들었으며 이러한 고유결합체인 collagen/hyaluronate matrix를 이용하여 쥐의 두개골 결손부에 이식하였을 때 술 후 4주 때에 조혈 골수강 형성 및 골 소강의 골세포들, 많은 골형성대 (reversal lines)등을 보이는 골 재생 scaffold를 형성하였고 활발한 골 전도능 (osteoconduction)을 나타내었다.

임상적으로 히알루론산은 퇴행성 관절염환자에서 관절기능 개선제와 안과수술시 안구의 형태를 유지하기 위한 안구수술 보조제, 안구 건조증 치료제, 서방출용 약물전달 담체 (matrix), 피부의 수분함량을 유지시켜주는 작용과 피부노화 억제효과가 있어 피부기능 개선제 등으로 응용되고 있다<sup>13)</sup>.

히알루론산은 근본적으로 생체 구성물질이기 때문에 생체적 합성과 생분해성이 뛰어난 것으로 알려져 있으며, 과거에는 태반, 동물의 눈과 관절, 닭의 비늘 등에서 추출되었으나, 현재는

미생물을 이용한 유전공학적 생산이 가능하여 이는 동물로부터 유발될 수 있는 감염성질환을 차단할 수 있는 기술의 발달로 생체 안정성이 높은 약물로 평가받고 있다<sup>14)</sup>. 또한 히알루론산은 여러 가지 조직의 치유를 증진시키는 능력이 있는 것으로 밝혀졌으나, 골조직의 재생도 증진시킬 것으로 기대되므로 히알루론산을 골조직 재생 촉진제로 개발할 수 있으리라 기대된다.

GAGs의 일종인 히알루론산은 조직형성과 재생과정에서 중요한 세포성분들의 활동을 조절하고 조직 공학적으로 이용할 때 쉽게 멸균 작업이 가능하고 생분해성 (biodegradable)이 쉬우며 일정한 형태의 모양이나 구조를 만들 수 있다는 장점들이 있다<sup>15,16)</sup>.

따라서 본 연구에서는 골조직 재생 촉진제 개발의 일환으로 히알루론산이 골 형성에 미치는 영향을 조사하고자 하였다. 본 실험을 위하여 마우스 조골모 유사세포인 MC3T3-E1 세포주에 히알루론산을 처리한 후, 골 형성 과정의 초기 세포 활성화 및 세포 분화에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 실험군에서의 세포증식 정도, 염기성 인산분해효소 활성도 측정, 콜라겐 합성과 골 형성 능력 측정 등을 검색하여 골 형성 과정의 촉진 정도를 연구하고 이를 토대로 상기 물질의 임상적 유용 가능성에 관하여 알아보 고자 한다.

## II. 실험 재료 및 방법

### 1. 세포배양

골기질 단백을 만들어 내고 광화시킬 수 있는 생쥐 두개골의 조골유사세포 (mouse calvaria pre-osteoblasts, MC3T3-E1) 세포를 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA)과 1% 항생제 (Penicillin G sodium 10,000 units/ml, Streptomycin sulfate 10,000 µg/ml and Amphotericin B 25 µg/ml in 0.85% saline, Gibco, USA)가 첨가된  $\alpha$ -Minimum Essential Medium ( $\alpha$ -MEM, Gibco, USA) 2 ml이 담긴 6-well plate에 적정 세포 ( $5 \times 10^4$  cell/well)를 분주하였다. 이를 37°C의 온도 및 100% 습도조건에서 95%의 공기와 5% CO<sub>2</sub>를 계속 공급하면서 배양하고 배양액은 세포가 충분한 증식이 일어날 때까지 2~3일 간격으로 교환하였다.

### 2. 히알루론산의 준비

말에서 추출된 streptococcus zooepidemicus균을 분자생물학적인 방법을 이용하여 주식회사 백택 (VaccTech, Daeduk South Korea)에서 히알루론산을 생산하였으며 이를 생화학적인 방법으로 분말화 하였고 이중 2g을 증류수 100 ml에 섞어 기준용액 (stock solution)을 만들어 농도별로 희석한 후 0.2 µm syringe filter (Nalgae company, USA)로 여과한 후 실험용으로 사용하였다.

### 3. 세포증식 측정

MC3T3-E1 세포가 배양접시에서 밀생에 도달하면 0.25% trypsin/EDTA로 분리하였다. 이 세포들을 배양액으로 현탁시키

고 6-well plate에  $2 \times 10^4$  개의 세포 수가 되도록 분주하였으며 24 시간 후 배양액을 제거하였다. 실험군에는 히알루론산을 각각 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml, 2.0 mg/ml 농도별로 첨가하였고 대조군에는 인산완충생리식염수만을 넣었다. 그 후 2, 4일 동안 배양한 후 세포 증식정도를 확인하기 위하여 혈구계수기를 이용하여 살아 있는 세포의 수를 계산하였다.

#### 4. MTT 분석

MC3T3-E1 세포를 0.25% Trypsin/EDTA로 떼어내어 혈구계수기로 세포 수를 세어 24-well plate의 각 well당  $2 \times 10^4$  개의 세포가 들어가도록 분주한 후 세포들이 부착할 수 있도록 1일간 5% CO<sub>2</sub>, 100% 습도의 37°C 배양기에서 배양한 후 부착되지 않은 세포를 제거하기 위해 배지를 교환하고, 실험군에는 히알루론산을 각각 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml, 2.0 mg/ml 농도별로 첨가하였고 대조군에는 인산완충생리식염수만을 넣은 후, 2, 4일 동안 배양하였다. 각각의 시간이 경과된 후 생리 식염수로 용해한 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide ; Sigma chemical co.) 용액 300  $\mu$ l씩을 각각의 well에 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 200  $\mu$ l의 DMSO (Dimethyl sulfoxide, Sigma, USA)를 첨가하여 형성된 formazan 결정을 용해시킨 후 96-well plate 상으로 옮겨서 ELISA analyser (Spectra MAX 250, Molecular Devices Co., USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며 매 실험마다 세포 활성도를 대조군에 대한 백분율로 산출하였고, 각각의 실험은 4회 반복 시행하였다.

