

플라즈마 처리한 Poly(L-Lactic Acid) 표면에서의 골아세포 거동

김승수[†] · 김형우 · 김정만* · 성진형* · 박병기**

한국화학연구소 화학소재연구단 2팀, *가톨릭대학교 의과대학 정형외과, **전북대학교 공과대학 섬유공학과
(1998년 5월 30일 접수)

Osteoblast Behavior on Plasma-Treated Poly(L-Lactic Acid)

Sung Soo Kim[†], Hyung Woo Kim, Jung Man Kim*, Jin Hyung Sung*, Pyong Ki Pak**

Biomaterials Lab., Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejeon 305-600, Korea

*Department of Orthopedic Surgery, Catholic University Medical College

**Department of Textile Eng., Chonbug National University

[†]e-mail : sskim@pado.kRICT.re.kr

(Received May 30, 1998)

요약: 본 연구에서는 플라즈마 처리에 의하여 친수화된 폴리락틱 에시드 (PLLA) 표면에서의 골조직 형성세포인 골아세포의 거동에 대하여 조사하였다. 골아세포는 Sprague Dawley 쥐의 두개골로부터 효소법을 이용하여 추출하였다. 폴리락틱 에시드 및 플라즈마 처리된 폴리락틱 에시드가 도포되어 있는 세포 배양용 폴리스티렌 플라스크에 골아세포를 4×10^4 cells/cm²의 농도로 이식하고 항은 항습기에서 배양하였다. 이 때 사용된 세포 배양액은 10% fetal bovine serum (FBS)을 포함하는 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)이었다. 배양 후 시료 표면에 증식된 세포 수는 hemocytometer를 이용하여 측정하였고, 주사 전자현미경 (SEM)으로 세포의 형태 변화를 조사하였다. 원자흡광분석기 (AAS)를 이용하여 세포 배양 후 시료표면에 부착된 칼슘의 양을 조사하였다. 플라즈마 처리한 PLLA 표면에서 세포의 퍼짐성이 미처리 PLLA 표면에 비해 컸다. 또한, 세포 배양 72시간의 세포수 변화를 조사한 결과 세포는 미처리 PLLA 표면 ($2.9 \pm 0.2 \times 10^4$ cells/cm²)에 비하여 플라즈마 처리한 PLLA 표면 ($6.6 \pm 0.4 \times 10^4$ cells/cm²)에서 현저히 증식되었으며, 칼슘 생성량도 증가하였다.

ABSTRACT: The behavior of osteoblasts, bone-forming cells, on air plasma-treated poly(L-lactic acid) was observed. Osteoblasts were isolated from calvaria of neonatal Sprague Dawley rat by an enzymatic digestive process. A confluent number of osteoblasts (4×10^4 cells/cm²) was suspended with Dulbecco's modified eagle medium supplemented with 10% fetal bovine serum, and cultured on the polystyrene culture dish coated with PLLA or air plasma-treated PLLA. The attached cells were counted using a hemocytometer to evaluate cell adhesion and growth. Cell morphology was observed using a scanning electron microscope (SEM). Calcium contents deposited on the materials after cell culture were measured using an atomic absorption spectrophotometer (AAS) to evaluate mineralization by osteoblasts. Cells were more spreaded on the plasma-treated PLLA than on the control. Cells were more proliferated on the plasma-treated PLLA than on the control when measured the number of cells after 72 h. In addition, calcium content on the plasma-treated PLLA were higher than that on the control.

Keywords: poly(L-lactic acid), osteoblast, air plasma-treatment.

