

골재생을 위한 이종골이 함유된 온도감응형 하이드로젤

김 진 · 천서영* · 국민석** · 이창문*** · 이기영****†

전남대학교 헬스케어의공학연구소, *전남대학교 신화학소재공학과, **전남대학교 치의학 전문대학원 구강악안면외과학교실,
전남대학교 의공학과, *전남대학교 화학공학부

(2017년 8월 25일 접수, 2017년 9월 27일 수정, 2017년 9월 29일 채택)

Thermo-Responsive Hydrogels Containing Xenogenic Graft Materials for Bone Regeneration

Jin Kim, Seo Young Cheon*, Min Suk Kook**, Chang Moon Lee***, and Ki Young Lee****†

Research Center for Healthcare-Biomedical Engineering, Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea

*Department of Advanced Chemicals and Engineering, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

**Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

***Department of Biomedical Engineering, Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea

****Faculty of Chemical Engineering, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

(Received August 25, 2017; Revised September 27, 2017; Accepted September 29, 2017)

초록: 골 재생을 유도하기 위해 주사가 가능한 메틸셀룰로오스(methylcellulose, MC)와 잔탄검(xanthan gum, XT)으로 구성된 온도감응형 하이드로젤을 제조하였다. 본 연구에서는 생체 내에서 골 결손 재생을 향상시키기 위해 골 이식재(BGM)가 포함된 하이드로젤을 연구하였다. BGM이 함유된 MC-XT 수용액은 생리학적 온도에서 졸-젤 전이를 보였다. 두개골 결손 동물 모델 연구에서, BGM을 함유한 하이드로젤은 무처리 그룹 및 하이드로젤만 처리한 그룹과 비교하였을 때 뼈 재생을 상당히 개선시켰다. Micro-CT 및 조직학적 결과에서 볼 수 있듯이, BGM을 포함한 하이드로젤에서는 치료 4주 후에 새로 형성된 골조직이 분명하게 관찰되었다. 결론적으로 BGM을 함유한 온도감응형 MC-XT 하이드로젤은 생체 내에 골 결손 재생을 위한 유용한 주사 물질임을 확인하였다.

Abstract: Thermo-responsive hydrogels consisted of methylcellulose (MC) and xanthan gum (XT) could be used as an injectable repairing material to regenerate bone defect. In this study, the hydrogel containing xenogenic bone graft materials (BGM) was investigated for enhancement of bone defect regeneration *in vivo*. MC-XT aqueous solution containing BGM exhibited sol-to-gel transition at physiological temperature. In a cranial defect animal model studies, the hydrogel containing BGM improved the bone regeneration significantly in comparison with the untreated group and the hydrogel only group. As shown in the result of micro-CT and immunohistochemical staining, newly formed bone tissues were clearly observed at 4 weeks post-treatment in the hydrogel containing BGM group. The results indicate that the thermo-responsive MC-XT hydrogel containing BGM was an useful injectable material for bone defect regeneration *in vivo*.

Keywords: xenogenic bone graft material, methylcellulose, thermo-responsive, sol-gel, bone regeneration.

서 론

골이식은 각종 골재건술(reconstructive orthopedic surgery) 및 치과용 임플란트 시술에 매우 다양한 분야에서 광범위하게 이용범위가 넓어가고 있는 추세이다. 가장 이상적인 골 이식재로 자가골은 채취 시 부가적인 수술이 필요하며, 채취 부위의 통증, 골 채취량의 제한 등의 문제점을 가지고 있어

자가골을 대체할 수 있는 동종골, 이종골 및 합성골 이식재에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.¹ 이종골은 소나 돼지 등의 다른 종의 동물에서 골을 채취한 후 동결건조, 탈회 동결건조, 그리고 방사선 조사 및 열 멸균 등을 거쳐 골전도 능력을 기대하는 골 이식재(BGM, xenogenic bone graft materials)이다. 이러한 골 이식재를 손쉽게 사용하기 위해 지 지체, 스케폴더, 하이드로젤에 적용시켜 활용되고 있다. 그러나 사용 부위에 따라 물성과 형태 조절이 자유롭지 않은 한계점을 가지고 있다. 최근, 졸(sol)-젤(gel) 전이 거동을 보이는 온도감응형 창상피복재가 제품화되고 있다. 제네웰의 Guardix-SG와 CG-Bio의 Mediclore 제품으로 poloxamer에

†To whom correspondence should be addressed.
kilee@chonnam.ac.kr, ORCID[®] 0000-0001-9169-2660
©2018 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

알지네이트를 첨가시킨 것과 poloxamer에 젤라틴과 키토산을 첨가시킨 줄의 형태로 유착방지제에 활용되고 있다. 온도감응성 소재는 스마트한 생체재료로 다양한 응용분야에서 활용할 수 있다. 유동성 액체인 줄 상태에서 체내로 주입하면 고형 젤을 형성하는 온도감응성 젤은 복잡하고 불규칙적 형태의 3차원적 공간에 기능적이고 심미적인 조직재생을 위해 주입형 적용이 가능하다.² 줄-젤 전이가 일어나는 고분자로 poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) 기반 공중합체와 poly(ethylene glycol)(PEG) 기반 블록공중합체로 나눌 수 있다.^{3,4} 하지만, 우수한 온도감응성 및 광범위한 응용성에도 불구하고 비분해성과 세포 독성이라는 본질적인 문제로 인해 생체재료로 활용에 제한이 있다. 천연고분자인 알지네이트, 셀룰로오스, 히알루론산, 덱스트란 등은 생체 적합성과 생분해성이 뛰어나지만 온도 감응성의 고분자로 전환하기 위해 dihydrazide, carbonyldihydrazide, butanediol diglycidylether 등의 다양한 가교결합제를 사용하고 있다.^{5,6}

그러나 methylcellulose(MC)의 경우 염의 농도, 분자량 그리고 고분자의 농도에 따라 수초 내에 상전이가 되는 줄-젤 고분자로 사용이 가능하다.⁷ 의약품에 다양하게 활용되고 있는 MC는 약물의 담지체 및 스캐폴드 등 생체 내 활용가능한 소재로 쓰이고 있다. 특히, 섬유아세포에 부착 및 증식성, 세포적합성이 높은 소재이며 골 형성 세포 MC-3T3에 처리했을 때 골 형성에 도움을 주는 연구결과가 있다.^{8,9}