#### 5. 단백질 합성능 측정

MC3T3-E1 세포를 직경 100 mm 배양접시에  $60 \times 10^4$  개의 세포를 분주하고, 세포들이 부착할 수 있도록 1일간 5% CO<sub>2</sub>, 100% 습도의 37°C 배양기에서 배양한 후 부착되지 않은 세포를 제거하기 위해 배지를 교환하고, 실험군에는 히알루론산을 각각 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml, 2.0 mg/ml 농도별로 첨가하였고 대조군에는 인산완충생리식염수만을 넣은 후, 2일간 배양하고, 인산완충생리식염수로 2회 세척하고 0.05% Trypsin/0.02% EDTA(Gibco, USA)로 처리하여 증식된 세포를 배양접시로부터 박리한 후, 1,500 rpm으로 6분간 원심분리한 다음 초음파분쇄기 (Ultrasonic Dismembrater Model-300, Fisher Scientific, USA)로 분쇄하고 다시 원심분리하여 상층액을 채취하고 Bio-rad protein assay용 dye reagent와 반응시켰다. Vortexing하여 실온에서 5분간 방치한 후 분광측정기 (Beckman DU-650, USA)로 595nm에서 흡광도를 측정하고 Bovine serum albumin을 이용하여 작성한 표준곡선을 기준으로 총단백질량을 산출하였다.

#### 6. 교원질 합성량 측정

MC3T3-E1 세포의 총 교원질량을 간접적으로 측정하기 위하여 hydroxyproline의 함량을 측정하였다. 각각의 세포내의 hydrox-

ypoline의 측정은 Rojkind등(1979)의 방법을 변형하여 실시하였다. 각각의 세포를  $60 \times 10^4$ 의 세포수로 60 mm plate에 분주한 후, 세포들이 부착할 수 있도록 1일간 5% CO<sub>2</sub>, 100% 습도의 37°C 배양기에서 배양한 후, 10% FBS, 1% 항생제, 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid, 10 mM Sodium  $\beta$ -glycerophosphate가 첨가된  $\alpha$ -MEM에 실험군에는 히알루론산을 각각 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml, 2.0 mg/ml 농도별로 첨가하였고 대조군에는 인산완충생리식염수만을 넣은 후, 2일간 배양하였다. 각 세포는 trypsin-EDTA로 분리시켜 원심 분리한 후 상층액은 제거하고 3 ml의 6N HCl을 첨가하였다. 110°C에서 10~24시간 가수분해 시킨 다음 각 시료를 여과하고 시료는 duplication하여 100  $\mu$ l씩 취했다. 완전히 건조시킨 다음 methanol 50  $\mu$ l을 가하고 남아 있는 염산이 제거될 때까지 60°C에서 배양하고 1.2 ml 50% isopropanol을 넣어 남은 침전물을 용해하고, 200  $\mu$ l chloramin-T 용액과 섞어 10분간 방치하였다. 1.2 ml의 Ehrlich 반응 시약을 넣어 섞은 후, 50°C에서 90분간 배양한 다음 상온에서 식혔다. 교원질 합성량 측정은 standard curve (0.0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 1.5  $\mu$ g/ml)를 표준 지표로 하여 분광측정기로 558 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 7. 염기성 인산분해효소 측정

MC3T3-E1 세포를 6-well plate에  $60 \times 10^4$  cell/well이 되도록 분주한 후, 10% FBS가 첨가된  $\alpha$ -MEM으로 1일 동안 37°C, 100% 습도, 5% CO<sub>2</sub> 공기 혼합배양기에서 배양하였다. 1일 후 배지를 제거하고, 10% FBS, 1% 항생제, 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid, 10 mM Sodium  $\beta$ -glycerophosphate가 첨가된  $\alpha$ -MEM에 음성 대조군에는 인산완충생리식염수만을 첨가하였으며, 대조군에는 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml 및 2.0 mg/ml의 농도로 히알루론산을 첨가하고 각각 2일간 배양하였다. 일정 배양시간이 지난 후 배지를 제거하고, trypsin-EDTA로 세포를 분리시키고 1,500 rpm에서 6분간 원심 분리한다. 상층액을 제거하고 0.2 ml의 멸균된 증류수를 첨가하여 초음파 분쇄기로 현탁하였다. 각 세포 현탁액 0.1 ml에 0.1 M glycine NaOH buffer (pH 10.4) 0.2 ml, 15 mM의 p-nitrophenyl phosphate (p-NPP ; Sigma Diagnostics, USA) 0.1 ml, 0.1% triton X-100 0.1 ml과 멸균된 증류수 0.1 ml을 잘 혼합하여, 이 반응물을 37°C에서 30분간 배양하였다. 0.1 N NaOH를 0.6 ml 첨가함으로써 이들 반응을 중지시켰다. p-NPP의 가수분해는 410 nm 파장의 분광측정기(Beckman DU-650, USA)에서 흡광도의 차이로 나타나며, p-nitrophenol (p-NP ; Sigma Diagnostics, USA)을 기준 값으로 이용하였다. 각각의 측정치를 대조군에 대한 백분율로 환산하여 통계학적 유의성은 일원분산분석법 (ANOVA)을 이용하여 p<0.05 수준에서 분석하였다.

#### 8. 골 형성 능력 측정

시험관내 골 형성에 대한 히알루론산의 영향을 알아보기 위하여 MC3T3-E1 세포를 6-well plate에  $10 \times 10^4$  개의 밀도로 분주하고, 24 시간 후 배양액을 제거하고, 실험군에는 히알루론산을 0.1

mg/ml, 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml 및 2.0 mg/ml 의 농도로 첨가하고 대조군에는 인산완충생리식염수를 넣는다. 이 때 배양액으로는 10% FBS, 1% 항생제, 50 µg/ml ascorbic acid, 10 mM Sodium β-glycerophosphate가 첨가된 α-MEM을 사용한다. 골결절형성을 관찰하기 위하여 세포를 29일 동안 6-well plate에 배양하여 인산완충생리식염수로 2회 세척하고 실온에서 1시간 동안 0.1% Alizarin Red S (Sigma chemical co.)용액을 적용시킨 후 세포를 인산완충생리식염수로 충분히 세척한 후 위상차도립현미경으로 석회화 결절을 계수하였다.

