2013년 2월

博士學位論文

폴리카프로락톤 스캐폴드 표면에 플라즈마 코팅된 아크릴산이 생체적합성에 미치는 영향

조선대학교 대학원 치의학과

이 상 준

폴리카프로락톤 스캐폴드 표면에 플라즈마 코팅된 아크릴산이 생체적합성에 미치는 영향

Effect on biocompatibility of plasma coated acrylic acid on to polycaprolactone scaffold surface

2013年 2月 25日

조선대학교 대학원 치의학과

이 상 준

폴리카프로락톤 스캐폴드 표면에 플라즈마 코팅된 아크릴산이 생체적합성에 미치는 영향

지도교수 고 영 무

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2012年 10月

조선대학교 대학원

치의학과

이 상 준

이상준의 박사학위 논문을 인준함

위원장	서울대학교	교수	임	범	순	ĘП
-----	-------	----	---	---	---	----

- 위 원 조선대학교 교수 황 호 길 印
- 위 원 원광대학교 교수 배 지 명 印
- 위 원 조선대학교 교수 김 병 훈 印
- 위 원 조선대학교 교수 고 영 무 印

2012年 12月

조선대학교 대학원

	목	차		
ABSTRACT ·			••••	V
제 1장 서 튼	2		•••••	1
제 2장 실험	재료 및 방법	귘	•••••	3
제 1절	실험재료	•••••	•••••	3
제 2절	플라즈마 표	면처리	•••	6
제 3절	표면분석		•••	8
제 4절	조골모세포	배양	•••	9
제 5절	생체적합성	평가	•••	10
제 3장 실험	결과	•••••••••	•••••	11
제 1절	표면분석		•••	11
제 2절	조골모세포	증식 및 분	화 …	17
제 4장 고찰			•••••	20
제 5장 결론	••••••	• • • • • • • • • • • • • • • •	•••••	22
참 고 문 헌	•••••			23

LIST OF TABLE

Table. 1 Recipe of Simulated Body Fluid (1000 ml).....5

LIST OF FIGURES

Fig. 1. 3D-PCL structure and parameters of the structure

Fig. 2. Schematic diagram of plasma equipment7

Fig. 3. FT-IR spectra of plasma-polymerized acrylic acid film on cover glass. ... cover glass, - 30 W PPAAc, - 30 W PPAAc after immersion in 70 % alcohol solution for 12 hours

Fig. 6. EDS results of 3D PCL and PCL/COOH scaffolds

Fig. 8. ALP activity of the MC3T3-E1 cell seeded on samples surface for 4 days and 7 days 19

ABSTRACT

Effect on biocompatibility of plasma coated acrylic acid on to polycaprolactone scaffold surface

Sang-Jun Lee, D.D.S, M.S.D Director : Prof. Yeong-Mu Ko, D.D.S.,Ph.D. Department of Dental Science Graduate School of Chosun University

Polycaprolactone (PCL) has been widely adopted for biomaterials and biomedical applications due to its slow degradability and good biocompatibility, as well as its good mechanical and thermoplastic characteristics. However, PCL has hydrophobic surface and lacks of functional groups, therefore, it does or can not provide suitable surface for cell adhesion.

In this study, we have deposited poly acrylic acid films on three-dimensional (3D) PCL scaffolds using plasma polymerization and then plasma-polymerized 3D PCL scaffold was immersed into simulated body fluid (SBF) in order to improve the biocompatibility.

The changes in wettability and surface morphology of 3D-PCL surface after plasma treatment were examined by contact angle and field emission scanning electron microscopy. The chemical bonding of acrylic acid plasma polymerized on 3D-PCL surfaces was demonstrated by fourier transform infrared spectroscopy. The biological behaviors were also evaluated for MC3T3-E1 cells proliferation and differentiation using MTT assay and alkaline phosphatase (ALP) activity. The osteo-conductive ability of acrylic acid plasma polymerized on 3D-PCL surfaces was evaluated by SBF immersing test.

From the current findings, the following conclusions were drawn:

- 1) Acrylic acid plasma polymerization on the PCL films showed the formation of hydrophilic film containing carboxyl groups.
- In SBF immersing test, acrylic acid plasma polymerized 3D PCL scaffolds presented excellent hydroxyapatite formation ability than untreated 3D PCL scaffolds.
- Hydroxyapatite coated 3D PCL scaffold showed good proliferation of MC3T3-E1 cells than untreated and plasma-polymerized 3D PCL scaffolds, but the cell differentiation of the experimental group was not significantly different from control group.

These results suggest that the acrylic acid plasma polymerization on the 3D PCL scaffolds has an effect on proliferation of MC3T3-E1 cells and a possibility of potential use in osteo-conductive bone graft scaffolds.