서 론

생체 내에서 분해되는 생분해성 고분자들이 의료용 체내 이식재료로 최근 활발하게 응용되고 있다.¹⁻⁵ 예를들면, 생분해성 고분자로 된 약물전달 시스템을 체내에 이식하면 생분해성인 고분자 매트릭스가 체내에서 서서히 분해되며 약물을 방출하게 되어 일정한 양의 약물을 장기간 투여할 수 있는 장점이 있다. 생분해성 봉합사를 사용하면 체내에서 분해되므로 봉합사를 제거하기 위한 수술이 필요없게 된다. 골절시 사용하는 골접합재를 금속류가 아닌 생분해성 고분자로 제작하면 체내에서 분해되기 때문에 금속으로 만든 골접합재와 달리 제거수술을 할 필요가 없어 매우 편리하게 된다. 골격에 결손이 생겼을 때 결손을 보충하기 위해 환자 자신의 뼈나 전처리된 동물 또는 사람의 뼈를 이식하는데, 이들을 대신하여 생분해성 인공골격을 이식하면 이 인공골격은 체내에서 분해되며 그 자리에 생체 골조직이 성장해 들어가 완전 치유가 가능해진다.

생분해성 골접합재 및 인공골격 등과 같이 인체 내의 골조직과 직접 접촉하는 이식물의 경우, 골조직의 성장을 촉진할 수 있는 조직적합성 재료로 만들면 치유속도를 증가시킬 수 있을 것으로 사료된다. 즉 골접합재의 표면이 생체 조직 또는 세포의 성장에 적합하면 주위 골조직이 골접합재 표면에 빠른 접촉을 나타내고 이에 따라 골접합재의 기계적 안정성이 증가하고 골접합재의 움직임에 의한 주위 골조직의 손상이 감소되어 빠른 치유가 가능하게 될 것으로 사료된다. 또한 인공골격의 경우에도 재료 표면이 조직친화성이면 골조직의 성장이 촉진되어 빠른 치유가 가능하게 된다.

폴리에스테르의 일종인 폴리락틱 에시드 (PLLA), 폴리글리콜 에시드 (PGA) 및 그 공중합체들은 생체 내에서 분해되는 생분해성 고분자들로서, 그 분해산물에 해로운 독성을 유발하지 않기 때문에 생체적합성이 우수한 것으로 알려져 있어 의료용 체내 이식재료로 활발하게 응용되고 있다.⁶⁻⁸ 그러나 이들 고분자들 중 PLLA와 같이 표면 에너지가 낮고 소수성인 고분자들은 조직적합성이 대체로 우수하지 않다.

따라서 전보에서는⁹ 폴리락틱 에시드 표면을 공기 분위기 하에서 플라즈마 처리하여 친수성 표면을 만

든 다음 이의 표면성질 변화와 가수분해 거동을 조사하였고, 본 연구에서는 플라즈마 처리에 의하여 친수화된 폴리락틱 에시드의 골조직 친화성을 조사하기 위하여 골조직 형성세포인 골아세포에 대한 친화성을 조사하였다.

실 험

재 료. PLLA (Purac biochem., Holland, MW=379300)를 염화 메틸렌에 녹여 5 wt% 용액으로 제조하여 세포 배양용 24-well 폴리스티렌 플라스크 (Falcon, Becton Dickinson Co., U.S.A)에 도포한 다음 용매를 완전히 제거한 후 실험에 사용하였다.

플라즈마 처리. PLLA가 도포된 시료를 전보와⁹ 같은 조건으로 처리하였으며, 골아세포 배양 실험에서는 5초간 플라즈마 처리한 PLLA 시료를 사용하였다.

