

폴리락틱산/칼슘포스페이트 졸을 이용한 골조직 재생용 복합 마이크로섬유의 제조

이정희 · 한윤수* · 정경혜* · 김영진†

대구가톨릭대학교 의공학과, *대구가톨릭대학교 신소재화학공학과
(2017년 7월 25일 접수, 2017년 8월 25일 수정, 2017년 8월 28일 채택)

Fabrication of Composite Microfibers Using Polylactic Acid/Calcium Phosphate Sol for Bone Tissue Regeneration

Jung-Hee Lee, Yoon Soo Han*, Kyung Hye Jung*, and Young-Jin Kim†

Department of Biomedical Engineering, Daegu Catholic University, Gyeongsan 38430, Korea

*Department of Advanced Materials and Chemical Engineering, Daegu Catholic University, Gyeongsan 38430, Korea

(Received July 25, 2017; Revised August 25, 2017; Accepted August 28, 2017)

초록: 골조직 재생용 지지체는 세포의 부착과 3차원적인 조직생성을 유도하기 위해서 인공적인 세포외기질(extracellular matrix, ECM)로서 기능을 하도록 만들어져야 한다. 따라서 본 연구에서는 폴리락틱산(poly-lactic acid, PLA)과 칼슘포스페이트(calcium phosphate, CaP) 졸을 이용하여 전기방사법과 열처리 방법으로 복합 마이크로섬유 지지체를 제조하였다. 제조된 복합 마이크로섬유는 3차원 네트워크 구조의 상호연결된 기공구조를 가지고 있었으며, 자연 상태 골조직의 ECM과 유사한 구조를 가지고 있었다. 복합 마이크로섬유에 도입된 CaP의 양이 많아질수록 섬유의 직경은 약간 줄어들었지만 물접촉각은 많이 낮아지는 것이 확인되었다. 복합 마이크로섬유의 조골세포 성장 및 분화에 미치는 영향을 조사한 결과 CaP의 도입량이 가장 많은 PLCP15에서 조골세포의 성장이 가장 촉진되었고, 또한 분화능도 가장 향상되었다는 것을 확인하였다.

Abstract: The scaffolds for bone tissue regeneration are designed to function as an artificial extracellular matrix (ECM) to temporarily support cell attachment and guide three-dimensional tissue formation. In this study, composite microfiber scaffolds were prepared by electrospinning from polylactic acid (PLA)-calcium phosphate (CaP) sol blend solutions with various concentrations of CaP sol. The resulting composite microfibers exhibited three-dimensionally interconnected microporous structures, which mimicked the natural bone ECM. Although the average diameter of fibers was slightly decreased by the addition of CaP sol, the contact angles were markedly reduced from 107° to 70°. The results of cell viability tests demonstrated that PLCP15 containing 15 wt% of CaP promoted more rapid MC3T3-E1 proliferation compared with other composite microfibers. Moreover, PLCP15 effectively upregulated osteoblastic differentiation.

Keywords: polylactic acid, calcium phosphate sol, composite microfiber, electrospinning, bone regeneration.

서 론

뼈는 인체를 지탱하며 동작을 수행하는 기계적 기능 이외에도 체내의 칼슘 이온 농도를 조절하는 칼슘의 저장고 역할을 한다. 각종 질병, 사고, 노화 및 다른 생리적인 이유로 골결손부가 생기면 이들 골조직의 재생 및 기능 회복을 위해서 생분해성 지지체가 사용되어진다.^{1,2} 골세포 및 골조직의 성장은 지지체의 특성에 많은 영향을 받으므로, 이들 지지체는 세포 부착과 3차원적인 조직 형성 유도에 도움을 줄 수 있는

세포외기질(extracellular matrix, ECM)과 유사한 기능을 하도록 설계되어야 한다.³ 따라서 이상적인 지지체는 자연 상태 골조직의 ECM과 구조 및 화학적으로 유사한 특성을 보여야 하고, 생체적합성과 골전도성을 가져야 하며, 특히 골조직의 재건 과정 동안에 천천히 흡수되도록 만들어지는 것이 중요하다.⁴

골조직 재생을 위한 지지체로 이용되는 다양한 생체재료 중에서 칼슘포스페이트(CaP)를 기반으로 하는 생체재료는 뛰어난 생체적합성과 생체활성(골전도성 및 골유도성)으로 인해서 많은 관심을 받고 있다.⁵ 특히 CaP 및 이들의 복합재료는 골조직을 구성하고 있는 무기물과 화학 성분 및 특성이 유사하고, 살아있는 조직과의 화학적 결합도 가능하므로 다양한 의료 분야에서 사용되고 있으며, 특히 정형외과 및 치

†To whom correspondence should be addressed.

E-mail: yjkim@cu.ac.kr

©2018 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

과 분야에서는 뼈의 대체물로서 주로 이용되고 있다.² 그러나 CaP 단독으로 만들어진 생체재료는 생의학적인 지지체로 사용하기에는 기계적 강도가 매우 낮고 쉽게 부서지는 문제점이 있다.