제 1 장 서 론

골 조직공학이란 손상된 생체 골 조직의 복원을 위하여 생체재료를 실제의 골 조직과 유사한 구조와 기능을 가지도록 다공성 지지체로 제조하고 지지체 내에 골 조직 세포를 체외배양 함으로써 인공적으로 골세포와 조직이 형성되 도록 유도하여 인공조직을 형성하고 이를 체내로 이식하여 새로운 골 조직 이 신속하게 재생될 수 있도록 하는 기법을 의미한다.¹⁻³

다공성 지지체 재료로는 고분자 및 세라믹스, 천연재료 등이 이용되며 현 재 많은 연구자들에 의하여 생체적합성이 우수하고, 가공이 용이한 생체재료 인 합성고분자 및 천연고분자를 이용한 연구개발이 활발히 진행되고 있다.^{4.5} 생물을 구성하는 주요 고분자 물질인 단백질에는 콜라겐, 케라틴, 피브린, 키틴, 히알루론산, 펙틴, 알부민 등이 있으며 이들은 천연 고분자에 속한다. 이런 천연고분자는 생체적합성이 우수하고 세포독성을 유발시키지 않으나, 그 자체만으로는 기계적 강도가 약하고 가공이 어려운 단점이 있다. 이에 비 해 합성고분자 중 생분해성 고분자는 기계적 강도조절이 가능하고, 가공이 용이하며, 합성조건에 따라 생분해속도 조절이 가능하므로, 재료를 유용하게 활용할 수 있다.⁶⁻⁹

최근에 쾌속조형법(rapid prototyping; RP)은 고분자 지지체의 설계 및 생 산의 유망한 기술 중에 하나로 부각되고 있다.¹⁰⁻¹² RP기술의 최적화와 이 기 술로 제조된 고분자 지지체에 관한 많은 연구가 지난 수년간 보고되었다.^{13,14} 이러한 고분자 지지체는 100% 상호 연결된 기공들과 높은 다공성, 그리고 컴 퓨터로 제어된 구조형상으로 이루어져 있다. 그러나 이 기술에도 몇 가지 단 점이 있는데, 이것은 실제 세포크기보다 큰 기공크기로 인해 세포 파종효율 이 25-40% 밖에 되지 않고, 고분자지지체에 세포가 골고루 분포되지 않는 점 이다.¹⁵ 골 조직공학적 측면에서 고분자지지체의 세포파종효율은 가장 중요 한 문제이고, 이러한 문제를 해결하는 것은 그리 쉬운 일이 아니다. 왜냐하 면 고분자지지체의 구조적인 문제(기공크기, 형태 등)와 지지체 표면의 성질 (세포-표면 상호작용) 등 여러 가지 요인들이 산재해 있기 때문이다.¹⁶

생분해성 합성고분자의 일종인 폴리카프로락톤(polycaprolactone; PCL)은

장기간의 임상실험에서도 생체 무독성으로 생체적합성이 우수한 재료로 잘 알려져 있다.¹⁷⁻¹⁹ 또한 결정성이 낮아 강도가 약하고 유연성이 매우 좋아, 3 차원 다공성 지지체로 가공이 용이하고 생분해 기간 3-4개월 정도로 길어서 골조직과 같이 자기조직화에 상당한 시간이 요구되는 경우 손상된 부위에 대 한 지지체로 활용을 하기에 적합하며, 다른 소재와의 블렌딩을 통해 다양하 게 적용할 수 있다.²⁰⁻²³ 따라서 PCL 단독 혹은 다른 고분자와 블레딩을 한 재료를 이용하여 RP기법으로 3차원 고분자지지체 제조연구가 활발히 진행되 고 있다.^{24,25} 그러나 PCL 합성고분자 지지체의 표면은 소수성을 가지며 세포 와 상호작용할 수 있는 생물학적 반응기가 없기 때문에 세포부착에서는 좋은 결과를 보여주지 못한다. 그동안 PCL 표면의 친수성과 세포적합성을 향상시 키기 위하여 많은 방법들이 연구되고 있다.^{26,27}

합성고분자 지지체에 카르복실기 (carboxylic acid group)나 아민기 (amine group)와 같이 전하를 띤 기능기를 도입하면 소수성을 가진 지지체의 표면에 친수성을 부가하여 세포친화성을 조절할 수 있다. 또한 이러한 기능 기들은 가교제 (crosslinker)를 이용하여 단백질이나 펩타이드와 같은 생체 활성 분자를 쉽게 고정화시킬 수 있는 장점이 있다.^{28,29}

한편, 플라즈마 표면개질기술은 세포의 부착, 증식 및 분화를 향상시키기 위해 생체재료표면을 화학적으로 변화시키는 기술법으로 현재 생체 의공학 분야에 널리 사용되고 있다.³⁰⁻³² 특히 플라즈마 중합기술로 증착된 반응기(카 르복실기, 아민기, 하이드록실기, 술폰기 등)는 생체재료표면에 존재하면서 생체활성물질 및 단백질과 공유결합에 의한 고정화에 매우 유용한 기술로 알 려져 있다.^{33,34}

따라서 본 연구에서는 플라즈마 표면처리기술을 이용하여 상용으로 시판되 는 3D-PCL 고분자지지체 표면의 친수성과 생체적합성을 향상시키기 위하여 카르복실기가 함유된 고분자 박막층을 형성하고 그 표면의 특성과 유사체액 을 이용하여 골 형성능을 조사하여, 조골모세포의 증식 및 분화특성을 평가 하고자 하였다.

제 2 장 실험재료 및 방법

제 1절. 실험재료

본 실험에서는 상업적으로 사용되는 3D-PCL (3D Biotek, USA)을 사용하였 다. 3D PCL 원판(직경 100 mm, 두께 1.5 mm, fiber 직경 0.1 mm, Fig. 1) 을 직경 0.7×0.7 mm 크기로 가공하여 시료로 사용하였고, 에탄올에 1시간 동안 초음파 세척한 후 3차 탈 이온수에 세정하여 건조하여 사용하였다. 접 촉각 측정을 위한 PCL 필름을 제작하기 위하여 PCL 10 wt% (Mw. 80,000, Sigma-Aldrich)를 클로로포름 (SK chemicals, Korea)에 넣고 60 ℃에서 1 시간 교반하였다. 이 용액을 테프론 몰드에 넣고 실온에서 용매를 증발시켜 두께가 약 0.2 mm인 PCL 필름을 제작하여 사용하였다.