골아세포 추출. 골아세포는 생후 24시간 이내의 Sprague Dawley 쥐의 두개골로부터 효소법을 이용하여 추출하였다.¹⁰ 쥐의 두개골을 채취한 후 골막을 벗겨내고 잘게 자른 다음 collagenase/trypsin 용액으로 37 °C에서 20분간 처리하였다. 이 과정을 3회 반복한 후 3번째 효소 분해시킨 용액을 400 g로 10분간 원심 분리 하였다. Collagenase/trypsin 용액은 collagenase (C-0130; Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, U.S.A)를 2.4% bovine serum albumin (Sigma)을 함유한 Mg^{++} 와 Ca^{++} -free Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS)에 녹여 0.33% 용액으로 제조한 다음, 이 용액 5 mL와 PET 용액 1 mL을 섞어 만들었으며, PET 용액은 0.0625% trypsin (T-8253, Sigma), 0.0125% ethylene glycol-bis(b-aminoethyl ether) N,N,N',N' -tetraacetic acid (EGTA) (Sigma), 0.625% polyvinylpyrrolidone (Sigma), 26 mM N -(2-hydroxyethyl)-piperazine- N' -(2-ethanesulfonic acid) (Hepes) (Sigma), 1.125% NaCl 등을 섞어서 만들었다. 추출한 골아세포들은 세포 배양용 T-25 폴리스티렌 플라스크에 넣어 37 °C 포화 수증기와 5% CO_2 가스 분위기를 유지하고 있는 항온기에서 3회 계대 배양되었고, 이 때 사용된 세포 배양액은 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Grand Island,

NY, U.S.A) 및 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 gentamicin sulfate (Sigma)를 포함하는 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM; Sigma)이었다.

골아세포 배양. PLLA 및 플라즈마 처리된 PLLA가 도포된 세포 배양용 폴리스티렌 플라스크에 4×10^4 cells/cm²의 농도로 골아세포들을 이식하고 항온기에서 2, 24, 72, 168시간동안 배양하였다. 배양 후 시료 표면에 증식된 세포수는 배양액을 제거하고 미부착된 세포들을 PBS 용액으로 제거한 다음 trypsin-EDTA (Gibco) 용액으로 처리 후 hemocytometer (Bright-Line, Cambridge Instruments Inc., U.S.A)로 조사하였다.

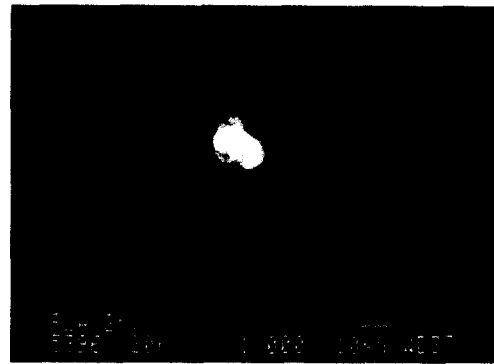
주사 전자현미경 분석. 시료 표면에서 일정시간동안 배양했을 때 부착 증식된 세포들의 형태 변화를 관찰하기 위하여 2.5% glutaraldehyde (Sigma) 용액으로 2시간동안 처리하여 시료 표면에 세포들을 고정화시켰고, PBS 용액으로 수회 세척한 후 농도가 다른 에탄올 수용액 시리즈 (50, 60, 70, 80, 90, 100%)에 각각 10분씩 침지시켜 수분을 제거하였다.

수분이 제거된 시료는 실온에서 건조시킨 다음 금을 코팅 후 주사 전자현미경 (SEM; JSM-840A, JEOL, Japan)으로 관찰하였다.

칼슘 생성량 조사. 골아세포에 의한 골조직의 무기물질 생성량을 조사하기 위하여 시료 표면에서 골아세포를 7일간 배양하였고, 배양액을 2일 간격으로 새롭게 교체하였다. 시료표면에 7일동안 부착 증식된 골아세포를 PBS로 3회 세척한 다음 -72 °C에서 6시간 동결시킨 후 상온에서 tris buffer (pH 8.0, Sigma)를 첨가하여 1회용 세포 긁게 (cell scraper)로 시료 표면에 부착된 세포를 분리하였다. 분리된 세포를 얼음 욕조 속에서 초음파 분쇄기로 처리한 다음 원자흡광분석기 (AAS; Perkin-Elmer 2380, U.S.A)를 이용 생성된 칼슘의 양을 조사하였다.

결과 및 고찰

세포 친화성 평가. 일반적으로 조직세포가 증식하려면 우선 세포가 재료 표면에 강력히 부착되어야 한다. 세포가 재료 표면에 부착되지 않으면 성장할 수가 없기 때문에 재료 표면은 세포 친화성을 가지고 있어야 한다. 재료 표면의 세포 친화성을 평가하기



(a)



(b)

Figure 1. Morphology of osteoblasts cultured on the surfaces of control and air-plasma treated PLLA for 2 h: (a) control, (b) air plasma-treated PLLA (SEM, magnification: $\times 1000$).