최근 CaP의 문제점을 보완하여 기계적 특성을 개선시킬 뿐만 아니라 골세포의 성장 및 분화를 촉진시키기 위해서 생분해성 고분자와 CaP를 이용한 복합 나노/마이크로섬유 지지체의 연구가 많이 시도되고 있다.²⁴ 이들 복합 나노/마이크로섬유 지지체는 고분자와 무기물 입자를 블렌딩하는 방법, 유사생체용액(simulated body fluid, SBF)으로 코팅하는 방법 및 Ca-P 전구체 용액에 교차로 침적하는 방법 등으로 간단히 제조될 수 있다.⁶⁻⁸ 이들 연구에 의하면 고분자 나노/마이크로섬유 표면에 도입된 많은 양의 무기물 성분이 세포의 부착과 성장을 촉진하였고, 특히 낮은 결정성을 가진 CaP가 높은 결정성을 가진 CaP에 비해서 더 뛰어난 세포 부착력을 보이는 것으로 확인되었다. 그러나 이들 복합 나노/마이크로섬유 지지체에 CaP 성분이 표면에만 한정적으로 도입되어 CaP 성분이 빠른 속도로 녹아나가거나, 고분자 용액에서의 CaP 입자의 분산성 저하로 인해 복합 나노/마이크로섬유의 표면에 고르게 도입되지 못하는 문제점이 있다. 따라서 장기적인 응용을 위해서는 CaP 성분이 표면뿐만 아니라 내부까지 고르게 분포되어 있는 복합 나노/마이크로섬유의 개발이 필요하다.

골조직의 빠른 재생을 위해서는 기계적인 지지체 역할과 세포의 성장 및 분화를 조절하여 최적의 미세환경을 제공할 수 있는 3차원 네트워크 구조의 조직공학용 지지체의 개발이 요구되어 지고 있다. 이를 위해서 다양한 고분자 소재와 무기물 소재가 사용되고 있으며 생체적합성이 우수한 대표적인 생분해성 고분자로는 폴리락틱산(poly-lactic acid, PLA), 폴리글리콜릭산(polyglycolic acid, PGA), 폴리카프로락톤(polycaprolactone, PCL) 등이 있다. 그러나 이들 고분자로 제조되어진 지지체의 경우 세포친화성이 부족하고 표면의 소수성으로 인해서 초기의 세포 부착 및 성장률이 낮다는 단점이 있다.⁹ 따라서 본 연구에서는 고분자 나노/마이크로섬유의 골전도성과 골유도성을 개선하기 위해서 생분해성 고분자인 PLA와 CaP 졸(sol)을 이용하여 전기방사법과 열처리 방법으로 복합 마이크로섬유 지지체를 제조하였다. 제조된 복합 마이크로섬유는 표면뿐만 아니라 섬유의 내부에도 많은 양의 CaP가 도입되었기 때문에, CaP 졸의 사용량에 따른 복합 마이크로섬유의 표면형태 및 특성 변화에 대해서 조사하였다. 또한 도입된 CaP의 양이 세포 성장에 미치는 영향을 평가하였다.

실 험

시약 및 재료. 폴리락틱산(PLA, $M_w=60000$), calcium nitrate tetrahydrate($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), triethyl phosphite

($(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{P}$), alizarin red S(ARS), cetylpyridinium chloride, dimethyl sulfoxide(DMSO), *N,N*-dimethylformamide(DMF), 2,2,2-trifluoroethanol(TFE)과 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide(MTT)는 Sigma-Aldrich Co. (USA) 제품을 구입하여 사용하였다. Alpha minimum essential medium(α -MEM), fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin과 Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS, pH 7.4)은 Gibco BRL(USA)에서 구입하였다. Mouse calvaria preosteoblast cell line(MC3T3-E1)은 American Type Culture Collection(ATCC, USA)에서 구입하였고, QuantiChrom™ alkaline phosphatase(ALP) assay kit(DALP-250)은 BioAssay Systems(USA)에서 구입하여 사용하였다. 그 외의 사용된 시약과 용매는 일반 회사에서 구입하였으며, 추가적인 정제과정 없이 사용하였다.

칼슘포스페이트 졸 합성. 칼슘포스페이트(CaP) 졸의 합성을 위해서 먼저 전구체인 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 14.0 g 및 $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{P}$ 5.9 g을 에탄올 10 mL에 각각 용해시킨 후 두 용액을 40 °C에서 1시간 동안 적하하면서 혼합시켜 반응을 진행시켰다. 이 때 Ca/P 최종 비율이 1.67이 되도록 맞추어 주었다. 적하 완료 후에 40 °C에서 24시간 및 60 °C에서 6시간 동안 반응시켰고, 생성물을 1시간 동안 농축시켜서 최종 고형분의 함량이 80 w/v%가 되도록 CaP 졸 용액을 준비하였다.

복합 마이크로섬유 제조. 복합 마이크로섬유를 제조하기 위해 사용한 전기방사장치는 0-40 kV의 전압공급이 가능한 고전압 공급장치(high voltage DC power supply unit, 청파 EMT, 한국), 평판형태(200×200 mm, stainless steel)의 집전판(collector), 고분자용액을 일정하게 토출해 줄 수 있는 주사기 펌프(syringe pump, KDS100, USA), 주사기(gastight and needle lock type 10 mL, Hamilton, USA), 금속주사기바늘(ID=0.41 mm) 등으로 구성하였다. 복합 마이크로섬유의 전기방사를 위해서 먼저 PLA를 TFE와 DMF 4:1의 혼합용매에 완전히 녹이고, 여기에 CaP 졸을 추가하여 상온에서 12시간 동안 교반하여 PLA의 최종농도가 18 w/v%이고, CaP 졸은 PLA 무게 대비 5, 10, 및 15 wt%가 첨가된 방사용액을 제조하였다. 복합 마이크로섬유의 제조조건은 방사거리 15 cm, 인가전압 18 kV, 유체속도 1.5 mL/h로 고정시키고, 실온에서 상대습도 60% 이하의 조건에서 마이크로섬유를 제조하였다. 방사 완료 후에 집전판에 모여 있는 복합 마이크로섬유를 수거하여 40 °C에서 12시간 진공건조하여 잔존하는 용매를 모두 제거하였다. 진공건조 후에 도입된 CaP의 졸-겔 반응을 위해서 90 °C에서 1시간 동안 열처리를 진행하였다.