생체유사용액 (simulated body fluid, SBF)은 인간의 혈장 무기이온 농도 와 같은 농도를 갖게 하기 위해 다음과 같이 제조하였다 (Table 1). 항온조를 36.5℃ 로 유지시키면서 700 ml의 증류수를 1 L 용기의 비이커에 넣은 후, NaCl (ER, Junsei, Japan), NaHCO₃ (ER, Junsei, Japan), KCl (ER, Junsei, Japan), K₂HPO₄ 3H₂O (ER, Junsei, Japan), MgCl₂ 6H₂O (ER, Junsei, Japan), CaCl₂ (ER, Junsei, Japan), Na₂SO₄ (ER, Junsei, Japan)의 시약 순서대로 넣으면서 magnetic stirrer로 교반하였다. 최종적으로 비이커 속의 용액의 pH가 36.5℃에서 7.4가 되도록 tris-buffer solution, (Tris(hydroxymethyl) aminomethane, (CH₂OH)₃CNH₂, ER, Junsei, Japan)과 1N-HCl용액을 첨가하여 조절하였다.



Fig. 1. 3D-PCL structure and parameter of the structure.

Order	Reagent	Amount	Container	Purity(%)	Molecular weight
1	NaCl	8.035 g	Weighing paper	99.5	58.4430
2	NaHCO ₃	0.355 g	Weighing paper	99.5	84.0068
3	KCl	0.225 g	Weighing bottle	99.5	74.5515
4	$K_2HPO_4 \bullet 3H_2O$	0.231 g	Weighing bottle	99.0	228.2220
5	$MgCl_2 \bullet 6H_2O$	0.311 g	Weighing bottle	98.0	203.3034
6	1.0 M HCl	39 ml	cylinder	_	_
7	$CaCl_2$	0.292 g	Weighing bottle	95.0	110.9848
8	Na_2SO_4	0.072 g	Weighing bottle	99.0	142.0428
9	Tris	_	_	99.0	121.1356
10	1.0 M HCl	0-5 ml	syringe	—	_

Table 1. Recipe of Simulated Body Fluid (1000 ml)

제 2 절. 플라즈마 표면처리

플라즈마 반응장치의 구성도는 Fig. 2에 나타내었다. 플라즈마 중합에는 RF(radio frequency) 13.56 MHz의 축전 결합형 플라즈마(CCP: capacitively coupled plasma) 타입의 장비(Plasmart Inc. Korea)를 사용하였다. 진공 챔 버는 진공로타리 펌프로 최대 1×10⁻³ Torr 진공도를 유지하였다. 시료는 상 부 전극으로부터 30 mm 떨어진 시료대에 놓았다. 플라즈마 중합 시 모노머 는 아크릴산 (Acrylic acid: 99.5%, Sigma-Aldrich, USA)을 사용하였다. 플 라즈마 중합 전, 3D PCL 스캐폴드 표면의 유기물제거와 표면의 활성화를 부 여하기 위하여 전처리를 실시하였다. 전처리 과정은 아르곤 가스를 20 sccm 의 유량으로 흘려주어 챔버 압력을 1×10⁻²Torr로 유지한 후, 입력파워 150 W를 인가하여 60 초 동안 수행하였다. 이어서 플라즈마 중합반응은 아크릴 산 모노머의 증기를 유입시켜 챔버 압력을 11~12 mTorr로 유지한 후, 입력 파워 30 W를 인가하여 10분 동안 수행하였다. 처리된 샘플은 3 차 증류수로 세정하고, 진공오븐에서 60°C로 24 시간 동안 건조를 실시하였다. 3D PCL 스캐폴드와 커버 글라스 표면에 플라즈마 중합된 아크릴 산 필름을 동시에 증착하고 커버 글라스의 표면을 분석하여 플라즈마 중합 여부를 확인하였다.



Fig. 2. Schematic diagram of plasma equipment.

제 3 절. 표면분석

3D-PCL과 플라즈마 처리된 3D-PCL 시편을 각각 준비하여 30℃에서 24시간 건조한 후 접촉각을 측정하였다. 각 시편의 접촉각 변화를 관찰하기 위하여 증류수 약 5µl를 시편에 떨어뜨린 후, 접촉각 측정기(GSA, Surfacetech, Korea)로 5초 후에 접촉각을 측정하였다.

전계방출주사현미경(FE-SEM: field emission scanning electron microscopy, S-4800, Hitachi, Japan)을 이용하여 3D-PCL 표면과 플라즈마 처리된 3D-PCL 표면의 변화를 관찰하였다.

플라즈마 표면개질 된 3D-PCL 표면의 고분자 박막의 고분자 화학결합을 확 인하기 위하여 퓨리에 변환 적외선 분광기(FT-IR, Fourier-transform infrared spectroscopy, spectrum-400, PerkinElmer, UK)를 이용하였다.