위해서는 실험실적 (*in vitro*) 세포 배양 실험을 통하여 일정시간 배양 후 표면에 부착 성장된 세포의 수를 계산한다든지 또는 형태 변화를 관찰하는 것이 일반적인 방법이다.¹¹⁻¹³

Fig. 1은 플라즈마 처리한 PLLA와 미처리 PLLA 표면 위에 골아세포를 이식하고 2시간 동안 배양한 후 시료 표면에 부착된 세포들의 형태 변화를 SEM으로 찍은 그림이다. 미처리 PLLA 표면에 부착된 세포는 약간의 세포질 돌기 (dendritic)들이 보이고 있으나 위축이나 퍼짐 현상은 일어나지 않았고, 뚜렷한 형태 변화 없이 원형의 상태를 유지하고 있었다. 반면 플라즈마 처리한 PLLA 표면에서는 세포가 완전히 부착되어 위축 (pseudopodia) 및 퍼짐 (flattening) 현상을 보여주고 있다.

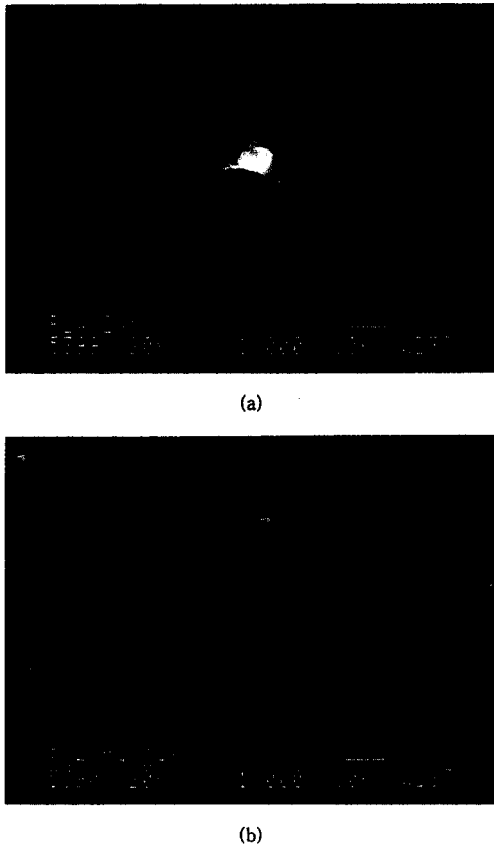


Figure 2. Morphologies of osteoblasts cultured on the surfaces of control and air-plasma treated PLLA for 24 h: (a) control, (b) air plasma-treated PLLA (SEM, magnification: $\times 1000$).

일반적으로 세포는 접촉하고 있는 표면이 성장하기에 적합할 경우에는 위축 형성과 퍼짐 현상을 보이면서 재료 표면에 완전히 점착하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 플라즈마 처리한 PLLA 표면에서 세포가 완전히 부착되어 위축 및 퍼짐 현상을 보이는 것은 플라즈마 처리에 의하여 PLLA 표면의 친수성이 증가되었기⁹ 때문에 세포가 성장하기에 적합한 표면으로 변화되어 일어난 현상으로 사료된다.

Fig. 2는 시료 표면에 골아세포를 24시간동안 배양한 후 시료 표면에 부착된 세포들의 형태 변화를 SEM으로 찍은 그림이다. 미처리 PLLA 표면에 부착된 세포는 2시간동안 배양한 후 관찰되었던 세포에서 볼 수 없었던 위축들은 보이고 있으나 퍼짐 현

상은 크게 일어나지 않았고, 세포는 아직까지 원형의 상태를 유지하고 있다.

