2014년 2월

碩士學位論文

# 플라즈마 중합반응에 의해 개질된 폴리카프로락톤 스캐폴드에 BMP-2 모방 펩타이드 고정화에 관한 연구

# 조선대학교 대학원

# 치 의 학 과

# 전 진 표

# 플라즈마 중합반응에 의해 개질된 폴리카프로락톤 스캐폴드에 BMP-2 모방 펩타이드 고정화에 관한 연구

Immobilization of bone morphogenetic protein-2 mimetic peptide on polycaprolactone scaffolds with modified plasma polymerization

2014年 2月 25日

조선대학교 대학원 치의학과

전 진 표

# 플라즈마 중합반응에 의해 개질된 폴리카프로락톤 스캐폴드에 BMP-2 모방 펩타이드 고정화에 관한 연구

지도교수 고 영 무

이 논문을 치의학 석사학위신청 논문으로 제출함.

2013年 10月

조선대학교 대학원

치의학과

전 진 표

# 전진표의 석사학위 논문을 인준함

위원	월 장	조선대학교	교수	김	B	년이	Ęр
위	원	조선대학교	교수	01	田の	진	ĘП
위	원	조선대학교	교수	고	පි	무	印

2013年 11月

# 조선대학교 대학원

	목 차		
ABS	STRACT	••••	iv
제	1장 서 론	•••••	1
제	2장 실험재료 및 방법	•••••	3
	제 1절 3차원 PCL 스캐폴드 제조	•••	3
	제 2절 아크릴산 플라즈마 표면처리	•••	7
	제 3절 BMP-2 모방 펩타이드 고정화	•••	9
	제 4절 표면분석	•••	11
	제 5절 조골모세포 배양	•••	12
	제 6절 조골모세포 증식	•••	13
	제 7절 조골모세포 분화	•••	14
	제 8절 조골모세포 부착	•••	15
	제 9절 통계학적 분석	•••	16
제	3장 실험결과 및 고찰	•••••	17
	제 1적 표명분석	•••	17
	제 2전 조고미세표 조시 민 부하		20
	제 2월 포철도제도 승규 홋 문화		20
제	4장 고찰	••••	26
제	5장 결론	••••	28
참	고 문 헌	••••	29

#### — i —

# LIST OF FIGURES

Fig. 1. 3D Bio-extruder equipment. 4
Fig. 2. The structure of 3D PCL scaffold sample
Fig. 3. The photograph of 3D PCL scaffold sample
Fig. 4. Schematic diagram for plasma device
Fig. 5. The procedure of experimental process
Fig. 6. Water contact angles of untreated PCL scaffold, films and acrylic acid plasma treated PCL scaffold, film at 60 W plasma discharge power.
Fig. 7. ATR-FTIR spectra of (a) PCL, (b) 60 W acrylic acid plasma treated PCL scaffold, (c) BMP-2 peptide 10ng/ml immobilized PCL scaffold, and (d) BMP-2 peptide 100ng/ml immobilized PCL scaffold 19
Fig. 8. SEM micrographs of the MC3T3-E1 cell seeded on (a-c) PCL, (d-f) 60 W acrylic acid plasma treated PCL scaffold, (g-i) BMP-2 peptide 10ng/ml immobilized PCL scaffold, and (j-l) BMP-2 peptide 100ng/ml immobilized PCL scaffold for 2 days 22
Fig. 9. The proliferations of MC3T3-E1 cell seeded on pristine PCL scaffold and surface modified scaffolds for 1, 3, and 6 days (*P<0.05, **P<0.01)
Fig. 10. ALP activity of the MC3T3-E1 cell seeded on pristine PCL

scaffold and surface modified scaffolds for 7 and 14 days..... 24

# ABSTRACT

# Immobilization of bone morphogenetic protein-2 mimetic peptide on polycaprolactone scaffolds with modified plasma polymerization

Jin-Pyo Jeon, D.D.S, M.S.D Advisor : Prof. Yeong-Mu Ko, D.D.S.,Ph.D. Department of Dental Science Graduate School of Chosun University

In this study, we have acrylic aicd plasma-polymerized on the three-dimensional polycaprolactone (3D PCL) scaffolds surface and then immobilized the bone morphogenic protein-2 (BMP-2) mimetic peptide on 3D PCL surface to improve the preosteoblast cell differentiation. The 3D PCL scaffolds were fabricated by bio-extruder equipment. Acrylic acid plasma polymerization (PPAAc) was carried out at a discharge powers of 60W, 40 mTorr for 3 min. The BMP-2 peptide was immobilized in EDC/NHS and BMP-2 peptide solution via amide covalent bonding. The chemical composition and morphology of PPAAc 3D PCL scaffolds surfaces were characterized by water contact angles, scanning electron microscopy, and Fourier Transfer Infrared. The proliferation and differentiation of MC3T3-E1 preosteoblast cell cultured on the control and experimental groups were evaluated by MTT assay and alkaline phosphatase activity, respectively. To observe the cell morphology, fluorescence microscope was used.

The current findings, the following results were drawn.

1) The PPAAc technique was provided poly acrylic acid thin films containing the carboxyl groups on 3D PCL scaffolds surface.

– iv –

- 2) The PPAAc 3D PCL scaffolds surface showed the hydrophilic surface property.
- 3) The immobilization of BMP-2 peptide on PPAAc 3D PCL scaffolds surface was identified as amide bonding peaks via FTIR spectra.
- 4) The *in vitro* cell test showed that BMP-2 peptide immobilized 3D PCL scaffolds had a beneficial effect on MC3T3-E1 cell proliferation and differentiation.