제 4 절. 조골모 세포 배양

본 연구에 사용된 MC3T3-E1 조골모세포는 쥐 두개골에서 유래된 세포주로 서 American Type Culture Collection (ATCC, CRL-2594)에서 구입하였다. 세 포배양은 α-MEM(Alpha Minimum Essential Medium with ribonucleosides, deoxyribonucleosides, 2 mM L-glutamine and 1 mM sodium pyruvate, but without ascorbic acid/GIBCO, Custom Product, Catalog No. A1049001) 배지 에 growth factor를 제공하는 10% (w/v) fetal bovine serum (FBS, PAA Laboratoris.inc A15-751)과 항생제인 amphotericin (Lonza walkersville MD USA 0719)을 혼합하여 5% CO₂가 공급되는 37℃ CO₂ incubator에서 48시간 배 양하였다. 그리고 계대배양을 통해서 얻어진 4세대 세포를 incubator에서 1 일 동안 배양하여 실험에 사용하였다.

제 5 절. 생체적합성 평가

조골모세포 증식평가는 MTT assay를 이용하여 분석하였다. 실험방법은 다 음과 같다. 배양된 세포는 배지를 모두 제거한 후 PBS (Phosphate buffered saline, Sigma, USA) 를 이용하여 세척하였으며 trypsin/EDTA를 소량 첨가하 여 배양접시로부터 분리시켰다. 분리된 세포에 FBS가 포함된 배지를 첨가하 여 반응을 정지시킨 후 원심분리기를 이용하여 세포를 수집하였다. 세포에 배지를 첨가하여 다시 부유 시킨 후 준비된 샘플이 첨가된 12-well plate에 각각 1 × 10⁵ cells/well을 파종하였다. 세포는 MTT를 첨가하여 청자색의 결정이 생성되는 것을 확인한 후 이소프로필알콜(Isopropyl alcohol, Sigma, USA)을 이용하여 용해하였다. 흡광도를 측정하기 위해 반응액을 96-well plate에 각각 200 μL씩 분주한 후 ELISA reader (Thermal Fisher SCIENTIFIC, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율 은 대조군(무 처리 30 PCL 스캐폴드)의 생세포수를 100%로 했을 때 실험군 (플라즈마 처리 30 PCL 스캐폴드)에서 생존한 세포의 비율로 계산하였다.

한편, 조골모세포 분화는 골 분화 표지자인 alkaline phosphatase (ALP)활 성으로 평가하였다. 실험방법은 다음과 같이 수행하였다. MC3T3-E1 세포배양 24시간 후 분화배지로 교체하고 2일마다 분화배지를 교체하였다. 일주일 후 well plate에 넣어 cell media를 제거하고 PBS로 2회 세척한 후, 세포 lysis buffer를 well당 150 μ⁴씩 넣어서 200분간 wise mix를 이용하여 shaking 하 였다. 스크레퍼를 이용하여 well내에 존재하는 세포를 추출하여 microtube에 담근 후, 4℃, 2500 rpm에서 10분 동안 원심분리하고 상층액을 새로운 microtube에 옮겨주고 ice에 보관하였다. 30분 동안 37℃에서 튜브를 배양한 후, 1.2 N NaOH 600 µ | 씩 첨가하여 405 nm에서 흡광도를 측정하여 ALP활성 을 계산하였다. 단백질 정량은 1 mg/ml BSA를 사용하여 표준용액을 제조한 후 592 nm에서 흡광도를 측정하였고, 표준정량곡선으로부터 단백질 농도를 결정하였다.

제 3 장 실험결과

제 1 절. 표면분석

Fig. 3은 FT-IR을 이용하여 플라즈마 중합된 폴리아크릴산 필름의 화학구 조를 관찰한 결과이다. 점선은 cover glass의 IR 스펙트럼이고, 가는 실선은 플라즈마 중합된 아크릴산 필름의 IR 스펙트럼이다. 그리고 굵은 실선의 IR 스펙트럼은 플라즈마 중합된 아크릴산 필름을 70 % 에탄올 용액에 12 시간 침전 후 건조시켜 측정한 것이다. 플라즈마 처리 후 3000-2850 cm⁻¹에서 C-H stretching, 3600-2400cm⁻¹에서 매우 broad하게 카르복실성 O-H stretching(알코올성 O-H는 3500-3200 cm⁻¹), 그리고 1300-1000 cm⁻¹에서 C-O stretching과 1720 cm⁻¹부근에서 C=O stretching에 의한 특징적인 피 크를 확인하였으며, 이는 아크릴산 모노머를 이용한 플라즈마 중합을 통하여 3D PCL 스캐폴드 표면에 카르복실기가 잘 형성되었음을 확인할 수 있었다. 70% 알콜에서 12시간 침지 후 분석결과, 침지 전과 유사한 스펙트럼을 나타 내어 본 실험의 중합 조건에서 얻어진 폴리아크릴산 필름의 용매에 대한 안 정성 또한 확인할 수 있었다.

PCL 필름 표면의 친수성 변화여부를 확인하기 위하여 플라즈마 중합 처리 전후의 PCL 필름 표면, 플라즈마 중합 처리 후 하이드록시아파타이트가 코팅 된 시료 표면의 접촉각을 측정하여 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 플라즈 마 중합 처리 전 PCL 필름의 접촉각은 약 65.3°, 플라즈마 중합 처리 후 약 37.3°, 하이드록시아파타이트 코팅 후 16.4°로 친수성으로 변화하였음을 확인할 수 있었다.