Xanthan gum(XG)은 cellulose와 같이 박테리아 발효에 의해 생산되는 생체적합성과 생분해성이 가능한 음이온 다당으로 낮은 온도에서는 규칙적이고 단단한 이중나선 스트랜스 구조와 고온에서는 무질서하고 유연한 코일 구조의 두가지의 다른 형태 성질을 가진다. MC와 XT의 혼합은 전단감소 및 낮은 점도의 특성을 보완해주어 주사가 가능한 하이드로젤이 형성되어 의료용 소재로 많은 연구가 되어 있다. 이러한 특성을 적용하여 BGM을 적용시킨 주사가 가능한 하이드로젤을 개발하고자 한다. 이전 연구에서 MC조성 온도감응성 유착방지제를 개발했으며 독성이 없고 한 달 이상 유착방지막의 역할을 하는 것을 관찰하였다.¹⁰ 본 연구에서는 골 재건 및 재생을 유도할 때 사용되는 BGM을 온도감응의 성질을 가진 MC/XT 조성에 첨가시켜 BGM이 함유된 수용액(줄)을 제조 후, 골 손상 부위에 처리하여 골 재생물을 확인하고 골재생 의료 소재로 활용가능성을 평가하고자 한다.

실 험

시약 및 재료. Methylcellulose(MC, 4000CP), xanthan gum(XT, 800-1200CP), alkaline phosphatase yellow (pNPP), Na_2HPO_4 는 Simga사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 이중골은 Mega-Oss Bovine(Megagen, Korea)을 사용하였다. MC3T3-E1 세포주

는 한국 세포주 은행에서 구입하여 사용하였다. 배양하기 위한 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM)과 trypsin-ethylene diaminetetra acetic acid(EDTA)는 Gibco laboratories (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, fetal bovine serum(FBS)은 hyclone laboratories(Logan, UT, USA)에서, ninety-six well tissue culture plates 및 tissue culture dish는 Nunc Inc.(North Aurora Road, IL, USA)에서 각각 구입하였다. 그 외 모든 시약은 1급 또는 특급을 사용하였다.

이중골 함유 젤 제조. 이전 연구의 방법을 활용하여 MC/XT 조성 온도감응성 하이드로젤을 제조하였다.¹⁰ MC와 XT를 증류수에 4:1 비율로 용해시키고 0.1 M Na_2HPO_4 를 첨가하여 50 °C에서 4시간 동안 교반하였다. 교반한 용액에 0.1%의 EDTA와 1%의 BGM을 첨가하여 다시 50 °C에서 4시간 동안 교반하였다. MC/XT-BGM 수용액(줄)을 4~8 °C의 저온에서 24시간 교반한 후, 제조한 줄의 안정화를 위하여 제조 후 4시간 동안 4 °C에서 방치하였다. 제조된 MC/XT-BGM 혼합 조성물을 25 °C와 37 °C 온도로 유지되는 항온수조에서 분사하여 온도가 37 °C일때 gelation되는 것을 육안으로 확인하였다. MC/XT조성 줄의 열-전이 거동은 온도를 25 °C에서 40 °C로 점차 증가시키면서 광 투과율(light transmittance)을 UV-vis spectrophotometer로 측정하였다. 각 온도 지점에서 줄은 데이터를 측정하기 전에 최소 10분간 배양 후, 350 nm에서 측정하였다.

FTIR 분석. 이중골 함유 조성물의 화학 구조의 변화를 살펴보기 위하여 적외선분광광도계(FTIR spectroscopy, Shimadzu-IR Prestige-21, Japan)를 이용하여 분석하였다. BGM, MC/XT 그리고 MC/XT-BGM 하이드로젤을 각각 동결 건조하였다. KBr pellet을 만들어 시편을 제조하였으며, 시료와 KBr을 무게비 1:100으로 잘 혼합하여 pellet을 제조하고 60 °C에서 12시간 동안 감압 건조를 이용하여 수분을 제거한 후 4000~500 cm^{-1} 영역에서 측정하였다.

표면형태평가(SEM). 각 시료의 표면 형태를 관찰하기 위해 시료를 준비하였다. 실험에 사용한 BGM, BGM이 첨가되지 않은 MC/XT 그리고 MC/XT-BGM 하이드로젤 내부에 존재하는 BGM을 관찰하기 위해 줄 상태의 시료를 6 well petri dish에 casting 후 37 °C에서 하이드로젤 상태의 시료를 초저온냉동고(-80 °C)에서 한시간 방치 후 동결건조하였다. 동결건조된 시료는 automatic coater(Sputter Coater 108auto, Cressington Scientific Instruments Inc.)를 이용하여 Au-Pd로 60초 동안 진공 코팅한 후에 scanning electron microscope (SEM, JSM-5400A, JEOL, Japan)를 이용하여 15 kV에서 형태를 관찰하였다.

원자력현미경(Atomic Force Microscopy, AFM) 분석. 각 시료의 가시적 표면 분석을 위하여 줄 상태의 시료를 6 well petri dish에 casting 후 37 °C에서 하이드로젤 상태의 시료를 초저온냉동고(-80 °C)에서 한시간 방치 후 동결건조하였다.

각 시료를 2 cm×2 cm로 절단하여 준비한 후 표면에 3곳의 동일한 면적(30 μm ×30 μm)을 설정하여 AFM(XE-100, Park systems Corp., Santa Clara, CA, USA)을 이용하여 표면형태(surface morphology), 표면 고도(R_z : Max. roughness profile height), 표면 거칠기(RMS: root mean square)를 관찰하였다.

XRD 분석. X선 회절분석은 분말형 시편의 방사선 회절패턴을 분석하여 고체의 결정구조를 조사하는 방법이다. BGM과 동결건조된 MC/XT 및 MC/XT-BGM 시료를 10 mm×15 mm로 절단한 후 X-ray diffractograms은 wide-angle X-ray diffractometer(WAXD; Rigaku Dmac 2000 V)(Rigaku, Tokyo, Japan)의 Cu KR방사선을 이용하여 40 kV, 30 mA 조건에서 $2\theta=5\text{--}40^\circ$ 의 범위로 측정하였다.