### III. 실험 성적

#### 1. 세포 증식 측정

히알루론산이 골모세포의 증식에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 배양중인 MC3T3-E1 세포에 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml 및 2.0 mg/ml의 농도로 히알루론산을 첨가하고 2일 및 4일간 배양한 후 배양된 세포 수를 측정 한 결과, 2일군, 4일군 모두에서 대조군에 비하여 세포증식이 증가하는 양상을 나타내었다. 2일군에서는

**Table 1.** Cell proliferation in each experimental group after 2 or 4 days incubation. (Mean±S.D)(n=4)

Concentration (mg/ml)	0	2	4
0	2	2.40±0.21	5.37±0.93
0.5	2	3.14±0.21	7.68±0.56
1.0	2	2.68±0.19	7.31±1.26
2.0	2	3.24±0.19	6.94±1.82

Cell number (X10<sup>4</sup>)

**Table 2.** MTT assay was showed increased cell activity (percent of controls) in experimental groups after 2 and 4 days incubation (Mean±S.D.). It was great cell activity in relation to increasing concentration after 2 days incubation and active cellularity in 1.0 mg/ml concentration after 4 days incubation (n=4).

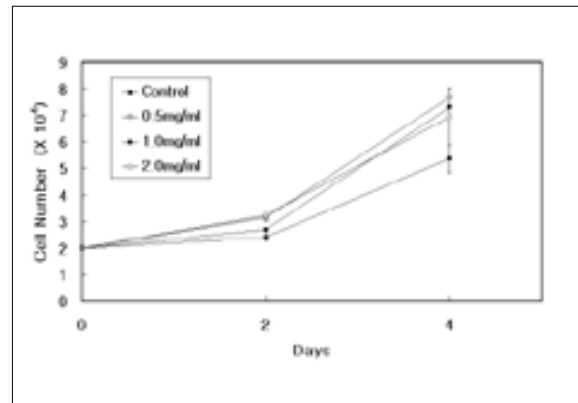
Concentration (mg/ml)	2	4
0	100.00	100.00
0.5	122.08±7.65	101.39±1.13
1.0	169.48±7.76	119.31±8.34
2.0	209.74±30.83	111.05±1.18

Percent of controls

비교적 고농도인 2.0 mg/ml의 농도에서 세포증식이 가장 증가하였으며, 4일군에서는 비교적 저농도인 0.5 mg/ml의 농도에서 최대증식효과를 나타내었다 (Table 1, Fig. 1).

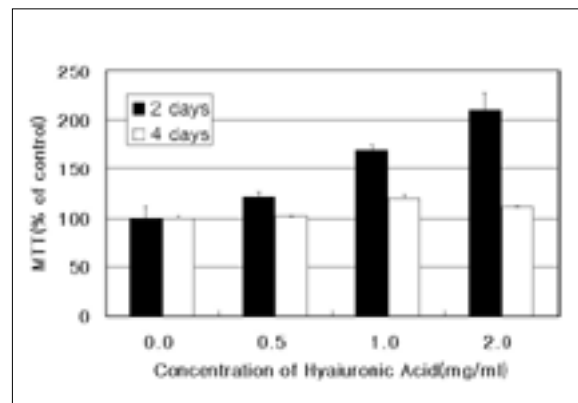
#### 2. MTT 분석

히알루론산이 골모세포의 세포활성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 배양중인 MC3T3-E1 세포에 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml 및 2.0 mg/ml의 농도로 히알루론산을 첨가하고 2일 및 4일간 배양한 후 MTT분석으로 세포활성을 측정 한 결과, 2일군, 4일군 모두에서 대조군에 비하여 세포활성이 증가하는 경향을 나타내었다. 2일군에서는 농도에 비례하여 세포활성이 증가하였으며, 4일군에서는 1.0 mg/ml의 농도에서 최대 활성을 나타내었다 (Table 2, Fig. 2).



**Fig. 1.** Effects of hyaluronic acid on proliferation of MC3T3-E1 cells.

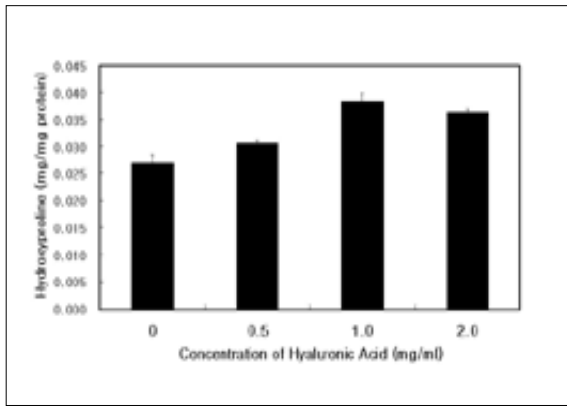
Cell numbers were counted by hemocytometer after 2 and 4 day incubation (Mean±S.D.). Vertical bars represent standard errors of four independent experiments.



**Fig. 2.** Effects of hyaluronic acid on cell activity (percent of controls) of MC3T3-E1 cells. MTT assay was performed after 2 and 4 day incubation (Mean±S.D.). Vertical bars represent standard errors of four independent experiments.

**Table 3.** The total protein in experimental groups were increased in relation to increasing concentration of hyaluronic acid after 2 days incubation (n=4).

Concentration (mg/ml)	Total Protein (Mean±S.D)
0	0.1020±0.0002
0.5	0.1067±0.0002
1.0	0.1206±0.0002
2.0	0.1119±0.0008



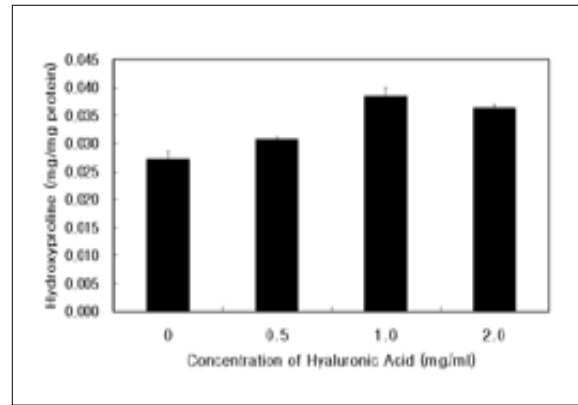
**Fig. 4.** Effects of hyaluronic acid on synthesis of collagen in MC3T3-E1 cells. The cells were incubated with or without hyaluronic acid (0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml 및 2.0 mg/m). The synthesis of hydroxyproline was estimated after 2 day incubation. Vertical bars represent standard errors of four independent experiments.

### 3. 단백질 합성능 측정

히알루론산을 처리한 실험군 모두에서 대조군보다 총 단백질 합성량이 증가하는 경향을 보였으며, 특히 히알루론산을 1.0 mg/ml 농도로 처리한 군에서 총 단백질의 합성량이 현저히 증가하는 경향을 보였다 (Table 3, Fig. 3).