From this point of view, the BMP-2 mimetic peptide immobilized 3D PCL scaffolds are expected to be useful for scaffolds in bone tissue engineering application.

# 제 1 장 서 론

골 형성 단백질 (Bone Morphogenetic Proteins, BMPs)은 골 형성에 직접적 으로 관여하는 강력한 유도인자로서 형질전환증식인자 (TGF-β) super family군에 속한다. 골 형성 단백질은 종양, 외상, 골절 등에 의한 골 결손 부(bone defect)를 재생하기 위해서 골 형성 단백질-2 (Bone Morphogenetic Protein-2)는 많이 사용되고 있는 단백질이며. 자연 골절의 치유에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 골 형성의 형식에는 연골성 골형성, 결합 조직성 골형성, 전조직 골형성의 3가지가 있다. 골격조직을 재생하기 위한 골 유도과정에 필수적인 요소들을 조절하여 MC3T3-E1 세포로부터 골아세포의 증식을 촉진하고 골기질의 생합성을 도움으로써 골 형성을 증진시키는 역할 을 한다(Cook 등, 1994; Laurencin 등, 2001). 이중에서 핵심 펩타이드 서 열은 골 재생의 관점에서 BMPs의 활성을 모방할 수 있다. 그러나 최근 사람 에 있어서 골절부위의 융합을 위한 재조합 BMP 단백 사용 시 골절부의 융합 실패가 일어날 수 있음이 보고되었다(Winn 등, 2000). 그 이유로는 반감기 (half-life)가 짧고, 체액(body fluid)상에서 빠른 확산(diffusion), 골절 부위에서는 BMP에 잘 반응하는 전구세포의 수가 적으며, BMP 작용을 극대화 시킬 수 있는 부가적인 요소(성장인자 포함)가 결여되어 있다는 점이 제기되 었다(Franceschi 등, 2004(a)). 조직공학은 조직 기능을 복구하거나 유지하 고 향상시키는 생물학적 대체물의 개발을 engineering과 life science의 원 리에 적용하는 학문 영역으로, 여기서 생체재료는 세포 부착과 생장, 증식, 분화, 새로운 3차원 조직 형성을 위한 matrix로서의 역할을 하여야한다(Lu 등, 2004; Edwards 등, 2004; Smith와 Ma, 2004).

폴리카프로락톤(Polycaprolactone, PCL)은 현재 대표적인 생분해성 고분자 가운데 하나로서 기타 고분자들과의 친화성(compatibility)이 우수하며, 무 독성, 기계적 강도가 우수하고 가공성이 용이하여 조직공학 및 의료분야에 사용되고 있으며, 이러한 이유로 model polymer로도 선택되어오고 있다 (Yoshimoto 등, 2003; Ratner 등, 1996; Lindo 등, 2006). 지지체의 제조에 많이 사용되는 방법으로는 염추출법(particulate leaching), 상분리법(phase separation), 이산화 탄소를 이용한 고압기체 팽창법(high pressure gas saturation), 유화동결 건조법(Emulsion freeze drying), 섬유 압착법(Fiber bonding)등의 방법은 원하는 자유 형상이나 공극의 크기 및 모양을 얻기가 어려울 뿐만 아니라 공극끼리의 내부 연결성이 보장되지 않을 수 있다는 단 점을 가지고 있고 이용되는 재료나 합성물 간의 독성이 문제시 될 수 있으며 제작방법의 공정이 복잡해질 수 있는 문제점을 지니고 있다.

이에 따라 본 연구에서는 공극의 크기 및 구조, 연결성 등 공극을 제어할 수 있는 RP(Rapid Prototyping)법을 이용한 쾌속조형기에 의한 PCL 스캐폴드 를 제조하여 사용하였다. 플라즈마를 이용한 표면개질기술은 세포의 분화 및 부착을 증진시키기 위해 생체재료표면을 화학적으로 변화시키는 기술법으로 현재 생체 의공학 분야에 널리 사용되고 있다(Rammelt 등, 2006(a); Barder 등, 2006; Schuler 등, 2006; Petrie 등, 2006; Elmengaard 등, 2005). 특 히, 플라즈마 중합기술로 증착된 반응기(카르복실기, 아민기, 하이드록실기, 술폰기 등)는 재료표면에 존재하면서 생체활성 물질 및 생체단백질과 공유결 합 및 정전기적 결합에 의한 고정화에 매우 유용한 기술로 알려져 있다 (Rammelt 등, 2006(b); Detomaso 등, 2005).

본 연구에서는 아크릴산 (Acrylic acid) 플라즈마 중합반응을 이용하여 PCL 스캐폴드 표면의 친수성과 생체적합성을 향상시키고, 플라즈마 표면 개질된 PCL 스캐폴드 표면에 BMP-2 모방 펩타이드를 고정화시켜 표면의 물리화학적 특성과 조골모세포인 MC3T3-E1 세포를 이용한 세포분화 특성을 평가하고자 하였다.