복합 마이크로섬유 특성 분석. PLA와 CaP를 함유하는 복합 마이크로섬유 표면 특성은 field-emission scanning electron microscope(FE-SEM, JSM-6335F, JEOL, Japan)과 이미지 분석 프로그램(Image-Pro Plus, Media Cybernetics Inc., USA)을 이용하였다. 먼저 FE-SEM을 통해 얻어진 마이크로섬유

의 사진 이미지를 이미지 분석 프로그램을 이용하여 평균직경, 표준편차 등을 얻어내었다. FE-SEM을 이용하여 복합 마이크로섬유의 표면을 관찰하기 전에 백금(Pt)을 이용하여 섬유 표면의 80초 동안 코팅하였고, 관찰 시에 가속전압을 5.0 kV로 고정하여 관찰하였다. FE-SEM 분석에 사용한 동일한 샘플을 이용하여 CaP 졸의 사용에 의한 복합 마이크로섬유 표면의 원소조성의 변화를 energy disperse X-ray spectroscopy(EDX)를 이용하여 분석하였다. 또한 복합 마이크로섬유의 표면 화학구조는 attenuated total reflectance Fourier transform infrared(ATR-FTIR, ALPHA, Bruker Optics, USA)를 이용하여 분광 해상도(spectral resolution)를 4 cm^{-1} 로 고정하고 파수(wavenumber)를 $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ 범위에서 조사하였다. 복합 마이크로섬유의 친수화도를 조사하기 위해 정적법(sessile drop method)을 이용하였다. 이를 위해서 먼저 증류수를 이용하여 섬유 표면에 $3\ \mu\text{L}$ 의 물방울을 만들고, 이때 형성된 물접촉각을 접촉각 측정기(DSA 100, KRÜSS, Germany)를 이용하여 즉시 측정하였다. 복합 마이크로섬유의 기계적 특성은 10 N 용량의 load cell이 장착되어 있는 인장 시험기(TO-101, 테스트윈, 한국)를 이용하여 측정하였다. $50\times 10\text{ mm}^2$ 크기의 시료를 각각 5회 반복 측정하여 평균값을 사용하였으며 인장 속도는 10 mm/min 으로 고정하여 측정하였다.

유사생체용액(SBF) 침적 실험. 제조된 복합 마이크로섬유 표면에 뼈와 유사한 아파타이트(apatite) 층이 형성되는지를 사람의 혈장과 유사한 이온 농도를 가지는 유사생체용액인 SBF를 이용하여 조사하였다.¹⁰ 이 용액은 NaCl , NaHCO_3 , KCl , $\text{NaHPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Na_2SO_4 및 $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$ 를 증류수에 용해시키고 1 N HCl을 이용하여 37°C 에서 pH를 7.4에 맞추어서 제조한다. 침적 실험은 복합 마이크로섬유를 15 mL의 SBF가 들어있는 유리접시에 침적시키고, 이들 유리접시를 항온진탕배양기(BioShaker MBR-022UP, Taitec Co, Japan)에 37°C 에서 7일 동안 반응시켰다. 반응 완료 후에 복합 마이크로섬유를 증류수를 이용하여 세척하였고 진공에서 건조하였다.

세포 생존율 측정. PLA/CaP 복합 마이크로섬유 지지체의 *in vitro* 세포 독성을 알아보기 위해서 조골세포인 MC3T3-E1 세포를 사용하였다. 모든 세포배양에는 10% FBS와 0.5% penicillin-streptomycin을 함유하고 있는 α -MEM을 사용하였고, 마이크로섬유 상에서의 세포 생존율은 MTT assay를 이용하여 분석하였다. 세포 배양 전에 복합 마이크로섬유 지지체를 자외선을 이용하여 3시간 동안 멸균시키고, 계속해서 DPBS와 α -MEM을 이용하여 각 3회씩 세척하였다. 그 후 세포배양용 24-well plate에 복합 마이크로섬유를 넣어 주고, 여기에 MC3T3-E1 세포를 2×10^4 cells/well로 파종하여 37°C 에서 7일 동안 배양시켰다. 세포 생존율을 평가하기 위해서 MTT 용액을 각각의 복합 마이크로섬유 지지체 상에서 배양

된 세포에 넣어 주고 4시간 추가 배양하였다. 상층액을 제거하고 침전물을 DMSO로 용해시켜서 마이크로플레이트 리더기(OPSYS-MR, Dynex Technology Inc., USA)를 이용하여 570 nm에서의 흡광도를 측정하여 평가하였다.

