

## 주사형 조직공학재료를 이용한 골형성

최병호 · 박동준\* · 주식강 · 허진영\*\* · 김병용 · 이승호\*\*\*

연세대학교 치과대학 구강악안면외과학교실(원주기독병원), 연세대학교 원주의과대학 이비인후과학교실\*  
울산대학교 의과대학 강릉아산병원 치과\*\*, 이화여자대학교 의과대학 치주과\*\*\*

**Abstract** (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2003;29:374-378)

### BONE FORMATION USING INJECTABLE TISSUE-ENGINEERING MATERIALS

Byung-Ho Choi, Dong-Joon Park\*, Shi-Jiang Zhu,  
Jin-Young Huh\*\*, Byung-Young Kim, Seoung-Ho Lee\*\*\*

*Department of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Yonsei University*

*Department of Otorhinolaryngology, Yonsei University Wonju College of Medicine\**

*Department of Dentistry, Kangneung Asan Hospital, University of Ulsan \*\**

*Department of Periodontology, College of Medicine, Ewha Womens University\*\*\**

**Aim:** Several injectable materials have been used in the application of osteogenic bone substitute; however, nothing has won universal acceptance. This study was performed to investigate whether chitosan-alginate gel/MSCs/BMP-2 composites are potentially injectable materials for new bone formation.

**Material and Methods:** The composites were injected into the subcutaneous space on the dorsum of the nude mouse to investigate whether new bone would be tissue engineered in the mouse. The composites were examined histologically over a 12-week period.

**Results:** The composites implanted in the mouse were able to tissue engineer new bone, and the newly formed bone consisted of trabecular bone and calcified bone matrix.

**Conclusions:** The present study shows that chitosan-alginate gel/MSCs/BMP-2 composites have the potential to become real injectable materials for new bone formation.

**Key words :** Tissue engineering, Injectable bone, Bone regeneration, Chitosan, Alginate

## I. 서 론

조직공학은 골결손부위의 재건을 위한 방법으로 과거 10년동안 재건학 분야에서 상당한 관심을 받아왔다. 조직공학을 이용한 골재건방법으로 흔히 사용된 방법은 골수줄기세포 (bone marrow stem cell)를 삼차원적인 지지체 (scaffold)에 배양하여 골결손부위에 이식하여 골조직을 생성시키는 방법이다<sup>1)</sup>. 최근에는

주사할 수 있는 젤(gel)형태의 지지체를 이용하는 조직공학방법에 관심이 높아져 왔다. 젤을 이용한 조직공학방법은 고행(preformed)의 지지체를 이용하는 기존의 방법보다 여러 가지 장점을 제공한다. 젤 형태이므로 어떤 형태의 골결손부위에도 채워 넣을 수 있고, 성장인자 등 여러 가지 성분을 쉽게 혼합할 수 있고, 그리고 고행의 지지체가 가지는 여러 가지 화학적 성분을 가지지 않는다. 특히 젤의 형태는 외과적 기술없이 쉽게 주입할 수 있는 장점이 있다. 이러한 이유로 여러 가지 주사형 젤 재료가 개발되어 왔다. 지금까지 조직공학에 사용되어 온 젤성 재료로는 콜라겐 젤<sup>2)</sup>, 폴리에틸렌 옥사이드<sup>3)</sup>, 알지네이트<sup>4)</sup>, 피브린 글루<sup>5)</sup> 등이다. 그러나 이들 재료들은 분해속도 조절의 어려움, 생성조직의 침투의 어려움, 면역반응 등 여러 가지 단점들이 관찰되어 왔다.

### 최 병 호

강원도 원주시 일산동 162번지  
연세대학교 원주의과대학 구강악안면외과

Byung-Ho Choi

Dept. of OMFS, Wonju Christian Hospital, Yonsei University

162 Ilsan-Dong, Wonju, Kwangwon-Do, Korea

Tel: 82-33-741-1430 Fax: 82-33-748-2025

E-mail: choibh@wonju.yonsei.ac.kr

※ 본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(2000-1-20500-011-3)지원으로 수행되었음.