Fig. 5는 인체유사체액에 시료를 1일, 3일, 5일 침지 후 전게방출주사전자 현미경을 이용하여 관찰한 결과이다. 1일 경과 후 대조군인 3D PCL 스캐폴 드의 표면은 알갱이 형태의 하이드록시아파타이트 입자들이 부분적으로 형성 되어 있는 것을 확인할 수 있었고, 플라즈마 처리된 3D PCL 스캐폴드도 부 분적으로 형성되었으나 대조군에 비해 많이 형성되었음을 확인할 수 있었다. 3 일 이후 3D PCL 스캐폴드의 표면은 하이드록시아파타이트 입자들이 1 일 에 비해 약간 증가하였으나 많은 차이를 발견할 수 없었으며 플라즈마 처리 된 3D PCL 스캐폴드의 표면은 하이드록시아파타이트 입자들로 거의 코팅된 모습을 발견할 수 있었다. 5일 경과 후 3D PCL 스캐폴드의 표면에도 하이드 록시아파타이트 입자들이 형성되기는 하였으나 플라즈마처리 한 시료에 비해 적은 경향을 나타내었다. 확대 사진에서 표면에 성장한 나노 크기의 하이드 록시아파타이트 결정들을 볼 수 있었다.

Fig. 6의 EDS 결과는 Ca와 P 원소 함량 차이를 보여줌으로서 플라즈마 처리된 3D PCL 스캐폴드 표면에 하이드록시아파타이트가 많이 코팅되어 있 음을 확인 할 수 있었다.



Fig. 3. FT-IR spectra of plasma-polymerized acrylic acid film on cover glass. ... cover glass, - 30 W PPAAc, - 30 W PPAAc after immersion in 70 % alcohol solution for 12 hours.



Fig. 4. Water contact angles of PCL, PCL/COOH and PCL/COOH/HAp PCL films.



Fig. 5. Scanning electron micrographs of the showing the surface of 3D PCL scaffolds and PCL/COOH scaffolds after immersion in SBF solution.



	3D PCL scaffold		3D PCL/CO	3D PCL/COOH scaffold		
	Р	Ca	Р	Ca		
1 Day	0.2	0.3	1.9	2.3		
3 Day	1.6	1.8	3.2	3.5		
5 Day	2.3	2.6	3.4	4.5		

Fig. 6. EDS results of 3D PCL scaffolds and PCL/COOH scaffolds.

제 2 절. 조골모 세포(MC3T3-E1) 증식 및 분화

MC3T3-E1 세포 생존율에 미치는 영향을 평가하기 위하여 MTT 분석법을 이 용하여 관찰하였다. MTT 분석법은 세포의 미토콘드리아 활성과 직접연관이 있는 방법으로 세포의 생존율을 측정할 때 일반적으로 널리 사용되는 방법이 다. 이 실험에서 대조군은 무 처리 3D PCL 스캐폴드를 사용하였고, 플라즈마 중합된 폴리아크릴산 필름이 형성된 3D PCL 스캐폴드와 플라즈마 중합된 폴 리아크릴산 필름 표면에 하이드록시아파타이트를 코팅한 3D PCL 스캐폴드를 실험군으로 사용하였다. MC3T3-E1 세포생존율은 대조군과 실험군 모두 1 일, 3 일 5 일 동안 배양하였고. 생존율(%) 계산은 1 일 동안 배양한 대조군의 생세포수를 100%로 했을 때 실험군에 생세포수를 비율로 나타낸 것이다 (Fig. 7). 세포배양기간이 증가하면서 실험군의 세포생존율이 증가함을 알 수 있었다. 1 일 배양의 경우에는 모든 시료의 세포증식이 유사한 값을 나타 냈으나 3 일째가 되면서 플라즈마 중합 처리 후 하이드록시아파타이트 필름 을 코팅한 시료의 세포 증식율이 크게 증가하였다. 5 일째가 되면서 대조군 과 실험군 모두 세포증식률은 증가하는 경향을 나타내었으나, 플라즈마 중합 된 아크릴산 필름이 코팅된 시료와 하이드록시아파타이트 필름이 코팅 된 시 료가 대조군에 비하여 높은 것을 확인할 수 있었다. 결론적으로 표면이 존재 하는 카르복실기와 하이드록시아파타이트가 MC3T3-E1 세포의 증식에 가장 큰 영향을 미치고 있다는 사실을 알 수 있었다.

Fig. 8은 3D PCL 스캐폴드 표면과 플라즈마 중합된 아크릴산 필름이 코팅 된 표면 그리고 플라즈마 중합된 아크릴산 필름에 하이드록시아파타이트를 코팅한 3D PCL 스캐폴드 표면에 MC3T3-E1 세포를 이용하여 ALP 활성도를 관 찰한 결과이다. 관찰결과 4 일, 7 일 모두 유사한 ALP 활성도를 관찰 할 수 있었다. 이는 플라즈마 중합된 아크릴산이 코팅된 표면과 하이드록시아파타 이트 필름 코팅이 큰 영향을 주지 않는 것을 확인할 수 있었다.



Fig. 7. Cell proliferation of the MC3T3-E1 cell cultured on sample surfaces for 1 day, 3 days, and 5 days.



Fig. 8. ALP activity of the MC3T3-E1 cell seeded on samples surface for 4 days and 7 days.