# 제 2 장 실험재료 및 방법

### 제 1 절 3차원 PCL 스캐폴드 제조

본 실험에서 사용되는 3차원 스캐폴드는 쾌속조형기반(Rapid Prototyping: RP) 3 차원 바이오 플로팅 시스템을 이용하여 제조하였다(Fig. 1). 먼저 Polycaprolactone (PCL, Sigma-Aldrich, Mw: 45,000)을 쾌속조형기반 장치의 실린더에 넣고 고온으로 가열한 후 직경 20 mm, 높이 2 mm, pore size 250 µm, degree 45°의 원형 모양의 스캐폴드를 제조하여 시료로 사용하였다. Fig. 2는 3차원 PCL 스캐폴드 구조의 모식도이다. (기공 250µm, 간격 150 µm)

Fig. 3은 3차원 PCL 스캐폴드 샘플의 광학적인 사진을 나타낸 것이다. 또한 접촉각 측정을 위한 PCL 필름을 제작하기 위하여 PCL 10 wt% (Mw: 45,000)를 클로로포름 (SK chemicals, Korea)에 넣고 60 ℃에서 1시간 교반하였다. 이 용액을 몰드에 넣고 실온에서 용매를 증발시켜 두께가 약 0.2 mm인 PCL 필름 을 제작하여 사용하였다.



Fig. 1. 3D Bio-extruder equipment.





Fig. 2. The structure of 3D PCL scaffold sample.



Fig. 3. The photograph of 3D PCL scaffold sample.

## 제 2 절 아크릴산 플라즈마 표면처리

플라즈마 반응장치의 구성도는 Fig. 4에 나타내었다. 플라즈마 중합반응 시 모노머는 아크릴산 (Acrylic acid; 99.5%, Sigma-Aldrich, USA)를 사용하 였고, 플라즈마 중합에 RF(radio frequency) 13.56 MHz의 축전 결합형 플라 즈마(Capacitively Coupled Plasma; CCP)타입의 장비(PLASMART Inc. Korea) 를 사용하였다. 325 mm 직경과 175 mm 높이의 진공 챔버는 로타리 펌프로 최 대 1x10<sup>-3</sup> Torr 진공도를 유지하였다. 시료대는 상부 전극으로부터 30 mm 떨 어진 곳에 위치한다. 플라즈마 표면개질 중합반응은 모노머의 증기압과 챔버 내부 반응압력을 40 mTorr로 유지한 후, 60 W 로 3분 동안 수행하였다. 처리 된 PCL 스캐폴드는 3차 증류수로 표면을 세정하고, 진공오븐에서 60 ℃로 24 시간 동안 건조하여 시료로 사용하였다.



Fig. 4. Schematic diagram for plasma device.

## 제 3 절 BMP-2 모방 펩타이드 고정화

BMP-2 모방 펩타이드는 20 아미노 염기서열을 가진(P-4; 73-92 peptide; KIPKA - SSVPT - ELSAI - STLYL, Peptron, Daejeon, Korea)을 사용하였다 (Saito 등, 2003; 2004). 백색의 분말로 되어있는 1.0 mg의 BMP-2 모방 펩타 이드를 PCL 스캐폴드 표면에 고정화하기 위하여 펩타이드의 최종농도는 10 맞추었다. 공유결합으로 고정화하기 100 ng/ml로 위해 1-ethyl-3-dimethylaminopropyl carbodiimide (EDC) / N-hydroxysuccinimide (NHS)를 PH 6.0, 50 mM MES buffer에 4/1의 중량 비율로 제조한 용액에 PCL 스캐폴드를 3 시간 동안 반응시켰다. 반응시킨 PCL 스캐폴드를 꺼내서 3차 증류수로 세척을 한 후 건조하였고 그 후 12 well plate에 PCL 스캐폴드를 넣은 후 BMP-2 펩타이드를 각각 농도별로 2 ml 씩 첨가하였다. 그 다음 PCL 스캐폴드를 24 시간 동안 실온에서 교반하였다. 교반 후 PCL 스캐폴드를 꺼 내서 3차 증류수로 세척을 한 후 건조하였다. Fig. 5는 BMP-2 펩타이드 고정 화 과정을 모식화한 그림이다.



Fig. 5. The procedure of experimental process.

## 제 4 절 표면분석

3차원 PCL 스캐폴드 및 아크릴산 플라즈마 표면개질 처리 된 PCL 스캐폴드 를 각각 준비하여 60℃에서 24시간 건조한 후 접촉각을 측정하였다. 각 시편 의 접촉각 변화를 관찰하기 위하여 증류수 약 5 ሥể를 시편에 떨어뜨린 후, 접촉각 측정기 (GSA, Surfacetech, Korea)로 5초 후에 접촉각을 측정하였다. 주사전자현미경(SEM: scanning electron microscopy, SNE-3200M, SEC, Korea)을 이용하여 아크릴산(Acrylic acid: AA) 플라즈마 표면개질 된 PCL 스캐폴드와 아크릴산 표면개질 처리 후 BMP-2 펩타이드를 고정화한 PCL 스캐 폴드 표면형상을 관찰하였다.

아크릴산 표면개질 처리 된 티타늄 표면의 카르복실기와 BMP-2 펩타이드의 아민과의 아미드 결합을 확인하기 위하여 전반사 퓨리에 변환 적외선 분광기 (Attenuated Total Reflection Fourier-Transform Infrared spectroscopy, ATR-FTIR spectrum Nicolet 380 / 6700, Thermo scientific, USA)를 이용하 였다.