키토산은 생체적합성과 생분해성이 있는 자연산 폴리머로, 독성이 없으며 면역반응을 일으키지 않으며, 상처치유를 돕고<sup>6)</sup> 골형성을 촉진시키는 것으로 알려져 있다<sup>7)</sup>. 알지네이트는 생체적합성이 있는 폴리사카라이드로, 생체내 및 생체외에서 연골세포의 증식을 도와주는 것으로 알려져 있다<sup>8,9)</sup>. 키토산과 알지네이트가 각각 주사형 젤재료로 알려져 있지만 이들 두재료를 혼합한 키토산-알지네이트 복합체가 세포의 분화나 기능에 미치는 영향에 관하여 연구된 것이 거의 없다. 그리하여 본 연구에서는 키토산-알지네이트 복합젤을 골수줄기세포와 골형성단백질의 운반체로 사용하여 이들 젤이 골형성용 주사형 재료로 사용될 수 있는지 연구하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 골수줄기세포 분리 및 배양

골수줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)의 분리 및 배양은 문헌에 보고된 방법<sup>10,11)</sup> 따라 시행했다. 간단히 기술하면 5주된 Fisher rat을 희생시켜 대퇴골을 채취하였다. 채취한 대퇴골의 양쪽 끝단을 제거한 후 한쪽 끝단에서 다른 쪽으로 10ml 배지를 골내로 주입하여 대퇴골내의 골수를 얻었다. 사용된 배지는 minimal essential medium (MEM)을 기본배지로 하여 여기에 20% 우태아혈청 (FBS, Gibco)과 항생제 (Gibco)를 첨가하였다. 얻어낸 골수는 15 ml의 배지와 함께 75 cm<sup>2</sup> 배양용기에 넣고 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 조건하에서 배양하였다. 48시간후부터 배지를 2-3일 간격으로 교환 공급하였다. 이때 바닥에 부착되지 않은 세포들은 배지교환시 함께 제거하였다.

### 2. 키토산-알지네이트 젤의 제조

키토산 (Vanson Chem Co., Redmond, Washington)을 문헌에 기술된 방법<sup>12)</sup>에 따라 87% deacetylation으로 만들었다. 이렇게 제조된 키토산을 0.2 M acetic acid에 녹여 3% w/v concentration으로 만

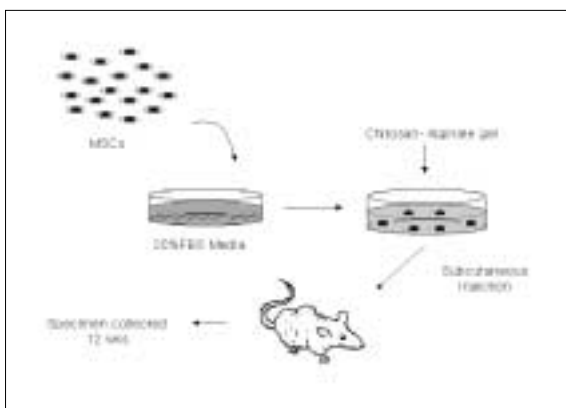


Fig. 1. Schematic drawing of experimental process

든후 0.22 μm 필터로 여과시켰다. 용액상태의 키토산에 0.1 M NaOH를 첨가하여 pH를 중성으로 만들었다. 키토산을 중성으로 변화시키므로써 젤성 침전물이 형성되었다. 이 침전물을 증류수로 2번 세척한 후 알지네이트 (3% w/v in distilled water, Sigma, St. Louis, MO)와 1:1 부피비율로 혼합하였다. 혼합액을 sonicator (Sonics & Materials Inc., Danbury, CT)로 50 watt상태에서 60초 동안 sonication 시켜 젤로 만들었다. 제조된 젤을 사용할 때까지 4°C에서 보관하였다.

### 3. 생체내 주입

6주된 무흉선 누드마우스 15마리를 사용하였다. 5마리씩 3그룹으로 나누었다. 트립신으로 처리하여 분리된 MSCs (약 3×10<sup>6</sup> cells)을 300μl 키토산-알지네이트 젤과 2μg BMP-2 (Bone Morphogenic Protein, R&D Co.)와 혼합하였다. 키토산-알지네이트 젤/MSCs/BMP-2 복합체를 18게이지 바늘을 가진 1ml주사기에 넣고 누드마우스 등의 피하조직내로 주입하였다 (Fig. 1). 동일한 방법으로 각 누드마우스 등의 양쪽에 2개의 복합체를 주입하여 총 5마리에서 10개의 복합체를 주입하였다 (Fig. 2).