### 4. 교원질 합성량 측정

히알루론산을 처리한 실험군 모두에서 대조군보다 교원질의 전 단계인 hydroxyproline 합성량이 증가하는 경향을 보였으며, 특히 히알루론산을 1.0 mg/ml 이상의 농도로 처리한 군에서 hydroxyproline 합성량이 현저히 증가하는 경향을 보였다 (Table 4, Fig. 4).



**Fig. 3.** Effects of hyaluronic acid on synthesis of total protein in MC3T3-E1 cells. The cells were incubated with or without hyaluronic acid (0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml 및 2.0 mg/m). The synthesis of total protein was estimated after 2 days incubation. Vertical bars represent standard errors of four independent experiments.

**Table 4.** The content of hydroxyproline was increased in experimental groups, especially 1.0 mg/ml concentration group was showed the most activation after 2 days incubation (n=4).

Concentration (mg/ml)	Content of hydroxyproline (Mean±S.D)
0	0.02714±0.0025
0.5	0.03071±0.0006
1.0	0.03845±0.0025
2.0	0.03637±0.00097

### 5. 염기성 인산분해효소 측정

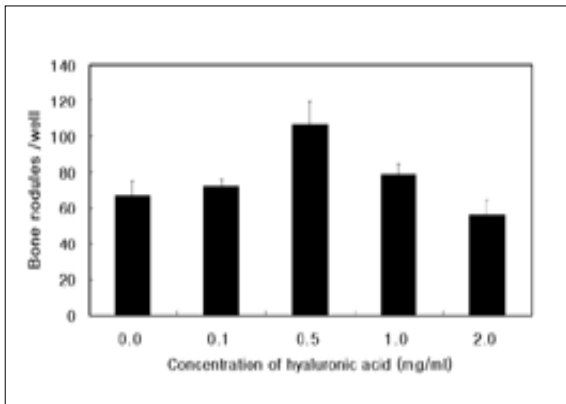
히알루론산을 처리한 실험군 모두에서 대조군보다 염기성인산분해효소 활성이 증가하는 경향을 보였으며, 특히 히알루론산을 1.0 mg/ml 이상의 농도로 처리한 군에서 염기성인산분해효소 활성이 현저히 증가하는 경향을 보였다 (Table 5, Fig. 5).

### 6. 골결절 형성 능력 측정

히알루론산을 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml 및 1.0 mg/ml 처리한 군 모두에서 대조군보다 골결절 형성이 증가하는 경향을 보였으며, 특히 히알루론산을 0.5 mg/ml 의 농도로 처리한 군에서 골결절 형성이 현저히 증가하는 경향을 보였다. 그러나 1.0 mg/ml 이상의 농도에서는 골결절 형성이 감소하였다 (Table 6, Fig. 6, 사진부도1).

**Table 5.** The activity of alkaline phosphatase was increased in all experimental group, especially prominent increasing in above 1.0 mg/ml concentration after 2 days incubation.

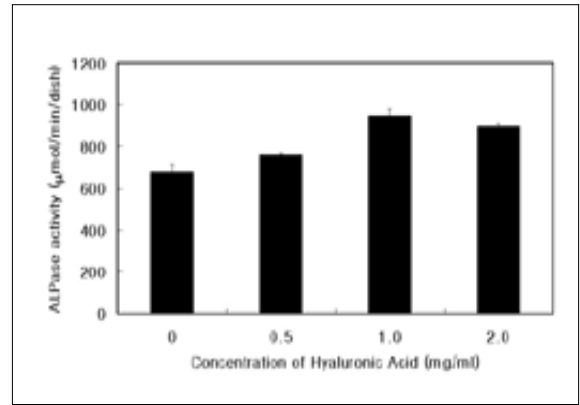
Concentration (mg/ml)	ALPase activity (Mean±S.D)
0	678.87±59.20
0.5	763.38±14.085
1.0	964.479±59.20
2.0	879.183±22.20



**Fig. 6.** Effects of hyaluronic acid on formation of bone nodules in MC3T3-E1 cells. The cells were incubated with or without hyaluronic acid (0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml and 2.0 mg/m). The formation of bone nodules was estimated after 29 day incubation. Vertical bars represent standard errors of four independent experiments.

#### IV. 총괄 및 고찰

결합조직의 세포의 기질 (extracellular matrix)은 글라이코시딕 결합에 의해 연결된 단백질 (glycosylated proteins)로써 프로테오글리칸 (proteoglycan), 뮤코폴리사카라이드 (mucopolysaccharide), 글리코사미노글리칸 (glycosaminoglycan), 펩티도글리칸 (peptidoglycan), 글리코프로테인 (glycoprotein) 등이 포함되는 데, 이들은 히알루론산이라는 결합력 있는 물질에 의해 서로 연결되어 하나의 군을 형성한다<sup>19</sup>. 구조적으로 히알루론산은 비황화 이당류 (disaccharide)의 연속된 구조로 D-글루쿠로닉산 (glucuronic acid)과 N-아세틸-D-글루코사민에 글루코시드가 연결된 수천의 다당 구조를 가지며 콘드로이친-4-설페이트, 콘드로이친-6-설페이트, 더마탄 설페이트 (dermatan sulfate), 헤파린, 헤파란 설페이트, 케라탄설페이트 등과 결합하여 글라이코사미노글리칸을 형성한다. 요소들은 공유결합에 의해 연결되지 않는 구조로 큰 분자량(1.0 to 3.0×10<sup>6</sup> Da vs. 0.02 to 5.0×10<sup>6</sup> Da)을 가지고 있으면서



**Fig. 5.** Effects of hyaluronic acid on alkaline phosphatase activity in MC3T3-E1 cells. The cells were incubated with or without hyaluronic acid (0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml and 2.0 mg/m). The activity of alkaline phosphatase was estimated after 2 day incubation. Vertical bars represent standard errors of four independent experiments.

**Table 6.** The formation of bone nodules was estimated after 29 day incubation.

Concentration (mg/ml)	Numbers of Bone Nodule(Mean±S.D)
0.0	67±8.49
0.1	72±4.24
0.5	107±12.73
1.0	79±5.66
2.0	56±8.49

수소결합에 의해 안정된 부정형 (random coil)형태를 이루고 있다<sup>19</sup>(Fig. 7).