# 제 5 절 조골모세포 배양

본 실험에 사용된 세포는 생쥐 두개골에서 유래한 조골모세포 MC3T3-E1을 ATCC에 구입하여 사용하였고, 세포배양은 α-MEM (alpha minimum essential medium with ribonucleosides, deoxyribonucleosides, 2mM L-glutamine and 1mM sodium pyruvate, but without ascorbic acid/GIBCO, Custom Product, Catalog NO. A1049001)배지에 growth factor를 제공하는 10% (w/v) fetal bovine sereum (FBS, PAA Laboratoris, Inc. A15-751)과 항생제인 100 units/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin이 혼합된 세포배양액을 혼합 하여 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C, 100% 습도가 유지되는 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양 하였다. 그리고 3일 마다 80% confluence 할 때 계대 배양 하여 실험에 사용 하였다.

## 제 6 절 조골모세포 증식

조골모세포 증식은 MTT assay를 이용하여 평가하였으며, 다음과 같은 방법 으로 수행하였다. 배양된 MC3T3-E1 세포는 α-MEM 배지를 모두 제거한 후 PBS (Phosphate buffered saline, Sigma, USA)를 이용하여 세척하였으며 trypsin/EDTA를 소량 첨가하여 배양접시로부터 분리시켰다. 분리된 세포에 FBS가 포함된 배지를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 원심분리기를 이용하여 세포를 수집하였다. 세포에 배지를 첨가하여 다시 부유 시킨 후 준비된 샘플 이 첨가된 12-well plate에 각각 1 × 10<sup>5</sup> cells/well을 파종하였다. 1, 3, 6일이 되면 MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide, Sigma-aldrich, M2128)시약을 각 well 당 100  $\mu$  첨가하여 청자색의 결정이 생성되는 것을 확인하였다. 4 시간 후 DMSO (dimethyl sulfoxide, Junsei, 35535-0350)를 1,000  $\mu$ /well을 넣은 후 실온에서 30 분간 배양하였다.

흡광도를 측정하기 위해 반응액을 96-well plate에 각각 200 ₩씩 분주한 후 ELISA reader(Thermal Fisher SCIENTIFIC)를 이용하여 540 mm에서 흡광도 를 측정하였다.

## 제 7 절 조골모세포 분화

MC3T3-E1 세포 배양 24시간 후 분화배지로 교체하고 2일 마다 분화배지를 교체하였다. 일주일 후 well plate에 cell media를 제거하고 PBS로 2회 세 척한 후 세포 lysis buffer를 well당 150 #2씩 넣어서 20분 간 wise mix를 이용하여 교반하였다. 스크레퍼를 이용하여 well내에 존재하는 세포를 추출 하여 microtube에 담근 후 4℃, 2500 rpm에서 10분 동안 원심분리하고 상층 액을 새로운 microtube에 옮겨주고 냉동보관 하였다. 30분 동안 37℃에서 상 층액이 담긴 microtube를 배양 후 1.2N NaOH 600#2씩 첨가하여 405 nm에서 흡광도를 측정하여 골 분화 표지자인 alkaline phosphatase (ALP) activity 를 계산하였다. 단백질 정량은 1mg/m2 bovine serum albumin (BSA)을 사용하 여 표준용액을 제조한 후 측정하고자 하는 단백질을 증류수로 희석하여 20 #2로 제조하여 5분간 배양 후 592 nm에서 흡광도를 측정하고, 표준정량곡선 으로부터 단백질의 농도를 결정하였다.

## 제 8 절 조골모세포 부착

1. 주사전자현미경에 의한 관찰을 위한 세포 전처리

플라즈마와 BMP-2 펩타이드 고정화 처리한 샘플이 담겨진 12 well plate에 배양된 MC3T3-E1 세포를 2× 10<sup>5</sup> cells/mL의 농도로 파종하였다. 그리고 48 시간이 지나면 2.5 %의 Paraformaldehyde(Electron Microscopy Sciences 15714)와 Glutaraldehyde(SIGMA ALDRICH G5882)의 혼합용액으로 2시간 전 고 정을 하여주었고 10분 동안 PBS을 이용하여 세척하여 준 후 Osmium tetroxide(SIGMA ALDRICH 201030)를 이용하여 30분 동안 후 고정을 진행하였 다. 70%, 90%, 95%, 100% 알콜을 준비하여 건조시켜 주었고 HMDS(Fluka 52619)를 이용하여 샘플 위에 남아있는 알콜을 제거하였다.

2. 형광현미경에 의한 관찰을 위한 세포 전처리

플라즈마와 BMP-2 펩타이드 고정화 처리한 샘플이 담겨진 12 well plate에 배양된 MC3T3-E1 세포를 1× 10<sup>5</sup> cells/mL의 농도로 파종하였다. 48시간이 지나면 4% Paraformaldehyde(Electron Microscopy Sciences 15714) 용액을 이용하여 세포를 고정하여 준 후 5분 동안 PBS를 이용하여 세척하였다. 0.1% Triton X-100(T1020, 바이오 세상)과 1% BSA(SIGMA A9647) 용액을 이용하여 5분 동안 투과 처리하여 주었고 Rhodamine-Phalloidin(Life technologies, R415) 시약을 15분 동안 처리하여 세포를 염색하였다. 3번에 걸쳐 각각 5분 동안 PBS로 세척하여 준 후 세포 핵 염색을 위한 Fluorescence mounting media(VECTOR H-1200)와 함께 3차원 PCL 스캐폴드를 샘플 위에 부착하여 형 광현미경으로 관찰하기 전까지 4℃에서 보관하였다.