대조군으로 키토산-알지네이트젤과 2μg BMP-2의 복합체를 5마리 누드마우스에 주입하였고, 또 다른 대조군으로 키토산-알지네이트젤과 3×10<sup>6</sup> MSCs의 복합체를 5마리 누드마우스에 주입하였다. 주입후 12주후 매식체를 채취하였다.

### 4. 조직학적 분석

채취한 매식체는 10% buffered formalin 용액으로 고정하고 탈회한 후 hematoxyline-eosin (HE) 염색하였다. 염색된 매식체는 광학현미경으로 관찰하였다. Image analysis system (IBAS, Contron,



Fig. 2. Photograph taken immediately after the subcutaneous injection of implants

Erching, Germany)을 사용하여 신생골의 면적을 mm<sup>2</sup>로 계산하였다. 이 때 신생골의 구분은 조직학적 모습, 즉 골세포와 골기질의 형태에 의하여 구분하였다. 매식체 전체 면적에 대한 신생골의 면적비율을 계산하였다.

또한 매식체를 4 μm의 두께로 자른 후 골형성에 중요한 단백질인 osteopontin에 대한 immunohistochemistry를 시행하였다.

### Ⅲ. 결 과

#### 1. 키토산-알지네이트젤 제조

키토산-알지네이트 혼합액을 sonication 한 후에는 물리적 성질이 키토산이나 알지네이트용액과 전혀 다른 성질을 가졌다. sonication 한 후 생성된 젤을 멸균인산완충식염수 (PBS)에 넣었을 때 형태가 변하지 않고 유지되었으며, 3주동안 관찰하였을 때 형태가 계속 유지되었다. 또한 젤을 37°C 배양용기에 두었을 때 더 단단하게 되었다. Sonication한 후 키토산-알지네이트젤과 골수줄기세포의 혼합은 피펫(pepet)으로 쉽게 되었다. 젤내에 혼합된 세포는 젤이 반투과성이어서 광학현미경으로 관찰이 가능하였다.

#### 2. 주입된 매식체의 육안적 소견

키토산-알지네이트젤/MSCs/BMP-2 복합체를 주입한 누드마우스에서는 12주 후 피하조직내에 작은 결절(node)이 형성되었으며, 이들 결절은 돌처럼 단단하였으며, 이들 결절들은 주변조직과 경계가 분명하여 피하조직으로 쉽게 분리되었다 (Fig. 3). 그러나 키토산-알지네이트젤/MSCs 복합체 또는 키토산-알지네이트젤/BMP-2 복합체를 주입한 누드마우스에서는 매식체가 서서히 흡수되기 시작하여 1개월후에는 완전히 흡수되어 결절이 형성되지 않았다.

#### 3. 조직학적 소견

##### 실험군

키토산-알지네이트젤/MSCs/BMP-2 복합체 결절은 주변이 섬유성 막으로 둘러싸여 있었으며, 막내부에는 trabecular bone과 석회화된 골질이 형성되어 있었으며, 골표면에는 골아세포로 둘러싸여 있었다 (Fig. 4). 특히 생성된 골주변의 골은 정상골과 유사한 laminar 형태를 가졌다 (Fig. 5). 매식체 전체 면적에 대한 생성된 골의 면적비율은 평균 44.7% 였다. 결절내에 연골형성은 관찰되지 않았다. Osteopontin에 대한 검사에서 양성반응을 보였다 (Fig. 6).