세포독성 평가. 의료가기 관련 세포독성 측정 방법은 ISO 10993에 제시된 방법으로 평가하였다. 세포 생존을 측정은 MTT assay 법으로 측정하였다. 동결건조 후 얻은 MC/XT와 MC/XT-BMG 시료 각 1%를 세포배양액(DMEMGibco)으로 25 $^\circ\text{C}$ 이하에서 24시간 이상 교반하여 용출액을 제조하였다. 96 well plate에 각 well당 MC3T3-E1 세포 5×10^4 cells/well을 분주하고 MC/XT와 MC/XT-BMG 용출액을 함유한 DMEM 배양액으로 갈아준 후 24시간 동안 37 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. Well당 20 μL 의 MTT 용액을 첨가하여 37 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2 조건에서 4시간 동안 반응시킨 후, 배양액을 버리고 DMSO 100 μL 씩 넣어 formazan을 용해한 후, ELISA 측정기(ELX 808, Biotek Instruments, Vermont, USA)를 이용하여 570 nm에서 측정하였다.

ALP활성 평가. 24 well plate에 MC3T3-E1 cells을 2×10^3 cell/mL이 되도록 분주한 후 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 37 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 24시간 배양 후 분화유도배지(50 $\mu\text{g/mL}$ ascorbic acid, 10 mM β -glycerophosphate, 10^{-7} M dexamethasone 포함된 DMEM)로 교환하여 24시간 배양한 다음 시료를 처리하였다. 0.2 g/mL 농도의 시료를 처리하여 배양한 후 2, 7일 뒤 배양한 MC3T3-E1 cells을 PBS로 2회 세척하고 1회 냉동/해동(freezing/thawing) cycle 후 200 μL 0.1% Triton X-100를 첨가하여 완벽하게 용해시켰다. 총 50 μL 의 세포 용해물을 96 well plate로 옮기고, 150 μL pNPP를 실온에서 각 well에 첨가하였다. ELISA reader로 405 nm의 파장에서 흡광도($t=0$)를 측정한 후 다시 30분 후 흡광도($t=30$)를 측정하였다. 30분 후 측정한 흡광도 값에서 0분에 측정한 흡광도 값을 뺀 값을 사용하였다. Bicinchoninic acid(BCA) protein assay kit (Pierce, USA)를 사용하여 전체 단백질량과 ALP 농도를 결정하여 ALP activity 값을 계산하였다.

석회화 결절 형성 측정. MC3T3-E1 cells을 6 well plate에 각 well당 1×10^5 개씩 분주하고, 분화유도배지(50 $\mu\text{g/mL}$ ascorbic acid, 10 mM β -glycerophosphate, 10^{-7} M dexamethasone이 포함된 DMEM)에 각 0.2 g/mL 농도의 시료를

첨가하여 각 well에 투여하였다. 2일마다 시료를 포함한 새 배지로 교환하면서 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 PBS로 가볍게 세척한 후 70% ethanol을 가하고 4 $^\circ\text{C}$ 에서 1시간 동안 고정하였다. 세포를 증류수로 세척하고 40 mM alizarin red solution(pH 4.2)(Sigma-Aldrich)으로 실온에서 10분간 염색하였다. 비특이적인 염색을 줄이기 위해 증류수로 5번 세척한 후 PBS를 가하고 15분 방치하였다. PBS를 제거한 후 10%(w/v) cetylpyridinium chloride(Sigma-Aldrich)를 첨가한 10 mM sodium phosphate(pH 7.0) 용액을 각 well에 첨가하고 실온에서 15분간 반응시켜서 얻은 alizarin red 추출액을 96-well plate로 옮기고 562 nm에서 흡광도를 측정하였다.

동물실험. 본 연구는 전남대학교 동물윤리위원회(CNU-IACUC)로부터 과학성과 윤리성에 대한 심사를 거쳐 승인(승인번호: CNU-YB-2016-40)받아 수행하였다. 실험에 사용된 SD랫 (10주령, 수컷)은 (주)오리엔트 바이오(Korea)로부터 구입하였다. 물과 사료를 자유 급식하도록 하였다. 모든 동물실험은 12시간의 조명주기(08:00~20:00)로 specified pathogen-free(SPF) 상태에서 온도 22 ± 1 $^\circ\text{C}$, 상대습도 $50\pm 5\%$ 의 조건으로 관리되는 전남대학교 청정실험동물센터(CNU-Laboratory Animal Resources Center)에서 사용하였다. 본 연구에서 모든 전신마취는 zoletil(30 mg/kg), rumpun(10 mg/kg)을 혼합하고 근육 주사하였다. 마취제 주입 후, 랫의 두부에 시야확보와 무균적 수술환경을 위하여 전기면도기를 이용하여 절개 부위의 털을 제모하였다. Povidon-iodine 용액과 70% ethyl alcohol으로 살균하고 수술부위를 격리하였다. 2% lidocaine으로 국소마취한 후 랫의 두개골의 시상 봉합선을 따라 정중부위 절개를 가하고 골막기자를 이용하여 골막을 거상하고 박리하였다. 준비된 MC/XT-BGM 졸을 처치할 수 있도록 두개골을 충분히 노출시켰다. Trephine bur(내경 5 mm)를 이용하여 두개골 시상 봉합선에 각 1개의 원형의 홈을 파서 MC/XT-BGM 졸 시료를 주입 후 1차로 골막을 봉합하고 2차로 표피를 봉합하였다. 육안적 관찰과 micro CT(Quantum GX Uct, Perkin Elmer, USA)로 촬영하였다.

마이크로 CT 촬영. 실험당일과 4주 후에 micro CT(Perkin Elmer)를 이용하여 실험 부위를 촬영하였다. CT촬영 시 관전압은 90 kV, 관전류는 88 μA 이었으며 1 mm 알루미늄 필터를 사용하였고 카메라 화소 크기는 12.56 μm 였다. 촬영시간은 2분이 소요되었다. CT-Vol 분석 프로그램을 이용하여 분석하였다. 골 결손부위의 3차원적 재건 및 분석에는 ASBMR에 기준하여 분석하였다.