세포 분화능 및 광물화 반응 평가. 복합 마이크로섬유 지지체 상에서의 MC3T3-E1 세포의 분화능을 알아보기 위해서 초기 조골세포 분화 표지로서 alkaline phosphatase(ALP) 활성화도를 ALP assay kit를 이용하여 측정하였다. MC3T3-E1 세포(2×10^4 cells/well)를 14일간 배양한 후에 세포층만 회수하여 0.2% Triton X-100을 이용하여 녹이고, 이 용액을 4°C 및 5000 rpm의 조건으로 10분간 원심분리하여 상층액만을 분리하였다. 분리된 샘플의 상층액에 존재하는 ALP와 기질인 *p*-nitrophenyl phosphate를 반응시킬 경우 ALP에 의해서 *p*-nitrophenyl phosphate가 *p*-nitrophenol로 변환된다. 이때 생성되는 *p*-nitrophenol의 농도를 405 nm에서 측정하여 ALP activity를 평가하였다. 또한 복합 마이크로섬유 지지체 상에서의 MC3T3-E1 세포의 분화능을 재확인하기 위해서 세포 성장 후의 광물화 반응 정도를 ARS 염색법을 이용하여 평가하였다. MC3T3-E1 세포(2×10^4 cells/well)를 14일간 배양한 후에 배지를 제거하고 DPBS를 이용하여 3회 세척하였다. 그 후 4% paraformaldehyde 용액으로 15분간 고정화 작업을 행하고 ARS 용액(40 mM, pH 4.2) 1 mL를 각 well에 넣고 항온진탕배양기에서 20분간 반응시켰다. 반응 종료 후에 미반응 ARS 용액을 세척하였고 10 w/v% cetylpyridinium chloride 용액으로 1시간 동안 반응시킨 후에 이들 용액의 흡광도 변화를 570 nm에서 측정하여 광물화 반응 정도를 평가하였다.

결과 및 토론

복합 마이크로섬유의 형상 관찰. 전기방사된 복합 나노/마이크로섬유는 구조적으로 생체 내에서 3차원 네트워크를 형성하고 있는 결합조직의 ECM과 유사할 뿐만 아니라 화학적으로도 유사하기 때문에 골조직 재생 과정에서 기계적인 지지체 역할뿐만 아니라 우수한 골전도성을 보이는 것으로 보고되고 있다.⁶⁻⁸ 본 연구에서는 다양한 농도의 CaP 졸과 PLA를 혼합하여 전기방사법과 열처리 방법으로 복합 마이크로섬유를 제조하였고, 사용된 CaP 졸의 함량은 PLA 무게 대비 0(PLA), 5(PLCP05), 10(PLCP10) 및 15 wt%(PLCP15)이다. 전기방사된 마이크로섬유의 형상을 SEM을 이용하여 관찰한 결과, Figure 1에서 볼 수 있는 것처럼 3차원적으로 연결된 기공구조를 가지고 있었고, 이들 섬유의 평균 직경은 PLA가 $2.21\pm 0.09\ \mu\text{m}$, PLCP05가 $2.06\pm 0.29\ \mu\text{m}$, PLCP10이 $1.98\pm 0.32\ \mu\text{m}$ 및 PLCP15가 $1.97\pm 0.18\ \mu\text{m}$ 로 CaP 졸의 첨가에 의해서 섬유의 직경이 약간 감소하는 것이 확인되었고, 이는 CaP 졸의 첨가에 따른 전기방사 용액의 점도 감소에 기인하는 것으로 판단된다.¹¹ 또한 CaP 졸의 첨가와 열처리에 의해

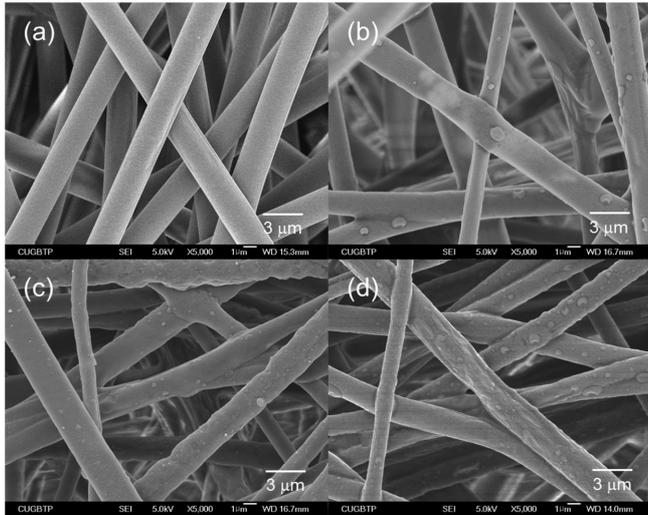


Figure 1. SEM micrographs of electrospun (a) PLA; (b) PLCP05; (c) PLCP10; (d) PLCP15 composite microfibers.

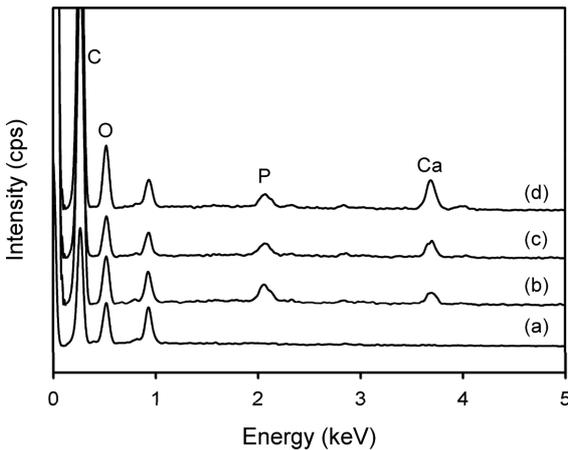


Figure 2. EDX spectra of (a) PLA; (b) PLCP05; (c) PLCP10; (d) PLCP15 composite microfibers.

서 복합 마이크로섬유 표면에 형성된 CaP 나노입자가 관찰됨으로 인해서 PLA/CaP 복합 마이크로섬유가 성공적으로 제조되었다는 것을 확인하였다.