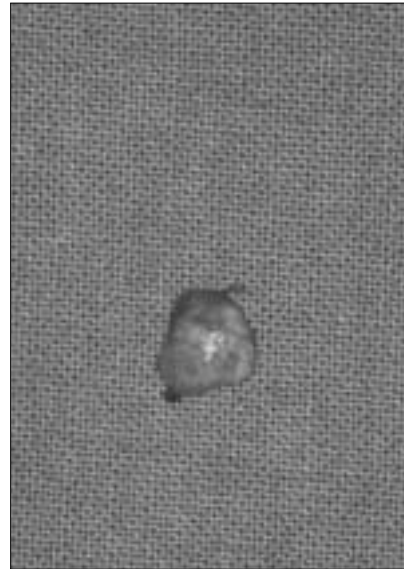


Fig. 3. Specimen removed 12 weeks after implantation

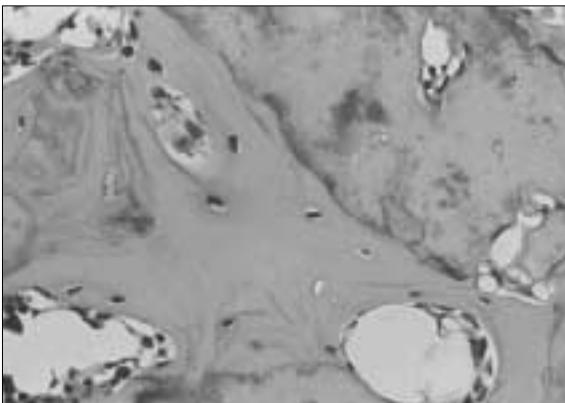


Fig. 4. Histological findings of the implant from the MSCs/BMP-2/chitosan-alginate gel admixture (HE, x 200)

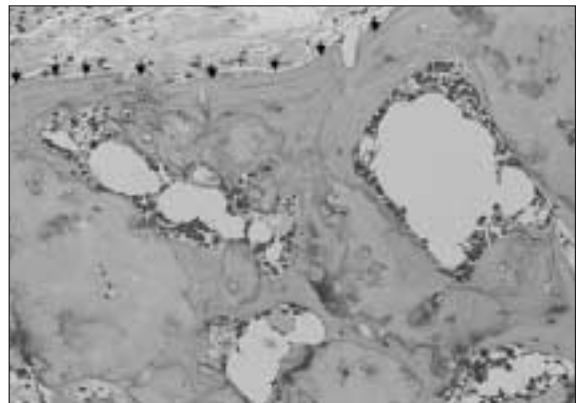


Fig. 5. Histological findings of the implant from the MSCs/BMP-2/chitosan-alginate gel admixture(HE, x100). arrows: laminar bone

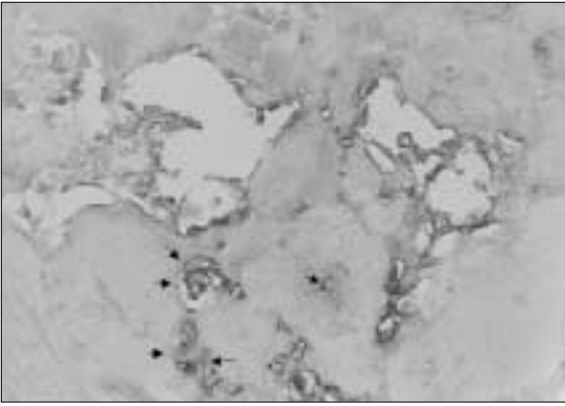


Fig. 6. Osteopontin antibody-stained sections of the implant from the MSCs/BMP-2/chitosan-alginate gel admixture(x200). Arrows: osteocytes

#### 대조군

12주후 매식체를 주입한 부위에서 피부를 절개하여 잔존물을 찾았으나 모든 동물에서 흡수되고 없었다.

#### Ⅳ. 고 찰

이상적인 주사형 조직공학재료는 골을 형성하는 세포의 능력에 맞추어 적절한 속도로 분해되어야 한다. 본 연구결과에 의하면 키토산-알지네이트젤에 골수줄기세포와 골형성단백질을 혼합하여 주사하였을 때는 신생골이 형성되었지만, 키토산-알지네이트젤에 골수줄기세포 또는 골형성단백질을 하나만 혼합하였을 때는 골이 형성되지 않고 젤이 분해되어 완전히 흡수되었다. 이러한 결과는 골수줄기세포의 골형성속도를 골형성단백질(BMP-2)로 촉진시켰을 때 키토산-알지네이트젤의 분해속도와 조화를 이룸을 나타낸다. 또한 젤내에서 BMP-2가 미분화된 골수줄기세포를 골아세포로 유도하는 작용이 큰 것을 나타낸다. 1993년 Wang등도<sup>13)</sup> 골수줄기세포만 사용한 대조군에서 골형성을 관찰할 수 없었으나, BMP-2를 추가로 사용한 경우 BMP-2가 미분화된 골수줄기세포의 골형성을 유도하여 골기질이 형성됨을 관찰하였다. 본 연구에서 12주후 매식체 전체 면적에 대한 생성된 골의 면적비율은 약 45%로 기존의 논문에 보고된 비율<sup>14)</sup>보다 높았다. 높은 골생성비율은 아마도 키토산-알지네이트젤의 분해속도가 골수줄기세포의 골형성속도와 조화를 이루었기 때문인 것으로 사료된다.