히알루론산은 이와 같은 구조적 특성으로 인하여 많은 수분을 함유할 수 있으며 그 용액은 고농도 (1%이상)에서 높은 점탄성을 (viscoelasticity) 가지고 있고, 전단력에 대해서는 비뉴턴성유체 (non-Newtonian fluid)의 성질을 나타낸다. 즉, 낮은 전단력에서는 높은 점성을 가지며 마치 젤처럼 행동하고 높은 전단력에서는 낮은 점성을 갖는 대신 높은 탄성을 갖는 전형적인 전단박화 유체 (pseudoplastic fluid)의 특성을 가지고 있다<sup>20</sup>.

히알루론산은 세포막에서 형성되며 비황화 되어 자연스럽게 연결고리를 형성하여 세포 외 기저공간에 들어오며 세포 외 기질내에서 세포의 이주, 정착, 분화 등을 도와준다. 연 조직 치유 과정에 초기 염증 단계에서 제일 먼저 관계하며 염증 2일째 가장 많은 농도의 히알루론산이 존재한다고 Weigal등은 보고하였다<sup>21</sup>. 창상 치유과정에서 히알루론산의 역할에 관해서는 아직 정확히 밝혀지지 않았지만 많은 연구자들은 분명히 염증반응에 히알루

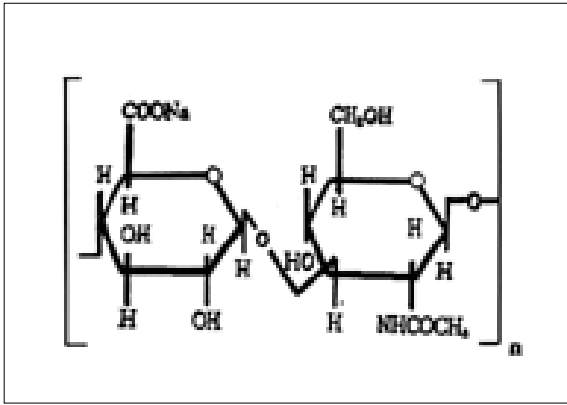


Fig. 7. 일반적인 히알루론산의 화학적 구조

론산의 풍부한 출현이 있으며 말단 호중구, 단구, 대식세포, 섬유모세포 등과 같이 일종의 부분적인 스카폴딩 (provisional scaffolding) 역할을 하지 않나 추측하고 있다. 이러한 덩어리들은 계속해서 연조직 창상 치유과정에서 신생혈관 형성 및 육아조직을 생산해 내고 있다<sup>22-24</sup>.

히알루론산은 창상 치유과정 초기에 창상내나 인접해 있는 세포에 나타나게 되지만 많은 양은 순환되는 혈액 공급에서 형성되고 농도가 증가하게 된다. 어떻게 해서 창상부위에 모이게 되는지는 아직 알려진 기전이 없지만 약 150에서 550 ng/ml 정도의 농도가 혈액 순환에서 직접 빠져나와 섬유기질 (fibrin matrix)를 형성하게 된다<sup>21,25</sup>.

또한 히알루론산은 기질적인 물리적 특성 외에 염증기 동안에 큰 분자량을 형성하면서 친수성 (hydrophilicity), 음이온 (polyanionic) 특성 등을 나타내어 염증 조절 역할을 하지만 확실한 기전은 규명되지 않았으나 임상적으로 경미한 항소염 작용을 나타낸다고 보고되어 있다<sup>26</sup>. 히알루론산은 백혈구를 자극하여 백혈구의 식균작용, 세포 부착, 세포로의 이주 (chemotaxis) 등을 촉진시키고 종양의 침투와 (tumor invasion) 세포 증식 (proliferation)을 촉진한다<sup>27</sup>. Weat와 Kumar 은 비교적 적은 무게의 히알루론산 분자(3-16 disaccharides)는 혈관내막의 증식을 촉진시키는 반면 고분자 무게의 히알루론산은 신생혈관 형성을 방해한다고 하였다<sup>28</sup>.

골 형성 과정의 초기 골모세포의 분화과정에서 골형성을 위한 기질이 형성된 뒤, 그 위에 무기질이 침착되어 골형성이 이루어지는 것으로 알려져 있는데, 무기질 침착에 필요한 인산염은 염기성인산분해효소와 같은 유기 인산염 분해효소에 의하여 생성되는 것으로 알려져 있다. 따라서 염기성인산분해효소는 골조직의 최종분화과정인 석회화 과정에 특이적으로 존재하는 표식자로 간주된다. 따라서 각 농도의 히알루론산이 골모세포의 최종분화과정인 석회화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 배양 중인 MC3T3-E1 세포에 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml 및 2.0 mg/ml의 농도로 히알루론산을 첨가하고 2일간 배양한 후 염기성인산분해효소 활성에 미치는 영향을 관찰하여 보았다. 본 연구에서 사용된 히알루론산은 미생물에서 추출된 것으로 약 300만 단위의 고분자량을 이용하였으며 골 형성의 초기 단계에서 세포 활성을 나

타내는 결과를 보였다.

연골내 프로테오글리칸과 제2형 교원질, 탄력섬유들은 물과 결합하여 연골의 점탄성을 나타낸다. 이러한 연골은 기본적으로 세포의 기질로 둘러 쌓인 연골세포로 구성되어 있으며 주 연골세포는 풍부한 교원섬유와 프로테오글리칸을 세포의 기질과 합성시키는 역할을 한다.

1993년 Sandbergs 등은 골이 손상되면 그 부위의 연조직, 혈병, 죽은 골 조각, 피사 골수들이 실활되어 가며 연조직이 재생과정을 거치는 것과 마찬가지로 여러 단계를 거쳐 골 조직의 재생이 일어남을 보고하였다<sup>29</sup>. 즉,

1. 혈액 응고 과정의 시작 (coagulation cascade)으로 염증세포 반응, 미분화 간엽 세포의 증식, 이주가 일어나는 염증기.
2. 골 조직 손상부위에서 육아조직이 형성되어 재형성과정을 나타내는 육아조직 형성기
3. Callus라는 가골로 육아조직이 대치되는 변환기
4. 성숙된 골 (lamellar bone)로 가골이 대치되며 이때 연골화 과정 (chondrogenesis) 과 연골내 골 (enchondral ossification)이 형성되는 골 형성기
5. 성숙된 골의 독특한 무기질 과정 (mineralization)이 일어나는 골의 재형성기 등으로 설명하였다.