복합 마이크로섬유에의 CaP 도입을 확인하기 위해서 EDX를 이용하여 복합 마이크로섬유 표면의 원소조성의 변화를 분석하였다. 그 결과 CaP 졸의 첨가에 의해서 복합 마이크로섬유에서 칼슘(Ca)과 인(P)에 기인하는 피크가 새로이 나타나는 것이 관찰되었다(Figure 2).

복합 마이크로섬유의 물리화학적 및 기계적 특성. 복합 마이크로섬유의 표면 특성을 ATR-FTIR을 이용하여 400-4000 cm^{-1} 범위에서 분석하였다. Figure 3에서 볼 수 있는 것처럼 모든 마이크로나노섬유에서 PLA 고분자 사슬에 존재하는 C-H stretching vibration에 기인하는 특성피크가 2994 및 2943

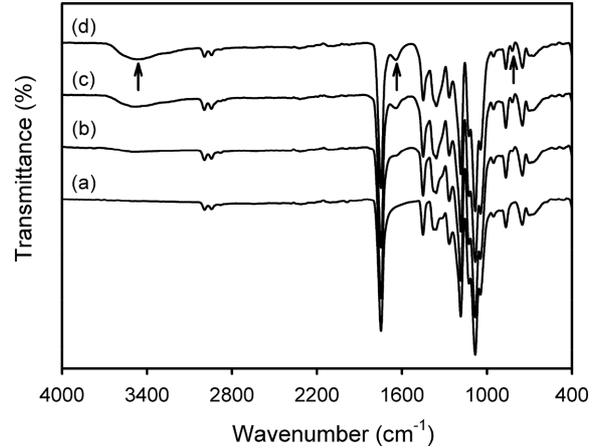


Figure 3. ATR-FTIR spectra of (a) PLA; (b) PLCP05; (c) PLCP10; (d) PLCP15 composite microfibers.

Table 1. Contact Angles of Composite Microfibers with Different CaP Contents

Microfiber	Contact angle (°)
PLA	106.8±4.2
PLCP05	87.3±3.9
PLCP10	73.1±2.7
PLCP15	70.3±3.6

cm^{-1} 에서 관찰되었고, C=O stretching에 기인하는 특성 피크가 1747 cm^{-1} 에서 관찰되었다.¹² 또한 PLA의 C-O-C stretching에 해당하는 피크가 1086 cm^{-1} 에서 확인되었다. CaP가 도입됨에 의해서 3476과 1644 cm^{-1} 에서 CaP의 -OH 그룹 및 흡착된 물분자에 기인하는 피크가 관찰되었고, 특히 821 cm^{-1} 에서는 HPO_4^{2-} 에 기인하는 피크가 관찰되었다.¹³ 그러나 CaP에 기인하는 다른 특성피크들은 PLA 특성피크와 중복되어서 확인이 불가능하였다.

복합 마이크로섬유 지지체의 친수성 및 표면 전하는 세포의 부착과 성장에 많은 영향을 줄 수 있으며, 특히 친수성은 생체재료가 생의학적인 지지체로서 사용되기 위해서 반드시 고려해야 할 특성이다. 이들 친수성은 지지체의 화학적 조성뿐만 아니라 표면 구조에 의해서 영향을 받을 수 있으며, 높은 친수성을 보이는 지지체가 세포의 부착과 확산(spreading)에 더 유리한 것으로 알려져 있다.¹⁴ 따라서 복합 마이크로섬유 표면의 친수성을 평가하기 위해서 물접촉각 측정을 행한 결과 CaP의 도입에 의해서 복합 마이크로섬유 지지체의 친수성이 개선되었음을 확인할 수 있었다(Table 1). 즉 소수성 고분자로 알려진 PLA의 경우 106.8°로 높은 접촉각을 보였으나, CaP를 함유하는 복합 마이크로섬유의 경우 PLCP05는 87.3°, PLCP10은 73.1° 및 PLCP15는 70.3°와 같이 CaP의 함량이 증가할수록 물접촉각이 더 낮아지는 것이 관찰되었다.

또한 CaP의 도입에 따른 복합 마이크로섬유의 기계적 특

Table 2. Mechanical Properties of Composite Microfibers with Different CaP Contents

Microfiber	Young's modulus (MPa)	Tensile strength (MPa)	Elongation at break (%)
PLA	26.2±3.5	3.4±0.5	58.7±6.5
PLCP05	38.5±2.9	4.3±0.7	56.8±3.7
PLCP10	55.9±3.8	5.8±0.7	52.3±3.4
PLCP15	57.2±5.1	6.1±0.4	49.2±4.6

성 변화를 알아보기 위해서 응력-변형 측정을 기초로 하여 탄성계수(Young's modulus), 인장강도(tensile strength) 및 파단신율(elongation at break)을 측정하여 Table 2에 요약하였다. 기계적 강도의 측정 결과 CaP의 도입에 의해서 복합 마이크로섬유의 기계적 특성이 매우 향상된다는 것이 관찰되었다. 특히 CaP의 함량이 10 wt%까지는 탄성계수와 인장강도가 급격히 증가하다가 그 이후에는 완만한 증가를 보였으나, 파단신율은 CaP 함량의 증가에 따라 감소하는 경향을 보였다. 이는 복합 마이크로섬유에 응력(stress)이 가해져서 변형이 생기는 동안 CaP가 고분자 사슬과 순간적으로 가교결합을 형성하여 부분적인 강도 증가를 유발하는 것에 기인하는 것으로 판단되어진다.¹⁵