골형성단백질은 치과와 정형외과분야에서 가장 중요한 성장인자중의 하나로<sup>15,16)</sup>, 지금까지 1-15 subtypes의 BMP가 알려져 있으며 이들이 골절이나 골의 발육에서 형태형성과 재생에 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>17)</sup>. BMP-2는 골유도에 있어서 여러 subtype 중 가장 능력있는 BMP중의 하나로 알려져 있다. 다른 성장인자들처럼 BMP는 운반체를 필요로하여 이들 운반체에 의하여 장기간에 걸쳐 계속적으로 분비되어야 골형성이 유도됨이 알려져 있다<sup>18)</sup>. 본 연구에서는 키토산-알지네이트젤을 운반체로 사용하였다. 이들 젤에서 BMP-2가 인접하여 있는 미분화된 골수줄기세포

와 작용하여 그들을 골아세포로 유도하고 골아세포가 신생골을 형성한 것으로 생각된다.

최근에 키토산-알지네이트 복합체가 여러 분야에서 임상적으로 사용되기 시작하였다<sup>19,20)</sup>. 그러나 이들 복합체를 세포운반체로 사용하는 시도는 거의 이루어지지 않았다. 키토산-알지네이트 복합체의 특성은 중성에서 그리고 37°C의 조건하에서 젤로 변화된다는 것이다<sup>20)</sup>. 이러한 특성을 이용하여 성장인자나 살아있는 세포 등의 생물학적인 요소들을 저온에서 용액의 형태에서 쉽게 혼합할 수 있으며 생체내에 주사할 경우 생체내 온도에서 젤로 변하여 주사한 부위에서 형태를 유지시킬 수 있게 된다. 본 연구에서는 저온상태에서 키토산-알지네이트 복합체 내에 성장인자(BMP-2)와 골수줄기세포를 혼합하였으며 이를 누드마우스 피하조직내에 주입하여 더 단단한 젤로 굳어지게 하였다. 이들 젤은 시간이 경과함에 따라 수축되어 크기가 감소되었지만 일정한 형태가 유지되었다. 우리들은 예비실험에서 키토산-알지네이트 젤내에서의 세포증식속도를 3주동안 관찰한 결과 세포증식이 213%이루어 짐을 관찰하였으며, 또한 본 연구에서 이들 젤을 이용하여 생체내에서 골이 형성된 것을 관찰하였다. 이러한 결과들은 키토산-알지네이트 젤이 성장인자와 세포의 운반체로 사용될 수 있음을 보여주었다.

본 실험에서 신생골이 누드마우스 등의 피하조직내에서 즉, 간질용액(interstitial fluid)으로부터 영양공급을 받는 부위에서 생성되었다. 만약 골결손부위에 본 실험방법으로 골형성을 유도하였을 경우에는 더 많은 골이 생성될 수 있다고 추측할 수 있다. 이러한 것은 앞으로 더 많은 연구가 필요하겠다. 신생골의 크기는 매식체내로 영양분이 얼마나 잘 침투해 들어갈 수 있는가에 의하여 결정될 수 있는데, 본 연구에서는 형성된 골의 양이 소량에 불과하였다. 앞으로 조직공학적 방법을 이용하여 만들 수 있는 골의 모양과 양에 관하여도 더 많은 연구가 필요하겠다.

#### Ⅴ. 결 론

본 연구에서는 키토산-알지네이트 복합젤을 이용하여 골형성용 주사형 재료를 개발하고자 이 복합젤을 골수줄기세포와 골형성단백질과 혼합한 후 이를 누드마우스 등의 피하조직내로 주입한 결과 이들 복합체가 신생골을 형성하였다. 그러므로 키토산-알지네이트젤/MSCs/BMP-2 복합체가 신생골을 형성하는 주사형 조직공학 재료가 될 수 있음을 보여주었다.