제 4 장 고찰

본 연구에서는 우수한 가공성과 생분해성의 3D-PCL 스캐폴드 표면에 생체 적합성을 향상시키기 위하여 플라즈마 표면 개질을 적용하였다. 플라즈마 중 합은 재료의 표면에 얇은 필름을 형성하고 재료의 표면과 우수한 접착력을 보여준다. 그러나 플라즈마 중합 조건에 따라 재료표면과의 결합력이 약해지 거나 관능기 함량이 달라진다. 예로 입력 파워가 낮으면 플라즈마 중합도가 낮아져서 중합 필름이 용매에 쉽게 용해되고, 입력 파워가 높으면 플라즈마 중합도는 증가하나 관능기 함량이 줄어들기 때문에 적정한 입력 파워를 공급 해야 한다. 일반적으로 낮은 플라즈마 입력 파워를 사용했을 때 다량의 관능 기를 얻을 수 있다.³⁷

PCL 스캐폴드의 낮은 투과성(permeability)과 젖음성 또는 소수성은 세포 의 증식에 효과적이지 못하기 때문에 생체조직공학에서는 표면 특성을 개선 해야만 한다.³⁸ 따라서, 플라즈마의 물리적 또는 화학적 성질을 이용한 플라 즈마 중합법으로 스캐폴드의 표면을 소수성에서 친수성으로 전환할 수 있 다.^{39,40} 플라즈마 고분자의 관능기에 따라 표면 특성은 달라지는데 플라즈마 중합된 폴리아크릴산 필름은 카르복실기의 영향으로 친수성을 보여주었다 (Fig. 4). 관능기의 역할은 재료 표면에 친수성을 부여할 뿐만 아니라 세포 부착⁴¹, 단백질 흡착⁴², 생체분자 고정화,⁴³⁻⁴⁵ 이온교환체로써⁴⁶ 중요한 역할을 수행한다. 플라즈마 중합은 모노머의 관능기를 다량으로 재료의 표면에 도입 하는 기법으로 알려져 있다. 적당히 낮은 접촉각이 형성된 재료표면은 세포 와의 접촉 시 세포부착과 매우 밀접한 관련이 있으며 일반적으로 적당한 친 수성을 가지는 재료표면은 세포의 부착이 우수하여 임플란트와 같은 생체재 료로써 사용이 가능하다고 보고되고 있다.^{35,36} Fig. 5에서 확인된 것처럼 3D-PCL 스캐폴드에 도입된 카르복실기는 생체모방공정의 일종으로 인체유사 용액으로부터 하이드록시아파타이트가 형성되도록 도와준다. 그리고 아민기 나 알콜기보다 하이드록시아파타이트 형성에 유리하다고 보고되고 있다.47 재 료 표면의 카르복실기는 pH 7.4에서 탈 수소화되면서 음전하를 띠고. 이 음 전하 표면은 양이온 칼슘 이온들을 끌어들여 칼슘이 많은 칼슘-인 층을 형성 한다. 칼슘 이온으로 인해 표면은 양전하를 띠고 인산 이온을 끌어당긴다. 이런 공정이 반복적으로 이루어지면서 층이 쌓여간다. 반면 재료 표면의 양 전하는 염화나트륨을 코팅하는데 더 효과적이다.

고분자-바이오세라믹 유무기복합체는 골 조직 부분의 대체 이식 생체 재 료로서 의료분야에서 각광을 받고 있다. 플라즈마 중합된 폴리아크릴산이 증 착된 3D-PCL 스캐폴드에서는 동일한 조건과 시간에서의 무 처리 샘플보다 하 이드록시아파타이트 성장이 더욱 효율적으로 나타났다 (Fig. 5). 하이드록시 아파타이트의 결정성은 SBF 용액의 성분 조성과 농도에 따라 달라진다. Ca/P 비가 높을수록 즉 칼슘이 많을수록 결정성이 증가하고, 낮을수록 결정성이 떨어진다. 결정성이 낮으면 구형의 전형적인 cauliflower 모양을 나타내고. 결정성이 높으면 큰 판형태의 avpsum flower 모양을 나타낸다.⁴⁸ 결정성을 높 이기 위해서는 SBF 용액의 구성 성분 농도를 증가시키면서 마그네슘과 탄산 염 이온을 제거하는 방법이 있다. 본 연구에서는 구형의 하이드록시아파타이 트 결정이 관찰되었는데 이것은 SBF 용액의 구성 성분의 조성과 농도를 일반 적인 1× SBF 용액을 사용했기 때문이다. 골 조직과 유사한 하이드록시아파 타이트는 생체적합성이 우수하기 때문에 하이드록시아파타이트 코팅된 3D-PCL 스캐폴드에서 MC3T3-E1 세포에 대한 증식율 높았음을 알 수 있었다 (Fig.7). 생체 재료가 기존 생체 조식에 이식되면 계면 사이에서 안정한 화 학 결합이 필요하기 때문에 MC3T3-E1 세포의 높은 생체활성은 중요한 요건이 다. 매끄러운 PCL 표면보다 거친 PCL 표면이 세포의 부착에 유리하며, 소수 성 표면보다는 친수성 표면이 세포 부착에 유리하다. 따라서 세포 부착환경 이 우수한 하이드록시아파타이트 코팅을 향상시킬 수 있는 플라즈마 중합은 생체재료의 표면 개질 방법으로 효과적이라고 할 수 있다.

한편, 하이드록시아파타이트 코팅된 3D-PCL 스캐폴드에서 MC3T3-E1 세포 의 ALP 활성은 대조군과 별다른 차이를 발견 할 수 없었다. 이러한 현상은 세포 분화를 위해서는 성장 인자와 같은 분화유도물질 등을 포함해야 하는데 플라즈마 중합된 아크릴 산 필름이나 하이드록시아파타이트 필름은 세포 분 화를 유도하는 인자가 없기 때문에 활성 차이가 없는 것으로 사료된다. 향후 동물실험을 통하여 실제 신생골의 재생능을 평가해야 할 것으로 사료된다.