SBF 침적 실험. 인공재료가 인체 내에 이식이 되었을 때 살아 있는 골조직과 재료가 결합하기 위해서는 재료의 표면에 뼈와 유사한 아파타이트 층이 형성되어야 하며, 이들 아파타이트 층의 형성은 사람의 혈장과 유사한 이온 농도를 가지는 SBF를 이용하여 실험실적으로 재현할 수 있다.¹⁰ 즉 인체 내에서의 골조직에 대한 재료의 생체활성은 SBF 침적 실험을 통해 재료 표면에 형성되는 아파타이트 층을 보고 예측할 수 있다. Figure 4에서 볼 수 있는 것처럼 PLA 마이크로섬유에서는 침적 7일 후에도 표면에 아파타이트 층이 거의 관찰되지 않았다. 그러나 CaP가 도입된 복합 마이크로섬유에서는 아파타이트 층의 형성이 관찰되었고, CaP의 도입량이 가장 많은 PLCP15 표면에서 가장 많은 양의 아파타이트가 생성된 것을 확인할 수 있었다. 이는 복합 마이크로섬유에 도입된 CaP가 아파타이트 생성과 성장을 위한 핵형성 자리(nucleation site)를 제공하기 때문에 도입된 CaP의 양이 많을수록 아파타이트 층의 생성속도가 빨라지는 것이다.¹⁵

복합 마이크로섬유에서의 세포 성장. 세포조직공학용 지지체는 세포의 성장과 생리화적인 기능을 촉진시켜야 한다. 따라서 복합 마이크로섬유 지지체의 세포적합성(cytocompatibility)을 알아보기 위해서 *in vitro*에서 마우스 두개관(calvaria) 유래의 조골세포인 MC3T3-E1을 이용하여 복합 마이크로섬유 상에서의 성장거동을 MTT assay 방법으로 조사하였다. Figure 5에서 볼 수 있는 것처럼 모든 샘플에서 시간에 따라 세포가 성장되고 있음이 확인되었고, 특히 PLCP15에서 세포의 성장속도가 가장 빠른 것을 확인하였다. 이 결과로부터 조골세포

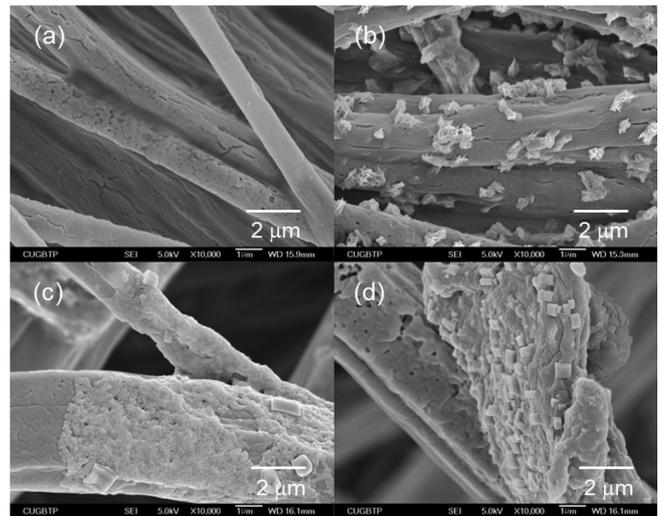


Figure 4. SEM micrographs of (a) PLA; (b) PLCP05; (c) PLCP10; (d) PLCP15 composite microfibers after immersion in SBF for 7 days.

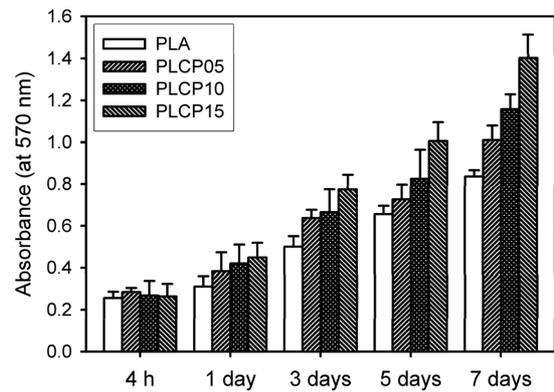


Figure 5. Proliferation behavior of MC3T3-E1 cells incubated on composite microfibers as a function of culture time ($n=5$).

의 성장속도는 CaP 도입량에 많은 영향을 받고, CaP의 도입량이 가장 많은 PLCP15에서 가장 빠르다는 것을 알 수 있었다. 또한 CaP의 도입에 의해서 다소 증가된 표면의 거칠기도 세포성장속도에 영향을 주는 것으로 판단되어진다.¹⁶

복합 마이크로섬유 상에서의 조골세포의 성장거동을 확인하기 위해서 SEM을 이용하여 세포의 모폴로지 및 세포와 지지체 사이의 상호작용을 관찰하였다. 모든 복합 마이크로섬유 지지체에서 MC3T3-E1 세포의 부착 및 확산이 잘되고 있고, 또한 배양 시간에 따라 세포가 잘 성장하고 있는 것이 관찰되었다(Figure 6). 특히 CaP의 도입량이 가장 많은 PLCP15 복합 마이크로섬유에서 가장 빠른 조골세포의 성장이 확인되었고, 배양 5일 후부터 조골세포가 PLCP15 지지체 전체에 확산되어 있는 것이 관찰되었다. 이들 결과는 복합 마이크로섬유 지지체에 도입된 CaP의 우수한 생체적합성 및 골조직