조직학적 평가. 골 결손부위의 4주를 경과한 후 실험동물은 보건복지부고시 제88-9호의 실험동물 관리 지침서 등에 관한 기준에 명시된 향정신성 약의 과잉투여에 의한 방법에 따라 ethyl ether를 이용하여 조직 검사용 실험동물을 안락사시켰다. 희생시킨 랫의 두개골을 절제하고 절제해낸 조직을

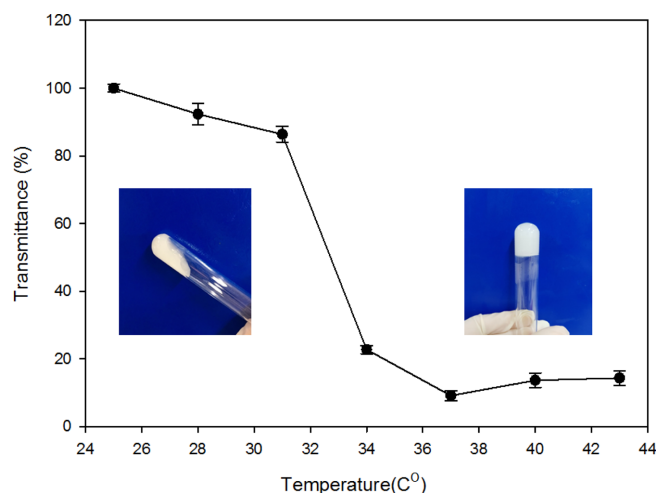


Figure 1. Temperature dependent changes of MC/XT-BGM sol-to-gel image. The sol state at 25 °C; the gel state at 37 °C.

10% formalin에 고정 한 후 5% nitric acid에 넣어 탈회시킨 후 파라핀 포매하였다. 이 블록을 3 μm 두께로 결손부의 중앙부에서 관상면으로 절단하여 블록당 4장의 슬라이드를 제작하였다. 이를 hematoxylin-eosin(H-E) 염색법으로 염색하고, 광학현미경으로 관찰하였다.

통계처리. 모든 실험 결과는 평균값(mean)과 표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였다. 대조군과 실험군 사이의 통계학적 유의성 검정은 Student's *t*-test로 비교하였으며 *p*가 0.05 이하인 것과 0.01 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

결과 및 토론

이종골 함유 젤 제조. 골재건 시술 시 사용되는 골 이식제는 250-800 nm 크기이며 골 분말을 결절부분에 채워주는 방식으로 활용되고 있다. 또한 골이식제가 점착력을 가질 수 있도록 환자의 혈액이나 혈소판 응축액을 넣어 충분히 적셔 사용하도록 되어 있다. 본 연구에서는 골 이식제의 손쉬운 활용을 위해 골이식재인 BGM이 함유된 MC/XT 수용액을 제조하였다. 연구에 사용된 MC/XT 수용액은 생체 내에 주입했을 때 1일에서 7일이 경과되었을 때 졸-젤의 팽윤이 일어나며 2주가 경과되면 부피가 감소하고 30일이 되면 분해되는 것을 이전 연구를 통해 관찰하였다.¹⁰ MC와 XG는 cellulose backbone을 가지고 있으며 XG의 강한 수분저장력(strong water binding capacity)은 조성비율에 따라 *in vitro*와 *in vivo*에서 분해율과 팽윤율에 밀접한 관계를 나타낸 연구 결과가 있다.⁹

본 연구에서 제조한 이종골 함유 졸-젤은 25 °C에서는 수용액 상태로 유지되다가 37 °C에서 하이드로젤 상태로 전환

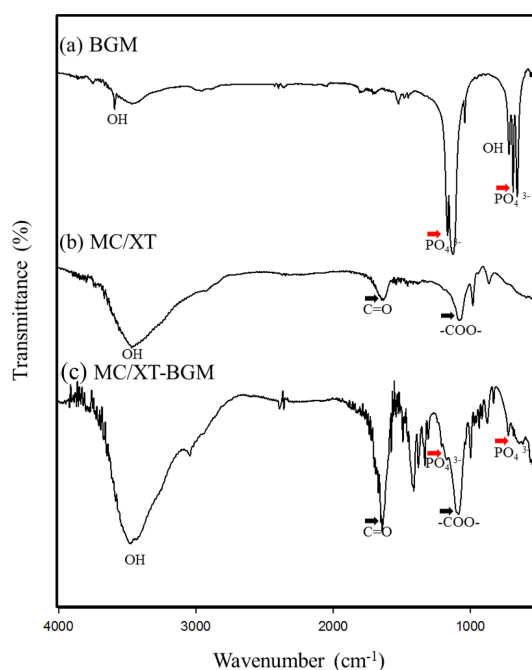


Figure 2. FTIR spectra of the BGM (a); MC/XT gel (b); MC/XT-BGM gel (c) after freezing dry.

되는 주사형 온도감응형 골이식재이다. Figure 1은 온도에 따른 MC/XT-BGM 하이드로젤에 졸-젤 전이를 나타내는 그래프이다.

FTIR 분석. 실험에 사용된 우골에서 단백질을 제거한 이종골 이식재 BGM은 3000-3570 cm^{-1} 부근에서 OH stretching 흡수 밴드를 관찰하였다. 특히, 940~1120, 560~603 cm^{-1} 에서 orthophosphate(PO_4)를 관찰했다. 합성골에 비해 결정화도가 낮은 이종골의 이식제는 1110 cm^{-1} 영역에서 HPO_4 의 비화학양론적은 hydroxyapatite 구조를 관찰할 수 있었다.¹¹ Figure 2(b)의 분석결과 MC와 XT 조성 하이드로젤에서 3500 cm^{-1} 부근에서 hydroxyl(-OH), 1000 cm^{-1} 부근에서 ester(-COO-)의 존재를 확인하였다. BGM을 함유시킨 MC/XT 하이드로젤에서 각각의 고유 피크 BGM의 OH stretching, orthophosphate(PO_4), HPO_4 와 MC/XT젤의 hydroxyl(-OH), ester(-COO-) 흡수밴드를 관찰할 수 있었다(Figure 2(c)).

표면 형태 평가. 실험에 사용된 BGM과 MC/XT 및 MC/XT-BGM 하이드로젤을 동결 건조하여 표면을 관찰하였다. BGM의 다공성 미세구조를 관찰할 수 있었다(Figure 3(a)).¹² MC/XT 조성 시료는 얇은 층이 겹겹이 쌓여 있는 것을 관찰하였다. BGM이 첨가된 MC/XT 시료에서는 BGM의 입자가 MC/XT 조성 하이드로젤 내에 잘 혼합되어 있는 것을 확인할 수 있었다(Figure 3(c)).