# 제 9 절 통계학적 분석

모든 실험 데이터는 T-test 분석을 통하여 신뢰도 95% (\*p<0.05) 내에서 변수의 비교를 통하여 각각의 유의성 차이를 비교하였다.

## 제 3 장 실험결과

#### 제 1 절 표면분석

Fig.6는 접촉각 측정 결과를 나타낸 것이다. PCL 스캐폴드와 PCL 필름의 접촉각은 각각 약 71.23°, 74.4°로 나타났다. 아크릴산 플라즈마 중합 처리한 PCL 스캐폴드는 물이 바로 흡수가 되어 측정할 수 없었으며, PCL 필 름의 경우 23.12°로 측정 되어 아크릴산 플라즈마 중합 처리한 PCL 스캐폴 드와 필름의 접촉각이 감소하는 경향을 보였다. 플라즈마 입력 파워 60 W 조 건으로 수행한 이유는 스캐폴드 표면에 생성된 고분자박막에 다량의 극성 카 르복실기를 도입이 가능하고 중합 가교도가 가장 좋았기 때문이다. 친수성 표면은 소수성 표면에 비하여 생체 액, 세포 그리고 조직과의 상호작용이 훨 씬 더 바람직하다고 보고되고 있다(Gupta 등, 2012).

Fig.7는 플라즈마 중합 처리한 아크릴산 박막과 BMP-2 모방 펩타이드가 PCL 스캐폴드에 고정화된 표면의 화학적 결합 상태를 확인하기 위한 ATR-FTIR 스펙트럼이다. (a)는 PCL 스캐폴드 표면의 IR 스펙트럼이고, (b)는 PCL 스캐폴드에 플라즈마 중합 처리한 폴리아크릴산 박막 표면의 IR 스펙트 럼이다. 또한, (c)는 플라즈마 중합 아크릴산 박막 PCL 지지체 표면에 BMP-2 펩타이드 100 ng/ml을 고정화한 IR 스펙트럼이고, (d)의 IR 스펙트럼은 플라 즈마 중합 아크릴산 박막 PCL 스캐폴드 표면에 BMP-2 펩타이드 10 ng/ml을 고정화한 후 분석한 것이다. Fig. 7(b)에서, 플라즈마 중합처리에 의해 생성 된 폴리아크릴산 박막에서 2985-2810 cm<sup>-1</sup>의 C-H stretching, 1714 cm<sup>-1</sup> 부근 에서 C=0 stretching의 특징적인 피크를 확인하였으며, 이러한 결과로 부터 카르복실기의 존재를 확인할 수 있었다. Fig.7(c)에서, 플라즈마 중합 아크 릴산 박막 BMP-2 100 ng/ml 고정화된 PCL 스캐폴드 그룹의 구조에서 3328-3214 cm<sup>-1</sup>, 1661-1583 cm<sup>-1</sup> 피크에서 아미드 결합 (N-H)을 확인할 수 있 었다(Jiang 등, 2010; Kalin 등, 2013; Cheng와 Teoh, 2004).



Fig. 6. Water contact angles of untreated PCL scaffold, films and acrylic acid plasma treated PCL scaffold, film at 60 W plasma discharge power.



Fig. 7. ATR-FTIR spectra of (a) PCL, (b) 60 W acrylic acid plasma treated PCL scaffold, (c) BMP-2 peptide 10 ng/ml immobilized PCL scaffold, and (d) BMP-2 peptide 100 ng/ml immobilized PCL scaffold.

### 제 2 절 조골모세포 증식 및 분화

Fig.8은 주사전자현미경을 이용하여 각각의 PCL 스캐폴드 표면에서 2일 동 안 배양된 조골모세포의 부착을 관찰한 결과이다. Fig.6에서, (a-c)는 PCL 스캐폴드, (d-f)는 PCL PPAAc, (g-i)는 PCL PPAAc/BMP-2 펩타이드 10 ng/ml 그리고 (j-l) PCL PPAAc/BMP-2 펩타이드 100 ng/ml이다. BMP-2 펩타이드 100 ng/ml의 농도에서 가장 세포가 잘 부착 되었다. 플라즈마 중 합 아크릴산 박막이 증착된 PCL 스캐폴드 표면의 형상은 변화를 관찰되지 않았다. 일반적으로 거친 표면은 매끄러운 표면보다 세포 부착, 증식 및 분화 에 유리하다고 알려져 있다(Wong 등, 2013). 표면 친수성과 분화 유도 단백 질은 PCL 스캐폴드 표면의 특성을 개선하여 세포와의 유착을 증가시킬 수 있는 가능성을 in vitro 결과로부터 확인할 수 있었다(Perez 등, 2013).