제 5 장 결론

3D PCL 스캐폴드에 플라즈마 중합법을 이용하여 플라즈마 중합된 폴리아크 릴산 필름을 코팅하고, 인체유사용액에 침지하여 하이드록시아파타이트 필름 을 코팅 한 후 표면 및 물성을 관찰하였고, MC3T3-E1 세포를 이용하여 세포 증식과 분화를 조사하여 다음과 같은 결과를 도출하였다.

- 아크릴산을 이용한 플라즈마 표면처리는 카르복실기를 함유한 균일한 친수성 필름이 형성됨을 확인 할 수 있었다.
- 2) SBF를 이용한 골 형성능 평가 결과, 플라즈마 중합된 폴리아크릴산 필 름이 코팅된 스캐폴드가 무 처리 스캐폴드에 비하여 우수한 골 형성능 을 나타내었다.
- 3) MC3T3-E1 세포 증식 및 분화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 플라즈마 중합된 폴리아크릴산 필름이 코팅된 표면이 무 처리된 표면에 비하여 높은 세포 증식율을 나타내었고, 여기에 하이드록시아파타이트가 코팅 된 표면에서 가장 높은 세포 증식율을 보여주었다. 그리고 실험군과 대 조군 모두 세포 분화에는 큰 영향을 미치지 않았다.

이상과 같은 결과들로 미루어 볼 때 3D PCL 스캐폴드의 표면에 플라즈마 중합 표면개질기술을 이용하여 폴리아크릴산 필름을 코팅한 스캐폴드는 임상 적으로 골 재생이 우수할 것으로 사료된다.

참고문헌

- 1. Ma PX. (2004) Scaffolds for tissue fabrication. Mater Today 7:30-40.
- Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. (2000) *Biomaterials* 21:2529-2543.
- Hutmacher DW, Cool S. Concepts of scaffold-based tissue engineering
 the rationale to use solid free-form fabrication techniques.
 (2007) J Cell Mol Med 11:654-669.
- Nam YS, Yoon JJ, Park TG. (2000) A novel fabrication method for macroporous scaffolds using gas foaming salt as porogen additive. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* 53:1–7.
- Yoon JJ, Park TG. (2001) Degradation behaviors of biodegradable macroporous scaffolds prepared by gas foaming of effervescent salts. *J Biomed Mater Res* 55:401-408.
- 6. Heijkants RG, van Calck RV, van Tienen TG, de Groot JH, Buma P, Pennings AJ, et al. (2005) Uncatalyzed synthesis, thermal and mechanical properties of polyurethanes based on poly(epsilon-caprolactone) and 1, 4-butane diisocyanate with uniform hard segment. *Biomaterials* 26:4219-4228.
- Xie R, Bhattacharjee D, Argyropoulos J. (2009) Polyurethane elastomers based on 1, 3 and 1, 4-bis(isocyanatomethyl)cyclohexane. *J Appl Polym Sci* 113:839-848.
- Santerre JP, Woodhouse K, Laroche G, Labow RS. (2005)Understanding the biodegradation of polyurethanes: from classical implants to tissue engineering materials. *Biomaterials* 26:7457-7470.
- Linbo 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.

- Hutmacher DW, Cool S. (2007) Concepts of scaffold-based tissue engineering-the rationale to use solid free-form fabrication techniques. *J Cell Mol Med* 11:654-669.
- Zein I, Hutmacher DW, Tan KC, Teoh SH. (2002) Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials* ;23:1169-1185.
- Leong KF, Cheah CM, Chua CK. (2003) Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials* 24:2363-2378.
- Woodfield TBF, Malda J, Wijn Jd, Péters F, Riesle J, Blitterswijk C.A. van. (2004) Design of porous scaffolds for cartilage tissue engineering using a three-dimensional fiber-deposition technique. *Biomaterials* 25:4149-4161.
- Moroni L, Wijn JRd, Blitterswijk CA van (2006) 3D fiber-deposited scaffolds for tissue engineering: Influence of pores geometry and architecture on dynamic mechanical properties. *Biomaterials* 27:974-985.
- Pfister A et al. (2004) Biofunctional rapid prototyping for tissue-engineering applications: 3D bioplotting versus 3D printing. J Polym Sci Part A: Polym Chem 42:624-638.
- 16. Vunjak-Novakovic G, Radisic M. (2004) Cell seeding of polymer scaffolds. *Methods Mol Biol* 238:131-146.
- 17. Perez MH, Zinutti C, Lamprecht A, Ubrich N, Astier A, Hoffman M, Bodmeier R, Maincent P. (2000) The preparation and evaluation of poly(epsiloncaprolactone) microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug. *J Control Release* 65:429-438.
- Lowry KJ, Hamson KR, Bear L, Peng YB, Calaluce R, Evans ML, Anglen JO, Allen WC. (1997) Polycaprolactone/glass bioabsorbable implant in a rabbit humerus fracture model. J Biomed Mater Res 36:536-541.