Hjertquist와 Vejlens 등은 히알루론산이 장골 (long bone)내에 존재하며 전체 glycosaminoglycans의 3%를 차지한다고 하였다<sup>30</sup>. 또한 Chondroitin 4-sulfate 프로테오글리칸이 인체 골조직이나, 치아 경조직의 세포의 기질 대부분을 차지한다는 것은 이미 확인되었다<sup>31-33</sup>. 히알루론산의 합성과 분배, 변성과정 등은 세포의 기질에서 세포성 활동에 중요한 역할을 하므로 기질 세포들이 연골로 분화하는데 기여한다<sup>34</sup>.

히알루론산과 골 형성과정에 대해서 1904년 Pfaundler는 "Kalksalzfanger (lime salt catcher)" 라는 골화 과정에 관련된 칼슘이 다량 함유된 확인되지 않은 분자구조기 있음을 보고하였으며 이러한 칼슘 결합이 골화 과정의 중요하다고 하였다<sup>35</sup>. 그 후 1960년대 GAGs와 프로테오글리칸이 생물학적으로 골화 과정과 연관되어 있다고 가정하였으며 Cuervo 등이 1973년에 황화 프로테오글리칸이 응집되어 세포 실험에서 골 생성을 저해한다고 보고하였다<sup>36,37</sup>. 1976년 Howell과 Pita는 프로테오글리칸 농도와 크기가 연골화 과정이나 골화 과정에 매우 밀접한 관계가 있다고 하였으며 1985년에 Chen과 Boskey 등은 프로테오글리칸과 석회화 과정과 밀접하다고 강조하였고 세포와 동물실험에서 수산화인회석 형성을 제한하는 능력이 있다고 하였다<sup>38,39</sup>. 1991년 Boskey와 Dick는 히알루론산과 수산화인회석과의 상호 관계는 결정구조 증식 (crystal proliferation)과 성장에 방해하지 않는다고 하였으며 비황화 프로테오글리칸인 히알루론산은 무기질형성과정 환경을 매우 빠르게 제공한다고 하여 황기 (sulfate)가 무기질 형성 조절 역할 가능성을 보고하였다.

1999년 Liu 등<sup>19</sup>은 쥐의 두개골에 인위적인 골 결손부를 만들어 놓고 collagen/hyaluronant matrix를 제작하여 매식하였으며 슬후 4주에서 수술부위를 관찰한 결과 골 결손부의 조혈 골수강 형성 및 골형성대 (reversal line) 형성, 골 재생막 (bone regeneration

scaffold) 등이 형성됨을 보고하였다.

본 실험에서는 세포의 기질로써 비황화 프로테오글리칸으로써의 히알루론산에 대한 골형성 과정 (morphogenesis)의 초기화 단계인 골모세포 이주성 (cell migration), 세포 분화 (differentiation), 세포 부착 (adhesion) 등을 통한 세포 활성화 등을 알아보았다. 히알루론산을 투여한 실험군에서 그렇지 않은 대조군에 비하여 전반적으로 세포 활성화도가 증가되어 나타났으며 이러한 특성은 골형성 과정의 초기 골아세포 분화과정에서 히알루론산이 촉진제로써의 역할을 할 수 있다고 여겨진다. 골 결절 형성에 관한 본 실험에서는 배양 29일째 Alizan 염색에서 나타났는데 Pilloni 등은 배양 12일경에 골모세포로부터 분화된 골 결절들을 보고하였다<sup>40</sup>.

1999년 Liu 등은 쥐의 두개골에 인위적인 골 결손부를 만들어 놓고 collagen/hyaluronant matrix를 제작하여 매식하였으며 수술 4주에서 수술부위를 관찰한 결과 골 결손부의 조혈 골수강 형성 및 골형성대 (reversal line) 형성, 골 재생막 (bone regeneration scaffold) 등이 형성됨을 보고하였다.

Pilloni와 Bernard는 태중 12내지 13일되는 생쥐의 두개골에서 간엽세포들을 채취하여 미분화되고 비석회화된 간엽조직으로 만들어서 히알루론산을 첨가한후 12시간에서 10일까지 배양한 후의 세포 활성도를 보았을 때 대조군과 실험군 모두에서 세포 농도의 증가가 있었으나 특히 1.0과 2.0 mg/ml 농도의 히알루론산을 첨가한 실험군에서 분자량이 30내지 40 kDa인 것이 550, 660과 1300 kDa의 고분자량을 갖는 현저한 석회화 과정을 보였다. 또한 10일간 배양후의 골 재생요소 (osteogenic elements)들이 잘 배열된 교원 기질내에서 잘 구별되었으며 교원섬유와 세포의 기질의 골화 과정은 동물실험에서 일어나는 막성골 형성 (intramembranous bone calcification)의 초기현상을 나타낸다고 보고하였다. 즉, 제 1단계로써의 기질 세포들의 골아세포로의 분화와 2단계 세포의 기질 공간에 기질 수포 (matrix vesicles, the initial calcification loce)의 출현, 3단계 이 수포내에 수산화인회석의 석회화 (crystallization), 4단계 골의 방선형 (spheroidal) 또는 원추형 (cylindrical) 결절내에 수산화인회석 결정체의 성장 및 마지막 5 단계에서는 이러한 골 결절 (nodules)들의 유합으로 초기골 (woven or embryonic bone) 형성을 나타낸다<sup>40</sup>.

본 연구에서는 히알루론산이 첨가된 실험군에서 대조군에 비하여 세포 생존률이나, MIT분석, 염기성 인산분해효소 측정, 단백질 합성능 등에서 세포 활성이 증가되어 나타났으며 1.0 mg/ml 농도에서 특히 높은 활성을 보였고 본 실험에서 사용되었던 히알루론산이 3000 kDa을 보이는 고분자량 물질로써 기존의 보고되었던 저분자량에서만 골활성 촉진제로써의 역할 보고와는 상이한 결과를 나타냈다.