원자력현미경 분석. 표면의 거칠기를 확인하기 위한 분석 방법으로 MC/XT-BGM 하이드로젤의 표면 형태를 관찰하기 위해, AFM을 이용하여 표면의 형태, 표면 고도, 표면 거칠

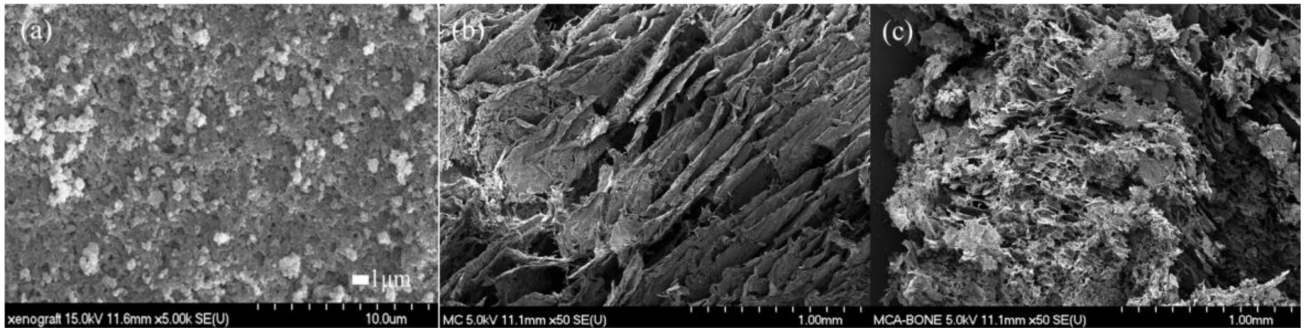


Figure 3. SEM images of the BGM (a); MC/XT gel (b); MC/XT-BGM gel (c) after freezing dry.

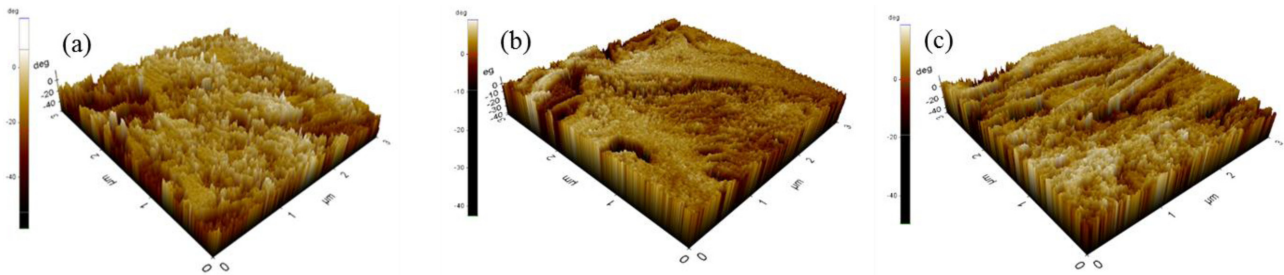


Figure 4. AFM images of the BGM (a); MC/XT gel (b); MC/XT-BGM gel (c) after freezing dry.

Table 1. The Morphological Characteristics of R_z and RMS Using AFM Measurement

Samples	R_z (nm)	RMS (μm)
BGM	774 $\pm$ 32.5	54.05 $\pm$ 5.3
MC/XT	537 $\pm$ 12.26	8.445 $\pm$ 2.3
MC/XT-BGM	413.6 $\pm$ 9.78	33.26 $\pm$ 1.2

R_z : Max. roughness profile height.

RMS: Root mean square.

기를 분석하였다(Figure 4). 그 결과, 표면의 형태는 분말형태의 BGM이 첨가됨에 따라 거칠기가 높아지는 것을 관찰하였다. 표면고도는 BGM 774 nm, MC/XT은 537 nm이며 MC/XT-BGM 하이드로젤의 경우 413.6 nm의 값을 확인할 수 있었다. 표면거칠기(RMS)는 BGM 54.05 μm , MC/XT 하이드로젤은 8.445 μm 이며 MC/XT-BGM 하이드로젤의 경우 33.26 μm 의 값을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 BGM의 나노에서 마이크로의 불균일한 크기의 입자가 표면 고도의 값을 높였고, MC/XT 조성의 수용액에 첨가시켜 제조한 MC/XT-BGM 하이드로젤 표면 거칠기의 증가는 BGM이 수용액젤 내에 함유되어 있음을 알 수 있었다(Table 1).

XRD 분석. XRD 피크의 너비가 넓을수록 저결정성(low crystallinity)이며 좁을수록 고결정성(high crystallinity)을 나타낸다. 소의 뼈에서 합성된 BGM의 XRD 회절피크는 hydroxyapatite 주 피크인 2θ 값 (002), (211), (112), (300)에

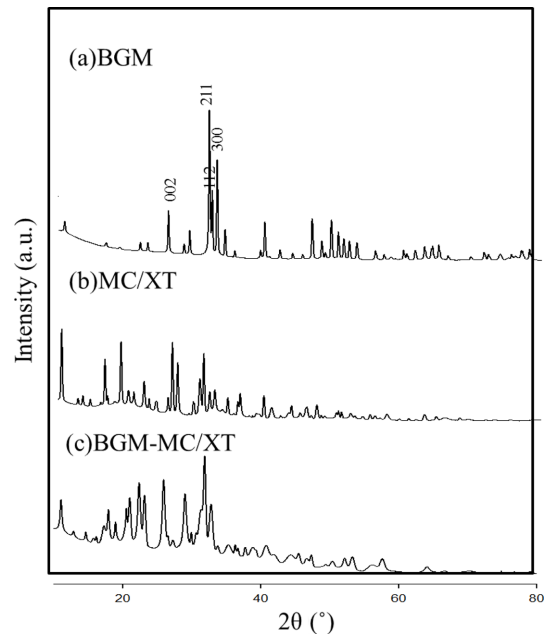


Figure 5. XRD patterns of the BGM (a); MC/XT gel (b); MC/XT-BGM gel (c) after freezing dry.