- Pernin DE, English JP. in: Dome AJ, Kost J, Wiseman DM. (Eds.), Handbook of Biodegradable Polymers, Harwood Academic Press, Amsterdam, 1997, p. 63.
- Wei G, Ma PX. (2004) Structure and properties of nanohydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 25:4749-4757.
- Kothapalli CR, Shaw MT, Wei M. (2005) Biodegradable HA-PLA 3-D porous scaffolds: effect of nano-sized filler content on scaffold properties. *Acta Biomater* 1:653-662.
- Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. (2000) Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomaterials* 21:1803-1810.
- Webster TJ, Ejiofor JU. (2004) Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti, Ti6Al4V, and CoCrMo. *Biomaterials* 25:4731-4739.
- 24. Yeong WY, Chua CK, Leong KF, Chandrasekaran M. (2004) Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential. *Trends Biotechnol* 22:643-652.
- 25. Lee J, Cuddihy MJ, Kotov NA. (2008) Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Eng Part B Rev* 14:61-86.
- Detsch R, Uhl F, Deisinger U, Ziegler G. (2008) 3D-cultivation of bone marrow stromal cells on hydroxyapatite scaffolds fabricated by dispense-plotting and negative mould technique. J Mater Sci: Mater Med 19:1491-1496.
- 27. Woodfield TBF, Van Blitterswijk CA, De Wijn J, Sims TJ, Hollander AP, Riesle J. (2005) Polymer scaffolds fabricated with pore-size gradients as a model for studying the zonal organization within tissue-engineered cartilage constructs. *Tissue Eng* 11:1297-1311.

- 28. Shang H, Chang WS, Kan S, Majetich SA, Lee GU. (2006) Synthesis and characterization of paramagnetic microparticles through emulsion -templated free radical polymerization. *Langmuir* 22:2516-2522.
- 29. Jin JM, Lee JM, Ha MH, Lee K, Choe S. (2007) Highly crosslinked poly(glycidyl methacrylate-co-divinyl benzene) particles by precipitation polymerization. *Polymer* 48:3107-3115.
- 30. Safinia L, Datan N, Hohse M, Mantalaris A, Bismark A. (2005) Towards a methodology for the effective surface modification of porous polymer scaffolds. *Biomaterials* 26:7535-7547.
- 31. Chen-Yang YW, Liao JD, Kau JY, Huang J, Chang WT, Chen CW. (2000) Surface modification of expanded polytetrafluoroethylene sheets assisted by CO₂ antenna coupling microwave plasma. *Macromolecules* 33:5636-5643.
- 32. Meyer-Plath AA, Schroder K, Finke B, Ohl A. (2003) Current trends in biomaterial surface functionalization-nitrogen-containing plasma assisted processes with enhanced selectivity. *Vacuum* 71:391-406.
- 33. 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.
- 34. Seo HS, Ko YM, Kim BH.(2010) Fabrication of anodized titanium with immobilization of hyaluronic acid to improve biological performance. *Prog Org Coat* 69:38-44.
- Lim YJ, Oshida Y, Anders CJ, Barco MT. (2001) Surface treat characterization of variously treated titanium materials. *Int J Oral Maxillofac Implant* 16:333-338.
- 36. Feng X, Zhang J, Xie H, Hu Q, Huang Q, Liu W. (2003) The RF plasma polymer of lysine and the growth of human nerve cells on its surface. *Surf Coat Technol* 171:96-100.

- 37. Kelly JM, Short RD, Alexander MR. (2003) Experimental eivdence of a relationship between monomer plasma residence time and carboxyl group retention in acrylic acid plasma polymers. *Polymer* 44:3173-3176.
- 38. Jeong CG, Hollister SJ. (2010) A comparison of the influence of material on *in vitro* cartilage tissue engineering with PCL, PGS, and POC 3D scaffold architecture seeded with chondrocytes. *Biomaterials* 21:4304-4312.
- Aroca AS, Pradas MM, Ribelles JL. (2007) Plasma-induced polymerisation of hydrophilic coatings onto macroporous hydrophobic scaffolds. *Polymer* 48:2071.
- 40. Topala I, Dumitrascu N, Popa G. (2009) Properties of the acrylic acid polymers obtained by atmospheric pressure plasma polymerization. *Nucl Instr and Meth B* 267:442-445.
- 41. Cho SI, Dhayal M. (2006) Leukemia cells interaction with plasma-polymerized acrylic acid coatings. *Vacuum* 80:636-642.
- Hirotsu T, Tagaki C. (2004) Plasma copolymer membrances of acrylic acid and the adsorption of lysozyme on the surface. *Thin Solid Films* 457:20-25.
- 43. Jafari R, Arefi-Khonsari F, Tatoulian M, Clerre DL, Talini L, Richard F. (2009) Development of oligonucleotide microarray involving plasma polymerized acrylic acid. *Thin Solid Films* 517:5763-5768.
- 44. Ricciardi S, Castagna R, Severino SM, Ferrante I, Frascella F, Celasco E, Mandracci P, Vallini I, Mantero G, Pirri CF, Rivolo P. (2012) Surface functionalization by poly-acrylic acid plasma -polymerized films for microarray DNA diagnostics. *Surf Coat Technol* 207:389-399.

- 45. Lopez LC, Gristina R, Ceccone G, Rossi F, Favia P, d'Agostino R. (2005) Immobilization of RGD peptides on stable plasma-deposited acrylic acid coatings for biomedical devices. *Surf Coat Technol* 200:1000-1004.
- 46. Park HJ, Na CK. (2006) Preparation of anion exchanger by amination of acrylic acid grafted polypropylene nonwoven fiber and its ion-exchange property. *J Colloid Inter Sci* 301:46-54.
- 47. Ko YM, Lee K, Kim BH. (2012) Bone like apatite formation on modified Ti surfaces with COOH, NH₂, and OH functional groups by plasma polymerization. *Thin Solid Films* 521:128-131.
- 48. Lebourg M, Suay Antón J, Gomez Ribelles JL. (2010) Characterization of calcium phosphate layers grown on polycaprolactone for tissue engineering purposes. *Composit Sci Tech* 70:1796-1804.