골 기질중에는 제 1, 2, 3형의 교원질이 매우 풍부하며 이 기질 중에는 프로테오글리칸이 많은 양을 차지하지만 아직까지 골 형성시의 골화 과정에 프로테오글리칸이 어떤 역할을 하는지는 명확하게 밝혀지지 않았다. 그러나 프로테오글리칸 분자들이 골화 과정에서 양이온을 띠면서 칼슘과 결합한다고 Rahematula가 밝혔다<sup>40</sup>. 골 기질내 루이신 (leucine)이라는 아미노산이 많은 데코

린 (decorin), 바이글리칸 (biglycan), 파이브로모두린 (fibromodulin) 등은 교원섬유와 연관되어 골 형성 과정에 관여하고, 또한 TGF- $\beta$ 와 연관되어 골 형성에 직접적 연관이 있는 연골화 과정에 깊이 관여한다. 즉 기질내 데코린은 TGF- $\beta$ 의 보합체 (reservoir)로써 프로테오글리칸의 decorin core protein 역할을 해준다. TGF- $\beta$ 는 골아세포의 유사분열물질 (mitogen)로써 알려져 있고 교원질과 세포의 기질 단백질의 합성을 촉진시켜 골화 과정을 도모한다<sup>42-44</sup>. 그렇지만 현재까지 골화 과정에 관련된 세포 주기와 matrix-derived 주기들을 조절하는 자세한 기전들에 관하여는 밝혀지지 않고 있다. 향후 분자 생물학 범위에서 더욱 연구하여 밝혀 내야 할 과제들이 있다.

## V. 결 론

골형성 과정에 있어서 초기의 세포 활성화도는 매우 중요하다. 간엽조직으로부터 골아세포로 이행하는데 있어 세포의 기질들의 세포 행태를 조절하는 기능은 이미 오래전부터 알려져 왔다. 이에 세포의 기질중의 하나인 히알루론산의 골아세포에 미치는 영향을 알아보려고 본 실험은 기획되었다. 즉 골 기질내 단백질인 히알루론산의 골 형성능을 알아보고자 생쥐 두개골의 조골 유사세포인 MC3T3-E1 세포에 미생물에서 추출된 히알루론산 농도 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml 그리고 2.0 mg/ml를 첨가하여 2일 및 4일간 배양한 후 세포증식율의 측정 및 MIT 분석, 세포 활성화도 측정, 세포부착도 평가, 단백질 합성능 측정, 교원질 합성량 측정 및 염기성인산분해효소 활성을 측정하였고 세포 배양 29일째 골 결절 형성능을 보기 위한 Alizarin Red S 염색을 하여 골 형성능을 확인하였으며 정상적인 대조군과 비교하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 모든 실험군과 대조군에서 시간이 지남에 따라 세포 증식을 보였으나 특히 배양 4일 군에서 0.5 mg/ml 과 1.0 mg/ml 농도에서 대조군보다 높은 세포 증식을 나타냈다.
2. MIT분석에서 실험군의 세포 활성화는 2일군, 4일군 모두에서 대조군에 비하여 세포 활성이 증가하여 나타났다.
3. 단백질 합성능은 실험군 모두에서 증가하였으며 특히 1.0 mg/ml 농도를 처리한 군에서 총 단백질 합성량이 현저히 증가하는 경향을 보였다.
4. 교원질 합성량은 실험군 모두에서 증가하는 경향을 보였으며 특히 1.0 mg/ml 농도에서 현저히 증가하였다.
5. 염기성 인산분해효소 활성은 실험군 모두에서 증가되었으며 특히 1.0 mg/ml 이상 처리한 군에서 현저히 증가하는 경향을 보였다.
6. 골 결절 형성능은 0.5 mg/ml 히알루론산을 처리한 군에서 현저히 증가하는 경향을 보였다.

이상과 같은 결과로 볼 때 히알루론산의 골세포에 관한 골 형성능은 대조군에 비해 활성이 증가하는 경향을 보였으며 특히 1.0 mg/ml의 농도에서 더욱 현저한 골 활성화 능력을 보였다. 그러므로 골세포 분화에 있어 히알루론산은 직접적인 골 형성능력이 있음을 시사한다.