서 주로 나타났다. BGM은 hydroxyapatite의 구성으로 높은 결정화도를 나타냈으며 높고 좁은 회절피크를 확인할 수 있었다. MC/XT-BGM 하이드로젤 조성의 시료에서도 hydroxyapatite의 주 피크를 확인할 수 있었다(Figure 5).¹³

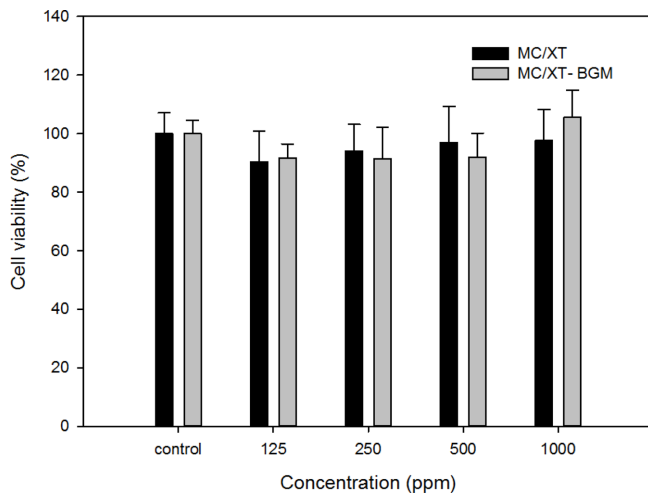


Figure 6. Cell viability *in vitro* in the presence of MC/XT and MC/XT-BGM solutions of different concentrations.

세포독성평가. 세포 생존을 측정은 MTT assay법으로 측정하였다. 독성 평가 결과 모든 그룹에서 80%가 넘는 세포 생존율을 확인할 수 있었다(Figure 6). Aprilia 등의 연구에서 xenograft, hydroxyapatite 그리고 hydroxyapatite-chitosan을 처리한 osteoblastic cell line에서 세포 증식률을 실험한 결과 고분자가 결합된 hydroxyapatite-chitosan 그룹에서 세포 증식률이 높게 나타났다. 또한 hydroxyapatite는 세포증식을 증가시킬 수 있다는 연구보고가 있다.^{14,15}

ALP활성 평가. 일반적인 골 조직에서는 파골세포에 의한 골 흡수 과정과 조골세포에 의한 새로운 골의 형성을 위한 무기질화 과정 중 골 형성에 관여하는 효소인 alkaline phosphatase(ALP)가 활성화되면서 무기질화(mineralization) 과정이 끊임없이 반복적으로 일어난다.¹⁶

MC/XT-BGM 젤은 시중에 판매되고 있는 lyoplant(bovin collagen)막을 처리한 그룹보다 더 높은 ALP 활성 값을 확인하였다(Figure 7). BGM은 골 전구세포들과 신생혈관이 수용부로부터 이식제로 침투해 국소적인 골형성을 한다. 또한 MC는 세포에서 부착 및 증식성, 세포적합성이 높아 hydroxypropyl methylcellulose(HPMC), carboxyl methylcellulose(CMC) 등이 생체 내에 활용되고 있다.^{17,18} 세포와 접착력 및 세포에 영양분이 되는 MC/XT 젤은 무기질화 과정에 영향을 주는 것을 관찰하였다. 세포 이종골이 함유된 MC/XT-BGM 시료에서 2일에는 5.1 ± 0.5 (nmol/min/mg), 7일 후에는 6.65 ± 0.2 (nmol/min/mg)의 값을 확인하였다. 이 결과는 하이드로젤 내에 함유된 BGM이 골모세포 표현형(phenotype) 발현을 향상시키는데 영향을 주는 것을 알 수 있었다. 콜라겐 또한 골을 형성하는 세포에 기능을 가진 활성 물질을 확인할 수 있었다. 하지만, 콜라겐과 hydroxyapatite를 혼합한 연구에서 콜라겐만 처리한 그룹보다 hydroxyapatite를 함유

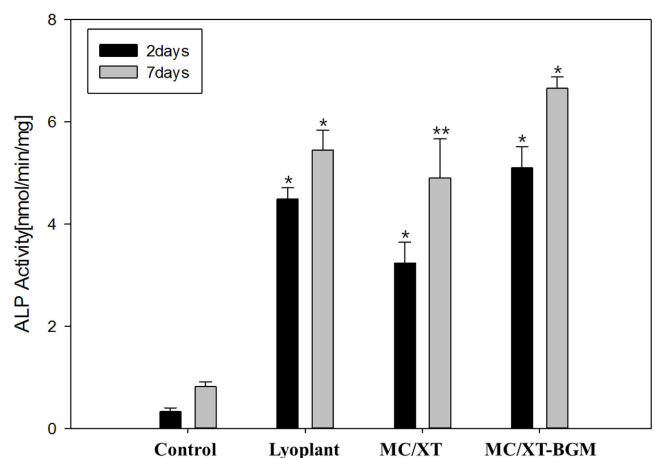
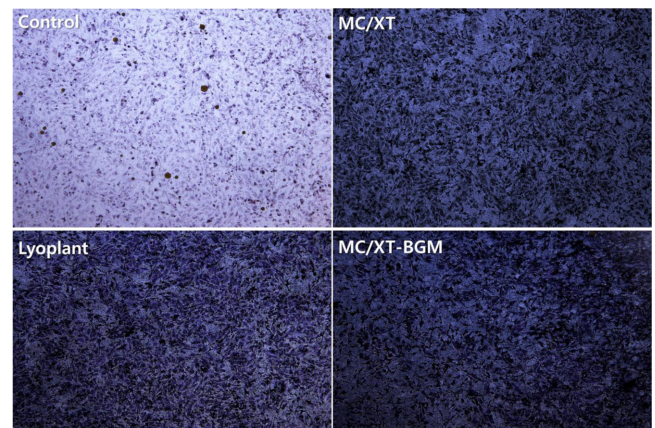


Figure 7. Analysis of alkaline phosphatase activity of cells on MC/XT and MC/XT-BGM solutions. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$ as compared with control and experiment.

시킨 콜라겐 처리 그룹이 3배 이상 ALP 활성이 높은 것이 보고되었다.^{19,20}

석회화 결절 형성 측정. 석회화 결절 형성은 조골세포의 후기 분화 단계의 biomarker로서 alizarin red S(ARS) 염색법을 이용하여 확인할 수 있으며, alizarin은 무기질화된 세포 기질의 칼슘을 염색하므로 석회화 결절을 형성한 정도와 염색 정도가 비례한다. type I 콜라겐 구조를 가진 lyoplant보다 이종골이 함유된 MC/XT BGM 그룹에서 더 높은 석회화 현상이 관찰되었다(Figure 8). MC/XT 조성의 유기소재에서 BGM은 골 재생 결절의 핵생성 속도를 가속화시킨다.²¹ 골 재생을 위한 Becker 등의 연구에서 type I 콜라겐으로 코팅된 티타늄합금을 처리한 골아세포(osteoblastic)의 증식의 연구에서도 콜라겐의 종류에 따라 osteoblastic 세포에 세포 부착과 증식에 영향을 주지 않는다는 연구 보고가 발표되었다.²²