한편 플라즈마 처리한 PLLA 표면에서는 2시간 동안 배양한 후 관찰되었던 세포 형태보다 퍼짐 현상이 현저히 일어나서 세포의 형태를 알아보기 어려울 정도로 성장된 모습을 보여주고 있다.

일반적으로 세포가 일단 재료 표면에 부착하게 되면 자신이 성장하기에 적합한 표면일 경우 위축을 뺀 채 되고, 다음 단계에서 세포질 표면에 거미줄 형태의 망상 구조를 형성하며, 세포는 납작하고 길쭉하게 성장을 한다. 이러한 세포의 성장 및 증식 정도를 알아보기 위하여 플라즈마 처리한 PLLA와 미처리 PLLA 표면 위에 각각 2시간, 24시간 및 72시간 배양된 골아세포를 전자 현미경으로 200배의 배율로 촬영하여 Fig. 3에 나타내었다. 그림에서 보여 주듯이 미처리 PLLA 표면에서는 72시간 배양된 후에 겨우 망상 구조를 형성하며 성장하기 시작한 반면 플라즈마 처리한 PLLA 표면에서는 단지 2시간 배양된 후에도 벌써 부착과 동시에 성장 및 증식이 이루어지고 있음을 보여주고, 또한 72시간 배양된 후에는 세포의 성장 및 증식이 증가되어 재료 표면을 완전히 덮고 있음을 보여주고 있다.

Fig. 4는 플라즈마 처리한 PLLA와 미처리 PLLA 표면 위에 배양된 골아세포를 배양 시간에 따라 각각 채취한 후 hemocytometer로 세포수를 측정하여 나타낸 그림이다. 골아세포를 2시간 배양 후 부착된 세포수를 측정한 결과, 미처리 PLLA 표면에서 부착된 세포수는 $1.1 \pm 0.1 \times 10^4$ cells/cm²인 반면 플라즈마 처리한 PLLA 표면에서는 부착된 세포수가 $2.0 \pm 0.2 \times 10^4$ cells/cm²로 플라즈마 처리한 PLLA 표면에서 골아세포의 부착이 증가됨을 알 수 있었다. 또한 세포배양 72시간의 세포수 변화를 조사한 결과 플라즈마 처리한 PLLA 표면 ($6.6 \pm 0.4 \times 10^4$ cells/cm²)에서 세포의 성장속도가 미처리 PLLA 표면 ($2.9 \pm 0.2 \times 10^4$ cells/cm²)에 비하여 현저히 증가하였다.

무기질 침착 (Mineral Deposition). 플라즈마 처리한 PLLA와 미처리 PLLA 표면에서의 골아세포에 의해 생성된 무기질 즉 인산칼슘의 침착을 평가하기 위하여 재료 표면에서 골아세포를 1주일동안 배양시킨 후 원소 분석기로 침착된 칼슘의 양을 측정하여