#### 참고문헌

1. Vacanti CA, Kim W, Upton J, Vacanti MP, Mooney D, Schloo B, Vacanti JP: Tissue-engineered growth of bone and cartilage. *Transplant Proc* 25:1019-1021, 1993.
2. Wakitani S, Kimura T, Hirooka A: Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. *J Bone Joint Surg* 71: 74-80, 1989.
3. Sims CD, Butler P, Casanova R, Lee BT, Randolph MA, Lee A, Vacanti CA, Yaremchuk MJ: Injectable cartilage using polyethylene oxide polymer substrates. *Plast Reconstr Surg* 95: 843-850, 1996.
4. Paige KT, Cima LG, Yaremchuk MJ, Schloo BL, Vacanti JP, Vacanti

- CA: De novo cartilage generation using calcium alginate-chondrocyte constructs. *Plast Reconstr Surg* 97: 168-180, 1996.
5. Silverman RP, Passaretti D, Huang W, Randolph MA, Yaremchuk MJ: Injectable tissue-engineered cartilage using a fibrin glue polymer. *Plast Reconstr Surg* 103: 1809-1818, 1999.
  6. Ishihara M, Nakanishi K, Ono K, Sato M, Kikuchi M, Saito Y, Yura H, Matsui T, Hattori H, Uenoyama M, Kurita A: Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process. *Biomaterials* 23: 833-840, 2002.
  7. Klokkevold PR, Vandemark L, Kenney EB, Bernard GW: Osteogenesis enhanced by chitosan poly(N-acetyl glucosaminoglycan) in vitro. *J Periodontol* 67: 1170-1175, 1996.
  8. Guo J, Jourdian G, Maccallum DK: Culture and growth characteristic of chondrocytes encapsulated in alginate beads. *Con Tissue Res* 19: 277-285, 1989.
  9. Vacanti CA, Langer R, Schloo B, Vacanti JP: Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. *Plast Recon Surg* 88: 753-758, 1991.
  10. Maniatopoulos C, Sodek J, Mekcher AH: Bone formation in vitro by stromal cells obtained from marrow of young adults. *Cell Tissue Res* 254: 317-330, 1988.
  11. Dennis JE, Haynesworth SE, Young RG, Caplan AI: Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal stem cells/porous ceramic composites transplanted subcutaneously: effect fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenesis expression. *Cell Transplant* 1: 23-32, 1992.
  12. Yan XL, Khor E, Lim LY: PEC films prepared from chitosan-alginate coacervates. *Chem Pharm Bull* 48: 941-946, 2000.
  13. Wang EA, Israel DI, Kelly S, Luxenberg DR: Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells. *Growth Fact* 9: 57-71, 1993.
  14. Muraglia A, Martin I, Cancedda R, Quarto R: A nude mouse model for human bone formation in unloaded conditions. *Bone* 22: 131S-134S, 1998.
  15. Croteau S, Rauch F, Silvestri A, et al.: Bone morphogenetic proteins in orthopedics: From basic science to clinical practice. *Orthopedics* 22: 686-695, 1999.
  16. Sykaras N, Triplett RG, Nunn ME, et al.: Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on bone regeneration and osseointegration of dental implants. *Clin Oral Implants Res* 12: 339-349, 2001.
  17. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al.: Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242: 1528-1534, 1988.
  18. Vehof JW, Mahmood J, Takita H: Ectopic bone formation in titanium mesh loaded with bone morphogenetic protein and coated with calcium phosphate. *Plast Reconstr Surg* 108: 434-443, 2001.19. Kim HJ, Lee HC, Oh JS, Shin BA, Oh CS, Park RD, Yang KS, Cho CS: Polyelectrolyte complex composed of chitosan and sodium alginate for wound dressing application. *J Biomater Sci Polym Ed* 10: 543-556, 1999.
  20. Takeuchi H, Yasuji T, Yamamoto H, Kawashima Y. Spray-dried lactose composite particles containing an ion complex of alginate-chitosan for designing a dry-coated tablet having a time-controlled releasing function. *Pharm Res* 17: 94-99, 2000.
  21. Wang LS, Khor E, Lim LY: Chitosan-alginate-CaCl<sub>2</sub> system for membrane coat application. *J Pharm Sci* 90: 1134-1142, 2001.
  22. Chenite A, Chaput C, Wang D, Combes C, et al.: Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials* 21: 2155-2161, 2000.