## References

1. Banerjee SD, Toole BP: Hyaluronan-binding protein in endothelial cell morphogenesis. *J Cell Biol* 119:634-652 1992.
2. Bartold PM, Miki I, Mcallister B, Narayanan AS, Page RC: Glycosaminoglycans of human cementum. *J Periodont Res* 13:13-17 1998.
3. Toole BP: Hyaluronate and hyaluronidase in morphogenesis and differentiation. *Am Zool* 13:1061-1065 1973.
4. Yanagashita M: Function of proteoglycans in extracellular matrix. *Acta Pathol Jpn* 43:283-293 1993.
5. Hardingham TE, Fosang AJ: Proteoglycans' s many forms and many functions. *FASEB J* 6:861-870 1992.
6. Meyer K, Palmer JW: The polysaccharide of the vitreous humor. *J Biol Chem* 107:629-634 1943.
7. Kvist TN, Finnegan CU: Distribution of glycosaminoglycans in axil region of developing chick embryo. I. Histochemical analysis. *J Exp Zool* 175:221-240 1970.
8. Toole BP, Gross J: The extracellular matrix of the regenerating newt limb: synthesis and removal of hyaluronate prior to differentiation. *Dev Biol* 26:28-35 1971.
9. Maurer PH, Hudack SS: The isolation of hyaluronic acid from callus tissue of early healing. *Arch Biochem Biophys* 38:49-53 1952.
10. Iwata H, Urist MR: Hyaluronic acid production and removal during bone morphogenesis in implants of bone matrix in rats. *Clin Orthop Rel Res* 90:236-245 1973.
11. Urist MR: Biochemistry of calcification. In: Bourne GH (ed) *The biochemistry and physiology of bone*. Academic Prss, New York, pp 1-59 1976.
12. Liu SS, Thompson AY, Heidaran MA, Poser JW and Spiro RC: An osteoconductive collagen/hyaluronate matrix for bone regeneration. *Biomaterials* 20; 1097-1108, 1999.
13. Lerner, M.: Hyaluronic acid makers enjoy growth from old and new uses. *Chemical market reporter*, Septemer 22nd, 1997.
14. Bertolami CN: Glycosaminoglycan interactions in early wound repair. In: *Soft and Hard Tissue Repair: Biological and Clinical Aspects*. pp. 67-101. (Hunt TK, Heppenstall RB, Pimes D, et al, eds). Praeger Press, New York, 1984.
15. Knudson WC, Biswas C, Li XQ, Memec RE, Toole BP: The role and regulation of tumor-associated hyaluronan. In: *Evered D, Whelan J (eds) The biology of hyaluronan*. Wiley, Chichester, pp 138-149, 1989.
16. Hardingham TE, Fosang AJ: Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J* 6:861-870, 1992.
17. Balazs EA, Leshchinger E, Larsen NE, Band P: Hyaluronan biomaterials; medical applications. In: *Wise DL, Trantolo DJ, Altobelli DE, Yashemski MJ, Gresser JD, Schwartz ER, editors. Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering*. New York: Marcel Dekker, 1693-1715, 1995.
18. Larsen NE, Balazs EA: Drug delivery systems using hyaluronan and its derivatives. *Adv. Drug Delivery Rev.* 7: 695-698, 1991.
19. Bertolami CN and Messadi DV: The role of proteoglycans in hard and soft tissue repair, *J. of Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 5(3&4): 311-337, 1994.
20. Liesegang TJ: Viscoelastic substance in ophthalmology. *Survey of ophthalmology* 34(4): 268-293, 1990.
21. Weigel PH, fuller GM, Le Boeuf RD: A model for the role of the hyaluronic acid and fibrin in the early events during the inflammatory response and wound healing. *J Theor Biol* 119:219-234. 1986.
22. Karkapin S. and Holmsen H.: Biochemistry and function of platelets, In: *Hematology*. 3rd ed. pp. 1136-1149, 1983.
23. Ginsburg M.: Role of platelets in inflammation and rheumatic disease. *Adv. Inflamm. Res.* 2:53-71, 1983.
24. Clark RAF: Cutaneous tissue repair: Basic biologic considerations. *I.J.Am. Acad. Dermatol.* 13: 701-725, 1985.
25. LeBoeuf RDR, Gregg PH, Fuller GM: The effects of hyaluronic acid on the conversion of fibrinogen to fibrin and on fibrin gel structure. *J.Cell Biol.* 101: 340-345, 1985.
26. Laurent TC, Fraser JRE: Hyaluronan. *FASEB J.* 6: 2397-2404, 1992.
27. Bertolami CN, Messadi DV: The role of proteoglycans in hard and soft tissue repair. *Crit Rev Oral Biol* 5:311-337 1994.
28. West DC, Kumar S: Hyaluronan and angiogenesis. *The biology of hyaluronan. (Ciba Foundation Symposium 143) Wiley, Chichester*, pp 187-207 1989.
29. Sanberg MHT, Vuorio EI: Gene expression during bone repair. *Clin. Ortho. Rel. Res.* 289: 292-312, 1993.
30. Huertquist SO, Vejens L: The glycosaminoglycans of dog compact bone and epiphyseal cartilage in the normal state and in hyperparathyroidism. *Calcif Tissue Res* 2:314-333 1968.
31. Wiebkin OW, Muir H: Factors affecting the biosynthesis of sulphated glycosaminoglycans by chondrocytes in short term *Pikkarainen J (eds) Biology of fibroblast. Academic Press. New York*, pp 231-236 1973.
32. Motoki DS, Mulliken JB: The healing of bone and cartilage. *Clin Plast Surg* 17:527-544.1990.
33. Wornom IL, Buchman SR: Bone and cartilagenous tissue. In *Cohen D, Diegelmann RF, Lindblat WF (eds) Wound healing biochemical and clinical aspects*. Saunders, Philadelphia, PI 356-383 1992.
34. Knudson CB, Toole BP: Changes in the pericellular matrix during differentiation of limb bud mesoderm. *Dev Biol* 112:308-318 1985.
35. Pfaundler M: Uber die Elemente der Gewebsverkalkung und ihre Beziehung und Rachitisfrage. *J Kinderheilk* 60:123-133, 1904.
36. Campo RD, Dziewiat DD: Turnover of the organic matrix of cartilage and bone as visualized by autoradiography. *J Cell Biol* 18:19, 1963.
37. Cuervo LA, Pita JC, Howell DS: Inhibition of calcium phosphate mineral growth by proteoglycans aggregate fractions in a synthetic lymph. *Calcif Tissue Res* 13:1-10 1973.
38. Howell DS, Pita JC: Calcification of growth plate cartilage with special reference to studies on micropuncture fluids. *Clin Orthop* 118:208-229, 1976.
39. Boskey AL, Dick P: Hyaluronan interactions with hydroxyapatite do not alter in vivo hydroxyapatite crystal proliferation and growth. *Matrix* 11:442-446, 1991.
40. Pilloni A, Bernard GW: The effect of hyaluronan an mouse intramembranous osteogenesis in vitro. *Cell Tissue Res.*, 294: 323-333, 1998.
41. Rahematulla FCW, Butler T: Isolation and partial characterization of proteoglycans from rat incisors. *Biochem. J.* 218: 877-885, 1984.
42. Robey PG, Young KC, Flanders NS, Roche P, Kondaiah AH, Reddy JD: Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor type b (TGF-B) in vitro. *J. Cell Biol.* 105: 457-463, 1987.
43. Massague J: The transforming growth factor-b family. *Ann. Rev. Cell Biol.* 6: 597-602, 1990.
44. Joyce ME, Jingiush S, Bolander ME: Transforming growth factor-b in the regulation of fracture repair. *Ortho. Clin. North. Am.* 21: 199-209, 1990.

Explanation of Figures



(A)



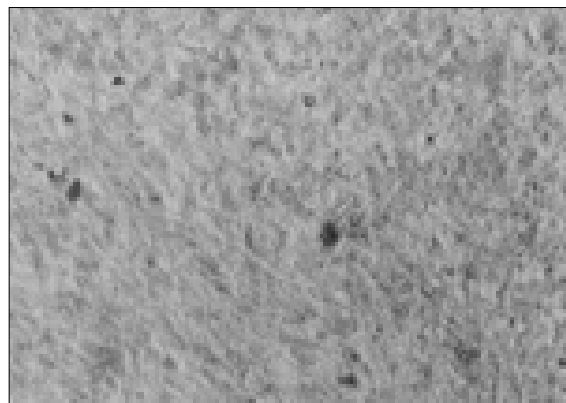
(B)



(C)



(D)



(E)

**Fig. 1.** (A-E). Effects of hyaluronic acid on formation of bone nodules in MC3T3-E1 cells. The cells were incubated with 0 (A), 0.1 mg/ml (B), 0.5 mg/ml (C), 1.0 mg/ml (D) and 2.0 mg/ml (E) of hyaluronic acid. The formation of bone nodules was estimated after 29 days incubation (Alizarin Red S stain, X200).