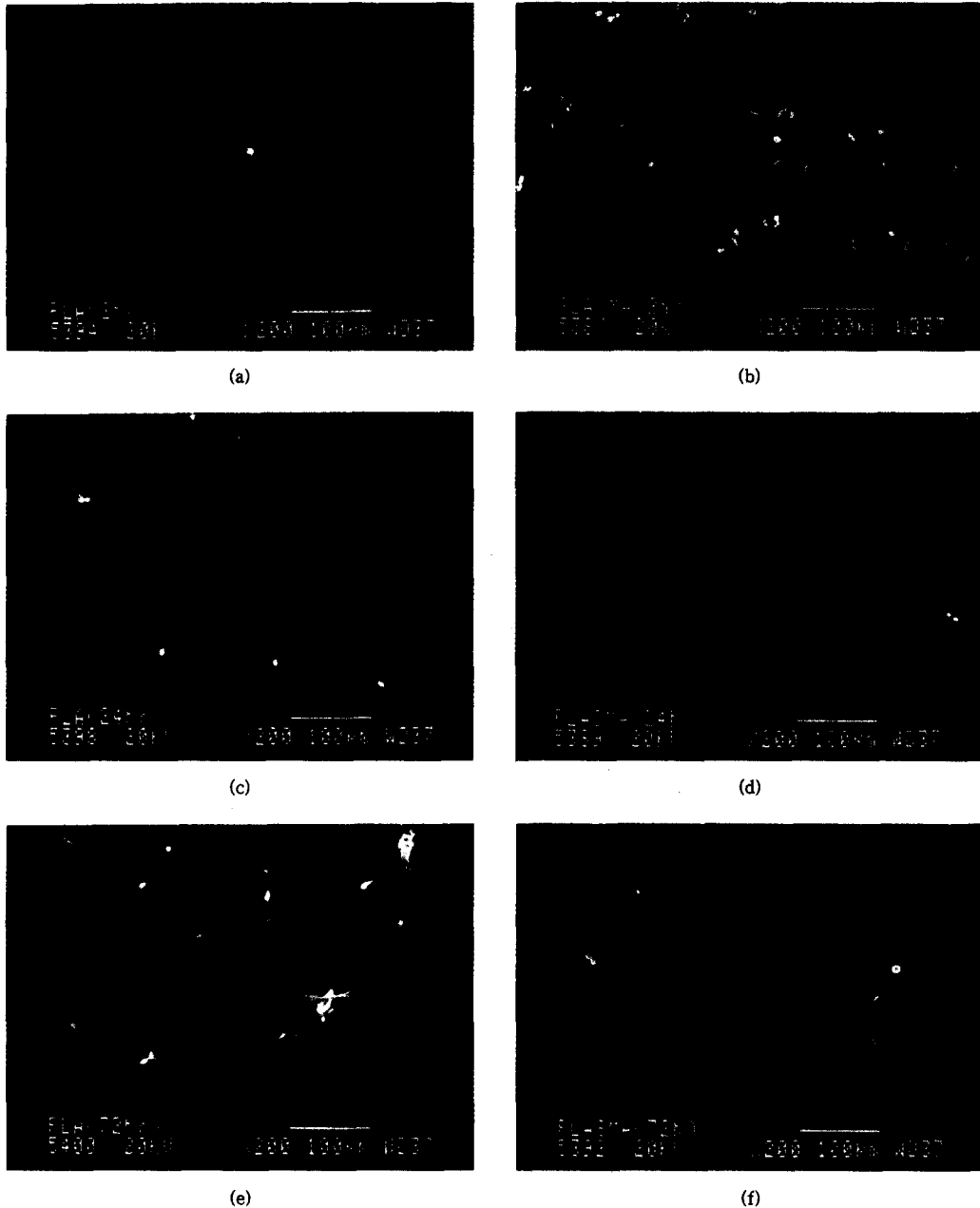


Figure 3. SEM photographs of osteoblasts grown on the surfaces of control and air-plasma treated PLLA: (a) control after 2 h, (b) air-plasma treated PLLA after 2 h, (c) control after 24 h, (d) air-plasma treated PLLA after 24 h, (e) control after 72 h, (f) air-plasma treated PLLA after 72 h (magnification : $\times 200$).

Table 1에 나타내었다. 표에서 보는 바와같이 골아세포에 의한 칼슘 생성량이 미처리 PLLA에 비해 플

라즈마 처리한 PLLA 표면에서 많았다. 이와같이 침착된 칼슘량의 증가는 생체 골조직을 형성하는 무기

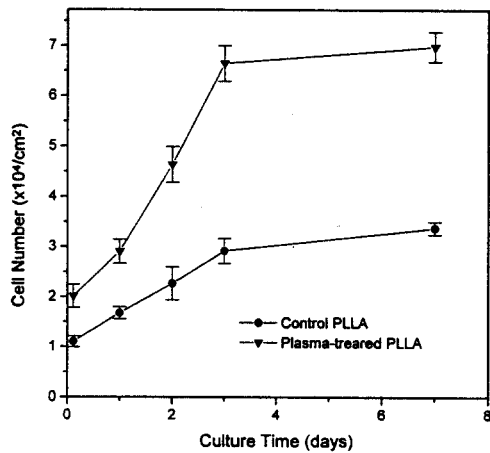


Figure 4. Growth of osteoblasts on the surfaces of control and air-plasma treated PLLA as a function of culture time. Sample number, n=3.