Micro-CT 평가. MC/XT-BGM 하이드로젤을 골 결손부에 처치 후 수술 당일날과 4주 후 Micro-CT로 분석하였다. MC/

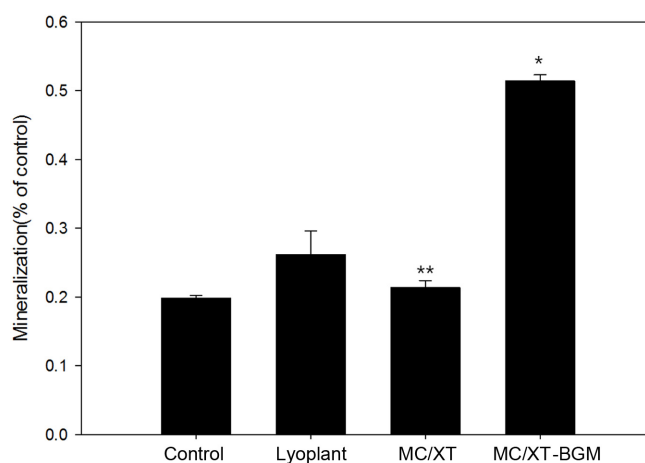
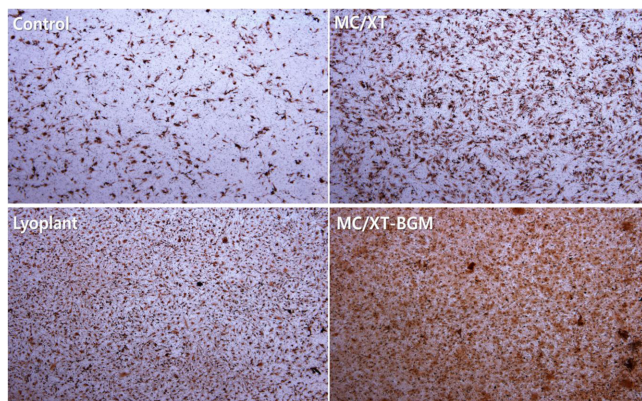


Figure 8. Effects of MC/XT and MC/XT-BGM solutions on bone mineralization in 3T3-E1 osteoblasts-like cell. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$ as compared with control and experiment.

XT-BGM 하이드로젤을 처치한 그룹에서의 BGM이 유동적이지 않고 잘 고정되어 있는 것을 확인하였다(Figure 9(c)). 특히 세포 부착성과 세포 증식에 영향을 주는 MC가 골 결

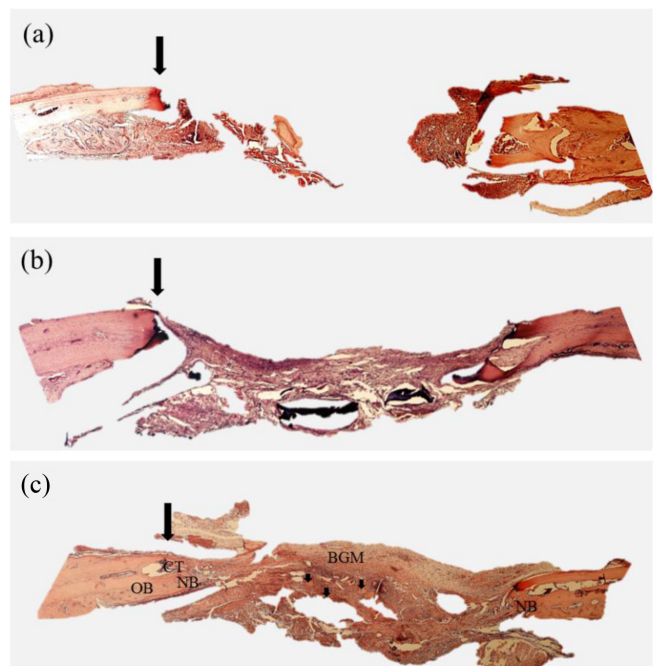


Figure 10. Histologic observation of the MC/XT gel in rat calvarial defects: photograph of control group at 4 weeks (10×) (a); photograph of MC/XT gel implanted group at 4 weeks (10×) (b); photograph of MC/XT-BGM gel implanted group at 4 weeks (10×) (c); NB: new bone; OB: old bone; CT (connective tissue), Arrow: wound edge.

손부에 잘 부착되어 있는 것을 관찰할 수 있었다.⁹ 골 이식재를 첨가하지 않은 군에서는 골 결손부를 확인할 수 있었다(Figure 9(a), 9(b)). 체적 표현(volume rendering) 결과 골 이식재가 첨가되지 않은 그룹의 골 부피(bone volume)는 $18.86 \pm 5.86\%$ 이고, 이식재 함유 그룹에서는 $61.46 \pm 13.53\%$ 값이 산출되었다.



in vivo animal model

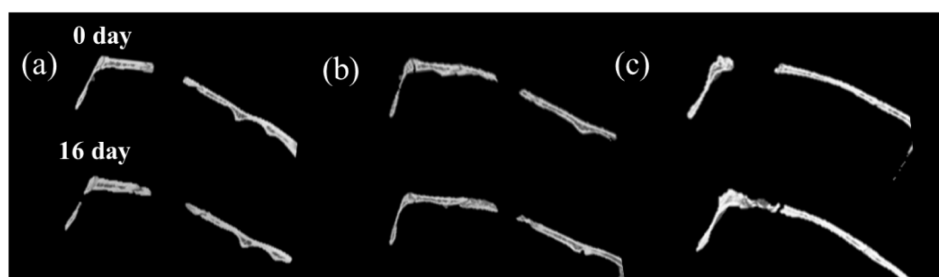


Figure 9. Micro-CT evaluation of bone regeneration in the rat calvarial defects implanted with the non-treatment (a); MC/XT gel (b); MC/XT-BGM gel (c) at 0 and 4 weeks post-implantation. Cross-sectional views of reconstructed images.