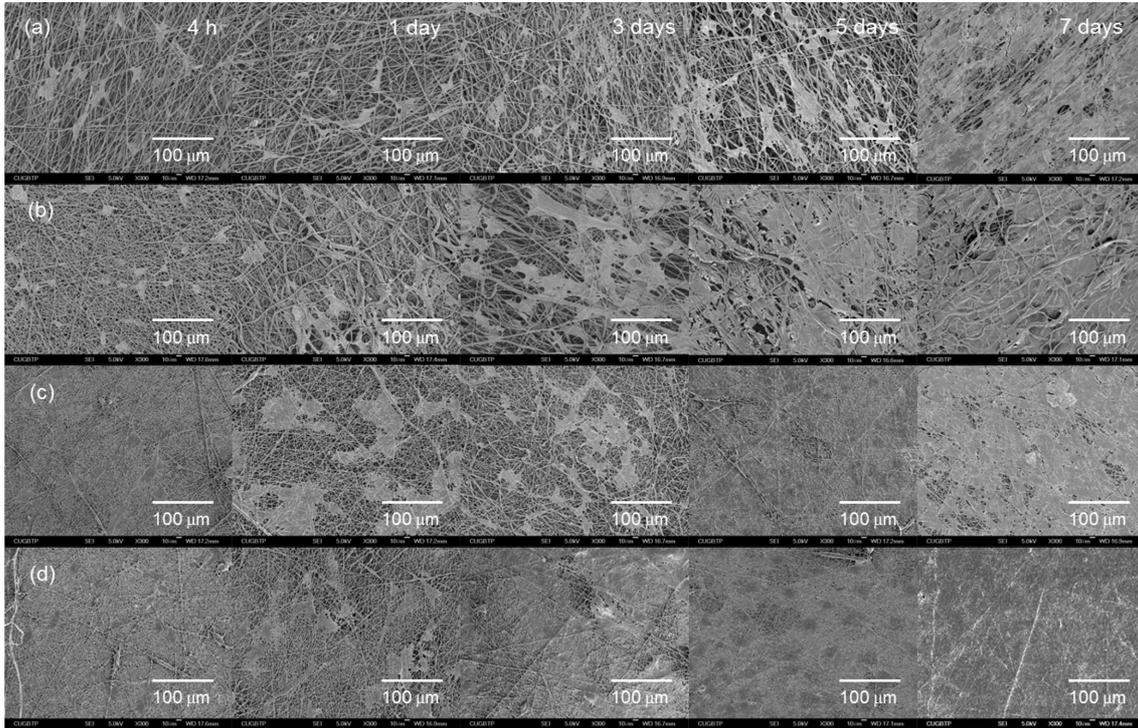


Figure 6. SEM micrographs of MC3T3-E1 cells grown on (a) PLA; (b) PLCP05; (c) PLCP10; (d) PLCP15 composite microfibers for different periods of time.

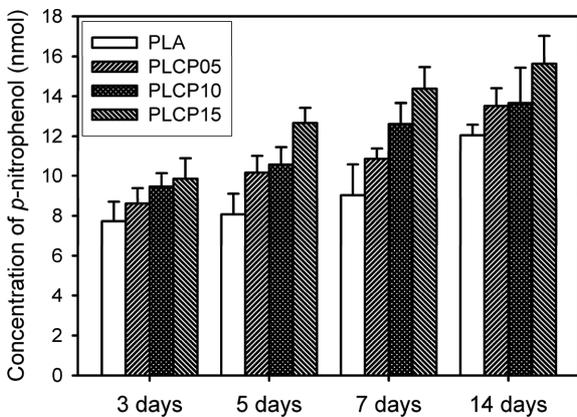


Figure 7. Intracellular ALP activity of MC3T3-E1 cells cultured on composite microfibers (n=5).

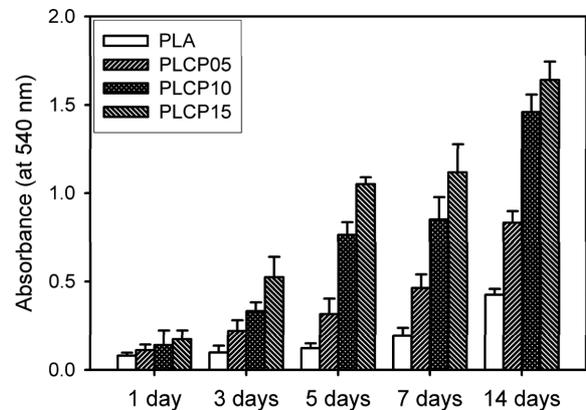


Figure 8. Quantification of mineral deposition in MC3T3-E1 cells by ARS staining on composite microfibers (n=6).

과 유사한 화학적 조성에 기인하는 것으로 판단되어 진다.²⁵

세포 분화능 및 광물화 반응. 복합 마이크로섬유 상에서 배양되고 있는 동안 MC3T3-E1 세포의 분화능은 단백질 발현 측정 등의 방법을 통해서 확인할 수 있다. 그 중에서 ALP 활성 측정법은 초기 조골세포 분화 표지인 ALP의 활성을 측정하여 세포의 분화능을 평가하기 위해서 널리 사용되는 방법이다. 따라서 복합 마이크로섬유 상에서의 MC3T3-E1 세포의 분화능을 ALP 활성을 통해서 평가하였으며, 그 결과

PLCP15에서 배양된 세포에서 가장 높은 ALP 활성을 보였다(Figure 7). 이는 PLCP15 지지체에 다량으로 도입된 CaP에 의해서 세포의 증식이 증가됨에 따라서 높은 골분화 현상이 나타나는 것으로 판단되어 진다.⁴

복합 마이크로섬유 지지체 상에서의 MC3T3-E1 세포의 분화능을 재확인하기 위해서 세포 성장 후의 광물화 반응 정도를 ARS 염색법을 이용하여 정량하였다. ARS는 2가 금속이온과의 결합이 용이하므로 광물화 반응 과정에서 생성된 칼

섬이온과 선택적으로 반응할 수 있다. 따라서 Figure 8에서 볼 수 있는 것처럼 모든 배양 시간에서 PLCP15가 가장 높은 광물화 반응을 보였다. 이들 결과로부터 복합 마이크로섬유 지지체에 도입된 CaP의 양이 MC3T3-E1 세포의 분화능에 영향을 준다는 것을 확인할 수 있었다.