Fig.9는 PCL 스캐폴드 표면에 플라즈마 중합된 아크릴산 박막을 증착하여 BMP-2 펩타이드 고정화가 MC3T3-E1 세포생존율에 미치는 영향을 평가하 기 위하여 MTT assay를 이용하여 관찰하였다. MTT assay는 세포의 미토콘 드리아 활성과 직접연관이 있는 방법으로 세포의 생존율을 측정할 때 일반적 으로 널리 사용되는 방법이다. 이 실험에서 대조군은 무처리 3차원 PCL 스 캐폴드를 사용하였고, 플라즈마 중합된 아크릴산 박막이 형성된 PCL 스캐폴 드와 플라즈마 중합된 아크릴산 박막 표면에 BMP-2 펩타이드를 고정화한 3 차원 PCL 스캐폴드를 실험군으로 사용하였다. MC3T3-E1 세포 생존율은 대 조군과 실험군 모두 1 일, 3 일, 6 일 동안 배양하였고, 생존율 (%) 계산은 1 일 동안 배양한 대조군의 생세포수를 100 % 로 했을 때 실험군에 생세포 수를 비율로 나타낸 것이다. 세포배양기간이 증가하면서 실험군의 세포생존 율이 증가함을 알 수 있었다. 1 일 배양의 경우에는 모든 시료의 세포증식이 유사한 값을 나타냈으나 3 일째가 되면서 플라즈마 중합 처리 후 BMP-2 펩 타이드를 고정화한 시료의 세포 증식율이 크게 증가하였다. 6 일째가 되면서 대조군과 실험군 모두 세포증식률은 증가하는 경향을 보였으나, 플라즈마 중 합된 아크릴산 박막이 증착된 시료와 BMP-2 펩타이드가 고정화된 시료가 대조군에 비하여 높은 것을 확인할 수 있었다. 결론적으로 표면이 존재하는

카르복실기와 BMP-2 펩타이드가 MC3T3-E1 세포의 증식에 가장 큰 영향을 미치고 있다는 사실을 알 수 있었다(Ma 등, 2007; Myung 등, 2013).

Fig.10은 PCL 스캐폴드 표면에 플라즈마 중합된 아크릴산 박막을 증착하 여 BMP-2 펩타이드를 고정화된 표면에 MC3T3-E1 세포를 이용하여 ALP 활성도를 관찰한 결과이다. 관찰결과 7 일과 14 일 모두 ALP 활성도가 증가 한 것을 확인할 수 있었다. 이는 BMP-2 펩타이드가 MC3T3-E1 조골 세포 를 골세포로 분화되는 것을 촉진함으로서 ALP 활성이 증가한 것을 알 수 있 었다(Seo 등,2010).

Fig. 11은 MC3T3-E1 세포의 형광 사진을 나타낸 것이다. 팔로이딘-로다 민과 DAPI로 세포의 핵과 세포골격을 염색하여 세포의 성장 상태를 자세하 게 관찰할 수 있었다. 플라즈마 중합 아크릴산 박막으로 인해 친수성으로 변 한 PCL 스캐폴드 표면에 BMP-2 펩타이드를 고정화 되어진 샘플 표면에 있 는 세포들은 크고, 세포 수도 많이 볼 수 있는 반면에 PCL 스캐폴드와 PCL 스캐폴드에 플라즈마 중합 아크릴산 박막으로만 코팅된 그룹에서는 감소한 경향을 관찰 할 수 있었다. 플라즈마 중합 아크릴산 박막의 음전하 카르복실 기로부터 BMP-2 펩타이드의 생체분자의 고정화는 세포의 부착과 성장에 효 과를 나타냄을 알 수 있다(Jung 등, 2012).



Fig. 8. SEM micrographs of the MC3T3-E1 cell seeded on (a-c) PCL, (d-f) 60 W acrylic acid plasma treated PCL scaffold, (g-i) BMP-2 peptide 10ng/ml immobilized PCL scaffold, and (j-l) BMP-2 peptide 100ng/ml immobilized PCL scaffold for 2 days.



Fig. 9. The proliferations of MC3T3-E1 cell seeded on pristine PCL scaffold and surface modified scaffolds for 1, 3, and 6 days (\*P<0.05, \*\*P<0.01).



Fig. 10. ALP activity of the MC3T3-E1 cell seeded on pristine PCL scaffold and surface modified scaffolds for 7 and 14 days.



Fig. 11. Fluorescence images of the MC3T3-E1 cell seeded on (a-c) PCL, (d-f) 60 W acrylic acid plasma treated PCL scaffold, (g-i) BMP-2 peptide 10ng/ml immobilized PCL scaffold, and (j-l) BMP-2 peptide 100ng/ml immobilized PCL scaffold for 2 days.