조직학적 평가. 4주 후에 대조군과 실험군의 조직학적 평가를 관찰하였다. 결손부의 대부분은 만성 염증 세포의 침윤 및 혈관의 증식이 관찰되었다. 하지만, 아무것도 처리하지 않은 대조군 Figure 10(a)에서 골이식재의 지지를 받지 못한 결손부는 상부 연조직 형성이 미비하며 외관상 오목한 형태가 관찰되었다. MC/XT 하이드로젤을 처리한 그룹에서도 결손부의 변연에 대부분 성긴 결합 조직이 형성되었으며 오목한 형태를 확인할 수 있었다(Figure 10(b)). MC/XT-BGM 하이드로젤을 처리한 그룹에서는 다른 그룹과는 확연하게 결손부 변연부에 대부분 결합 조직 및 이식재를 확인할 수 있었다(Figure 10(c)). 또한 BGM 주변에 골모세포들이 관찰되었다. 골유도재생술 때 쓰이는 차폐막의 기능으로 생체적합성, 세포차단성, 창상 고점력, 그리고 재생공간의 유지능력이 있어야 한다.²³⁻²⁵ MC/XT-BGM 하이드로젤은 생체적합성, 재생공간의 유지능력을 가지고 있는 것을 확인하였다. 또한 BGM이 골재생을 증가시키는 것을 알 수 있었다. 온도감응형 MC/XT 하이드로젤에 BGM의 다양한 함유량에 따른 골재생 연구가 추가적으로 필요할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 골 재생을 유도하기 위해 BGM이 함유된 주사가 가능한 메틸셀룰로스(methylcellulose, MC)와 잔탄검(xanthan gum, XT)으로 구성된 온도감응형 하이드로젤을 제조하였다. BGM이 함유된 MC/XT 수용액은 37 °C에서 젤로 전이되는 것을 관찰하였고 BGM은 MC/XT 하이드로젤에 안정적으로 분산되어 있는 것을 확인한다. 특히, 조골세포를 이용한 실험에서 BGM 함유 하이드로젤군이 골 형성에 관여하는 alkaline phosphatase(ALP) 활성도를 증가시켰다. 석회화 또한 BGM 함유 하이드로젤군이 더 높은 것을 관찰하였다. 랫을 이용한 동물실험에서 골 이식재가 담지된 온도감응형 하이드로젤에 활용 평가 결과 골 재생 관련 의료용 소재로 활용 가능성을 확인할 수 있었으나 예상보다는 골형성량이 부족함을 관찰할 수 있었다. BGM의 함량에 따른 골재생 연구가 추가적으로 필요로 하며 골결손 부위와 치치되는 부위에 따라 다양한 농도 조절이 가능하며 손쉽게 사용할 수 있어 골재생 및 골결손부에 폭넓게 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글: 이 논문은 2015년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2015H1C1A1035894), 2016년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2016R1A6A3A11935439).

참 고 문 헌

1. D. L. Hoexter. *J. Oral Implantol.*, **28**, 290 (2002).
2. T. N. Vo, A. K. Ekenseair, F. K. Kasper, and A. G. Mikos, *Biomacromolecules*, **15**, 132 (2014).
3. R. Namgung and W. J. Kim, *Biomater. Res.*, **14**, 86 (2010).
4. L. Klouda and A. G. Mikos, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **68**, 34 (2008).
5. K. P. Vercruysse, D. M. Marecak, J. F. Marecek, and G. D. Prestwich, *J. Bioconjug. Chem.*, **8**, 686 (1997).
6. P. A. Ramires and E. Milella, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **13**, 119 (2002). L. Lin, *Macromolecules*, **35**, 5990 (2002).
7. S. Khan, M. Ul-Islam, M. W. Ullah, M. Ikram, F. Subhan, Y. Kim, J. H. Jang, S. Yoon, and J. K. Park, *RCS Adv.*, **103**, 84565 (2015).
8. Z. Liu and P. Yao, *Carbohydr. Polym.*, **132**, 490 (2015).
9. J. Kim, S. Y. Cheon, D. I. Shin, C. M. Lee, and K. Y. Lee, *Polym. Korea*, **41**, 318 (2017).
10. S. E. Stabenfeldt, A. J. Garcia, and M. C. LaPlaca, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **77**, 718 (2006).
11. J. S. Cho, H. S. Kim, S. H. Um, and S. H. Rhee, *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.*, **101**, 855 (2013).
12. F. D. P. Desterro, M. S. Sader, G. D. D. A. Soares, and G. M. V. Jr, *Braz. Dent. J.*, **25**, 282 (2014).
13. A. Kasaj, B. Willershausen, C. Reichert, B. Röhrig, R. Smeets, and M. Schmidt, *J. Oral Sci.*, **50**, 279 (2008).
14. E. W. Bachtar, B. M. Bachtar, B. Abas, N. A. Harsas, N. F. Sadaqah, and R. Aprilia, *Dent. J.*, **43**, 176 (2010).
15. H. J. Koo, E. H. Sohn, and S. C. Kang, *Korean J. Plant Res.*, **26**, 658 (2013).
16. X. Bourges, P. Weiss, G. Daculsi, and G. Legeay, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **299**, 228 (2002).
17. C. H. Chen, C. C. Tsai, W. Chen, F. L. Mi, H. F. Liang, S. C. Chen, and H. W. Sung, *Biomacromolecules*, **7**, 736 (2006).
18. S. C. Rodrigues, C. Salgado, A. Sahu, M. P. Garcia, M. H. Fernandes, and F. Monteiro, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **101A**, 1080 (2013).
19. Y. Chen, Z. Huang, X. Li, S. Li, Z. Zhou, Y. Zhang, Q. L. Feng, and B. Yu, *J. Nanomater.*, **2012**, Article ID 401084 (2012).
20. S. W. Tsai, F. Y. Hsu, and P. L. Chen, *Acta Biomater.*, **4**, 1332 (2008).
21. O. Petrauskaite, P. D. S. Gomes, M. H. Fernandes, G. Juodzbalys, A. Stumbras, J. Maminskas, J. Liesiene, and M. Cicciù, *Biomed. Res. Int.*, **2013**, Article ID 452750 (2013).
22. D. Becker, U. Geißler, U. Hempel, S. Bierbaum, D. Scharnweber, H. Worch, and K. W. Wenzel, *J. Biomed. Mater. Res.*, **59**, 516 (2001).
23. N. Donos, L. Kostopoulos, and T. Karring, *Clin. Oral Impl. Res.*, **13**, 175 (2002).
24. V. A. Thomas, D. L. Cochran, J. S. Hermann, R. K. Schenk, and D. Buser, *Clin. Oral Impl. Res.*, **12**, 260 (2001).