Table 1. Contents of Calcium Deposited on the Surfaces of Control and Air-plasma Treated PLLA after 1 wk in Culture

materials	calcium content ($\mu\text{g}/\text{well}$) ^a
control PLLA	1.2 $\pm$ 0.2
air-plasma treated PLLA	2.5 $\pm$ 0.3

^a Values represent the mean $\pm$ standard deviation of 3 samples.

물질인 인산칼슘의 증가를 의미한다.

이와같은 결과로부터 실제 생체 내에서 미처리 PLLA에 비해 플라즈마 처리한 PLLA의 표면에 골조직들이 보다 빨리 침착될 수 있을 것으로 추정된다. 나사 또는 핀과 같은 골절 고정용 재료에의 빠른 골조직 침착은 고정용 재료의 기계적 안정성을 향상시켜 빠른 치료효과를 유도할 수 있어 임상적으로 매우 바람직한 것으로 알려져 있다.¹⁴

결 론

본 연구에서는 의료용 체내 이식재료의 골조직에 대한 친화성을 증가시키기 위하여 생분해성 고분자인 PLLA에 플라즈마 처리를 행하여 표면을 친수화시켰다. 그리고 친수성에 따른 PLLA의 골조직과의 친화

성을 조사하기 위하여 골아세포의 부착 및 성장성, 칼슘 생성량 등을 조사하였다. 그 결과, 플라즈마 처리한 PLLA 표면에서 골아세포의 부착 및 성장성이 미처리 PLLA 표면에 비해 현저히 향상되었고 칼슘 생성량도 증가하였다.

감사의 글: 이 논문은 1997년도 한국과학재단 검직(객원)교수 파견 지원사업의 연구비 지원으로 수행되었으므로 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. I. Engelberg and J. Kohn, *Biomaterials*, **12**, 292 (1991).
2. K. W. Leong, B. C. Brott, and R. Langer, *J. Biomed. Mater. Res.*, **19**, 941 (1985).
3. D. K. Gilding and A. M. Reed, *Polymer*, **20**, 1459 (1979).
4. C. T. Laurencin, S. F. El-Amin, S. E. Ibim, D. A. Willoughby, M. Attawia, H. R. Allcock, and A. A. Ambrosio, *J. Biomed. Mater. Res.*, **30**, 133 (1996).
5. K. Whang, C. H. Thomas, K. E. Healy, and G. Nuber, *Polymer*, **36**, 837 (1995).
6. M. A. Malik, D. A. Puleo, R. Bizios, and R. H. Doremus, *Biomaterials*, **13**, 123 (1992).
7. M. Gregoire, I. Orly, and J. Menanteau, *J. Biomed. Mater. Res.*, **24**, 165 (1990).
8. K. A. Athanasiou, G. G. Niederauer, and C. M. Agawal, *Biomaterials*, **17**, 93 (1996).
9. H. W. Kim, J. M. Kim, and S. S. Kim, *Polymer(Korea)*, **22**, 455 (1998).
10. S. L. Ishaug, M. J. Yaszemski, R. Bizios, and A. G. Mikos, *J. Biomed. Mater. Res.*, **28**, 1445 (1994).
11. D. A. Puleo and R. Bizios, *J. Biomed. Mater. Res.*, **26**, 291 (1992).
12. D. A. Puleo, L. A. Holleran, R. H. Doremus, and R. Bizios, *J. Biomed. Mater. Res.*, **25**, 711 (1991).
13. H. S. Cheung and M. H. Haak, *Biomaterials*, **10**, 63 (1989).
14. K. C. Dee, D. C. Rueger, T. T. Andersen, and R. Bizios, *Biomaterials*, **17**, 209 (1996).