### 제 4 장 고찰

골 형성과 발달에 관여하는 것으로 알려진 성장인자는 크게 BMPs. transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), insulin growth factor (IGF), fibroblast growth factor(FGF), platelet derived growth factor(PDGF), Interleukin-1, tumor necrosis factor-α(TNF-α), Interleukin-8 등이 있 는데 이중 BMP는 1965년 Urist에 의해 골형성이 처음 보고되고 BMP로 명명된 이래 많은 연구가 진행되고 있다(Urist 등, 1965). 그중 BMP-2가 효과가 가 장 뛰어나다고 알려져 있으며(Bubnoff와 Cho, 2001), BMP-2는 골모세포의 골 형성 단백 phenotype의 증가를 유도하는데 단지 분화된 골모세포만 영향을 미치는 게 아니라 미분화성 골전구세포에도 영향을 미쳐서 골모세포로의 분 화를 유도한다(Lieberman 등, 1998). BMP-2는 조절인자로서 골 재생을 유도 할수 (Yamashita 등, 1995). 그러나 높은 가격 때문에 광범위한 골절 및 골 결손 부위의 치료에 큰 장애 요소로 작용하고 있는 것이 현실이다(Franceschi 등, 2004). 그래서 이를 극복하기 위하여 단백질 활성부 모방기술 (protein epitope mimetics, PEMs)을 도입하여 BMP-2 유래의 활성 펩타이드를 개발하 고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다(Conte 등, 1999; Sillerud와 Larson, 2005), 생체재료표면에 생체분자의 고정화는 세포와 생체재료사이의 계면에 생체분자들이 부착 및 유지되게 한다. 이것은 세포의 거동을 원하는 대로 유도하기 위하여 또는 충분한 기간을 지속하기 위해서는 임계농도에서 성장인자들과 상호결합이 되어야만 하기 때문에 매우 중요하다. 그리고 필요 시에는 생체분자들이 장시간 서서히 방출되는 형태를 유지해야만 한다. 비록 고정화된 생체분자들이 정형외과나 치과용 임플란트와 같은 금속 생체재료와 주변조직사이 계면에 존재하는 세포에서 발생하는 일련의 복잡한 과정을 바 꾸는데 큰 잠재력을 가지고 있다하더라도, 생체재료 표면에 존재하는 관능기 가 부족하면 생체재료 표면의 생체분자 고정화 과정을 복잡하게 만든다. 따 라서 생체재료표면에 관능기를 도입하기위한 기술 중에 플라즈마 기술은 재 료표면을 개질하는데 유용하게 이용되고 있다.

본 연구에서는 3차원 PCL 스캐폴드 표면의 카르복실기는 아크릴산의 플라 즈마 중합에 의하여 도입되었고, 표면에 존재한 카르복실기의 표면밀도는 플 라즈마 입력파워에 의존하는 경향을 보였다. 친수성, 표면형상, 표면전하상 태 그리고 생체적합성과 같은 재료의 표면특성은 플라즈마 표면개질 공정 변 수를 제어함으로서 효과적으로 개질할 수 있다. 에스테르기, 하이드록실기, 카르복실기, 카르보닐기 그리고 아민기와 같은 일부 특별한 관능기는 특별한 화학 반응성을 제공하고, 표면의 물리적인 특성을 변화시킨다. 이러한 관능 기들은 생체분자를 고정화하는데 유리한 표면상태를 제공할 수 있다.

#### 제 5 장 결론

3차원 PCL 스캐폴드 표면에 플라즈마 표면개질법을 이용하여 플라즈마 중 합된 아크릴산 박막을 증착하고, 제 2형 골형성 단백질(BMP-2) 모방 펩타이 드를 고정화 후 표면특성을 관찰하였고, MC3T3-E1 세포를 이용하여 세포 부착 및 분화를 조사하여 다음과 같은 결과를 도출하였다.

- (1) 아크릴산의 플라즈마 중합 최적 입력 파워는 60 W로 3차원 PCL 스캐폴 드 표면에 안정한 카르복실기가 도입된 박막을 증착할 수 있었다.
- (2) 물 접촉각 측정에서 플라즈마 중합된 아크릴산 박막이 코팅된 3차원
  PCL 스캐폴드 표면이 친수성을 나타냄을 알 수 있었다.
- (3) BMP-2 펩타이드를 아크릴산 플라즈마 중합 처리된 3차원 PCL 스캐폴드 표면에 고정화한 후 ATR-FTIR 분석한 결과, 3328-3214 cm<sup>-1</sup>, 1661-1583 cm<sup>-1</sup> 피크에서 아미드결합 (N-H)을 확인하여 BMP-2 펩타이드의 고정화를 확인 할 수 있었다.
- (4) ALP 활성 실험에서 BMP-2 펩타이드 100 ng/ml이 고정화된 3차원 PCL 스캐폴드 에서 MC3T3-E1 조골세포의 분화가 향상되었다.

결론적으로 BMP-2 모방 펩타이드가 고정된 3차원 PCL 스캐폴드는 골 재 생 및 골 융합을 향상시켜 골 조직공학응용에 유용한 바이오소재로써 사용 될 것으로 사료된다.

### 참고문헌

- Barder TA, Gamble LJ, Castner DG, Healy KE (2006). In vitro characterization of peptide-modified p(AAm-co-EG/AAc) IPNcoated titanium implants. *J Orthop Res* 24:1366-1376.
- Bubnoff A, Cho KW (2001). Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network?. *Dev. Biol* 239:1-14.
- Cheng Z, Teoh SH (2004). Surface modification of ultra thin poly (ε -caprolactone) films using acrylic acid and collagen. *Biomaterials* 25:1991-2001.
- Conte LL, Chothia C, Janin J (1999). The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J. Mol. Biol* 285:2177-2198.
- Cook SD, Baffes GC, Wolfe MW, Sampath TK, Rueger DC, Whiteclous TS (1994). The effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of large segmental bone defects. *J Bone Joint Surg* 827-838.
- Detomaso L, Gristina R, Senesi GS, d'Agostino R, Favia P (2005). Stable plasma-deposited acrylic acid surfaces for cell culture applications. *Biomaterials* 26:3831-3841.
- Edwards SL, Mitchell W, Matthews JB, Ingham E, russell SJ (2004). Design of nonwoven scaffold structures for tissue engineering of the anterior cruciate ligament. *Autex Res J* 4(2):86-94.
- Elmengaard B, Bechtold JE, Soballe K (2005). In vivo effects of RGDcoated titanium implants inserted in two bone-gapmodels. *J biomed Mater Res A* 75:249-255.
- Franceschi RT, Yang S, Rutherford RB, Krebsbach PH, Zhao M, Wang D (2004). Gene therapy approaches for bone regeneration. *Cells Tissues Organs* 176:95-108.
- Gupta B, Krishnanand K, Deopura BL (2012). Oxygen plasma-induced graft polymerization of acrylic acid on polycaprolactone monofilament. *Eur Polym J* 48:1940-1948.