결 론

자연 상태의 골조직이란 콜라겐 지지체와 CaP로 구성된 복합 재료이며 생물학적인 광물화 반응을 통해서 생성된다. 따라서 골조직 재생이란 일반적인 생체 내에서의 광물화 반응에 의한 것이기 때문에 CaP를 함유하는 복합 지지체의 개발은 골조직 재생을 위한 조직공학 분야에서 많은 관심을 받고 있다. 특히 최근에는 전기방사된 복합 나노/마이크로섬유와 같이 골조직과 유사한 형태를 가지는 지지체의 개발이 골조직 재생을 위해서 많이 연구되고 있다. 본 연구에서는 PLA와 CaP 졸을 이용하여 골조직 결손 부위의 재생을 촉진시킬 수 있는 복합 마이크로섬유를 전기방사법과 열처리 방법으로 제조하였다. 제조된 복합 마이크로섬유 지지체는 CaP 졸을 사용함에 의해서 CaP의 분산성을 향상시킬 수 있었고, 열처리 방법에 의해서 CaP 입자가 섬유의 표면에도 성공적으로 생성되는 것이 확인되었다. 또한 복합 마이크로섬유에 도입된 CaP의 양이 조골세포의 성장 및 분화에 많은 영향을 미친다는 것을 알 수 있었고, 그 중에서도 CaP의 도입량이 가장 많은 PLCP15가 조골세포의 성장 및 분화를 가장 촉진시킨다는 것이 확인되었다. 이들 결과로부터 PLA와 CaP 졸을 이용한 복합 마이크로섬유의 제조는 새로운 골조직 재생용 지지체의 개발에 많은 도움이 될 것으로 기대되어진다.

감사의 글: 이 결과물은 2015년도 대구가톨릭대학교 학술연구비 지원에 의한 것임.

참 고 문 헌

1. Amrita, A. Arora, P. Sharma, and D. S. Katti, *Carbohydr. Polym.*, **123**, 180 (2015).
2. H. Zhang, Q. W. Fu, T. W. Sun, F. Chen, C. Qi, J. Wu, Z. Y. Cai, Q. R. Qian, and Y. J. Zhu, *Colloid Surf. B: Biointerfaces*, **136**, 27 (2015).
3. X. Liu, L. A. Smith, J. Hu, and P. X. Ma, *Biomaterials*, **30**, 2252 (2009).
4. B. M. Whited, J. R. Whitney, M. C. Hofmann, Y. Xu, and M. N. Rylander, *Biomaterials*, **32**, 2294 (2011).
5. M. G. Raucci, V. Guarino, and L. Ambrosio, *Comp. Sci. Tech.*, **70**, 1861 (2010).
6. M. P. Prabhakaran, J. Venugopal, and S. Ramakrishna, *Acta Biomater.*, **5**, 2884 (2009).
7. A. Mata, Y. Geng, K. J. Henrikson, C. Aparicio, S. R. Stock, R. L. Satcher, and S. I. Stupp, *Biomaterials*, **31**, 6004 (2010).
8. C. Dhand, S. T. Ong, N. Dwivedi, S. M. Diaz, J. R. Venugopal, B. Navaneethan, M. H. U. T. Fazil, S. Liu, V. Seitz, E. Wintermantel, R. W. Beuerman, S. Ramakrishna, N. K. Verma, and R. Lakshminarayanan, *Biomaterials*, **104**, 323 (2016).
9. D. E. Seo, S. I. Jeong, J. S. Park, H. J. Gwon, S. J. An, B. H. Lee, D. S. Im, H. Shin, and Y. M. Lim, *Polym. Korea*, **41**, 143 (2017).
10. T. Kokubo, *Biomaterials*, **12**, 155 (1999).
11. A. R. Unnithan, N. A. M. Barakat, P. B. T. Pichiah, G. Gnanasekaran, R. Nirmala, Y. S. Cha, C. H. Jung, M. El-Newehy, and H. Y. Kim, *Carbohydr. Polym.*, **90**, 1786 (2012).
12. Z. Ma, F. Chen, Y. J. Zhu, T. Cui, and X. Y. Liu, *J. Colloid Interf. Sci.*, **359**, 371 (2011).
13. F. Ye, H. Guo, H. Zhang, and X. He, *Acta Biomater.*, **6**, 2212 (2010).
14. J. H. Wei, M. Yoshinari, S. Takemoto, M. Hattori, E. Kawada, B. L. Liu, and Y. Oda, *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.*, **81B**, 66 (2007).
15. F. Y. Yang, S. K. Both, X. Yang, X. F. Walboomers, and J. A. Jansen, *Acta Biomater.*, **5**, 3295 (2009).
16. K. Fujimura, M. Okada, S. Takeda, and N. Matsumoto, *Mater. Sci. Eng. C*, **35**, 259 (2014).