- Jiang Z, Jiang Zj, Shi Y, Meng Y (2010). Preparation and characteristics od acrylic acid/styrene composite plasma polymerized membranes. *Appl Surf Sci* 256:6473-6479.
- Jung SC, Lee K, Kim BH (2012). Biocompatibility of plasma polymerized sandblasted large grif and acid titanium surface. *Thin Solid Films* 521:150-154.
- Kalin K, Milena I, Vera M, Iliya R, Nevena M (2013). Modification of electrospun poly(ε-caprolactone) mats by formation of a polyelectrolyte complex between poly(acrylic acid) and quaternized chitosan for tuning of their antibacterial properties. *Eur Polym J* (in press)
- Laurencin CT, Attawia MA, Lu LQ, Borden MD, Lu HH, Gorum WJ, Lieberman JR (2001). Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite delivery of BMP-2-producing cells: a regional gene therapy approach to bone regeneration. *Biomaterials* 1271-1277.
- Lieberman JR, Le LQ, Wu L, Finerman GA, Berk A, Witte ON, Stevenson S (1998). Regional gene therapy with a bmp-2 producing murine stromal cell line induces heterotopic and orthotopic bone formation in rodents. *J Orthop Res* 16(3):330-9.
- Lindo W, Dianying J, Jiandong D (2006). A "room-temperature" injection molding/particulate leaching approach for fabrication of biodegradable three-dimensional porous scaffolds. *Biomaterials* 27:185-191.
- Lu Q, Ganesan K, Simionescu DT, Vyavahare NR (2004). Novel porous aortic elastin and collagen scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 25:5227-5237.
- Ma Z, Mao Z, Gao C (2007). Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering. *Colloid Surface B* 60:137-157.

- Myung SW, Ko YM, Kim BH (2013). Effect of plasma surface functionalization on preosteoblast cells spreading and adhesion on a biomimetic hydroxyapatite layer formed on a titanium surface. *Appl Surf Sci* 287:62-68.
- Perez RA, Won JE, Knowles JC, Kim HW (2013). Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration. *Adv Drug Deliver Rev* 65:471-496.
- Petrie TA, Capadona JR, Reyes CD, Garcia AJ (2006). Integrin specificity and enhanced cellular activities associated with surfaces presenting a recombinant fibronectin fragment compared to RGD supports. *Biomaterials* 27:5459-5470.
- Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE (1996). Biomaterials Science; An introduction to materials in medicine. *Academic Press* 50-69,84-94.
- Rammelt S, Illert T, Bierbaum S, Scharnweber D, Zwipp H, Schneiders W (2006). Coating of titanium implants with collagen,RGD peptide and chondroitin sulfate. *Biomaterials* 27:5561-5571.
- Saito A, Suzuki Y, Ogata S, Ohtsuki C, Tanihara M (2003). Activation of osteo-progenitor cells by a novel synthetic peptide derived from the bonemorphogenetic protein-2 knuckle epitope. *Biochim Biophys Acta* 1651: 60-67.
- Saito A, Suzuki Y, Ogata S, Ohtsuki C, Tanihara M (2004). Prolonged ectopic calcification induced by BMP-2-derived synthetic peptide. J. *Biomed. Mater. Res. A* 70:115-121.
- Schuler M, Owen GR, Hamilton DW, de Wild M, Textor M, Brunette DM (2006). Biomimetic modification of titanium dental implants model surfaces using the RGDSP-peptide sequence: a cell morphology study. *Biomaterials* 27:4003-4015.

Seo Hs, Ko YM, Shim JW, Lim YK, Kook JK, cho DL, Kim BH (2010).

Characterization of bioactive RGD peptide immobilized onto poly(acrylic acid) thin films by plasma polymerization. *Appl Surf Sci* 257:596-602.

- Sillerud LO, Larson RS (2005). Design and structure of peptide and peptidomimetic antagonists of protein-protein interaction. *Curr. Protein. Pept. Sci* 6:151-169.
- Smith LA, Ma PX (2004). Nano-fibrous scaffolds for tissue engineering. Colloid Surface B 39:125-131.
- Urist, M. R (1965). Bone formation by autoinduction. *Science* 12:893-899.
- Winn SR, HU Y, Sfeir C, Hollinger JO (2000). Gene therapy approaches for modulating bone regeneration. *Adv Drug Deliver Rev* 42:121-138.
- Wong HM, Wu S, Chu PK, Cheng SH, Keith D.K. Luk, Kenneth M.C. Cheung, Kelvin W.K. Yeung (2013). Low-modulus Mg/PCL hybrid bone substitute for osteoporotic fracture fixation. *Biomaterials* 34:7016-7032.
- Yamashita H, ten Dijke P, Huylebroeck D, Sampath TK, Andries M, Smith JC, Heldin CH, Miyazono K (1995). Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. J Cell Biol 130(1):217-226.
- Yoshimoto H, Shin YM, Terai H, Vacanti JP (2003). A biodegradable nanofiber scaffold by electro-spinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials* 24:2077-2082.