

## 조형가공기술을 이용한 인공지지체의 수산화나트륨 개질 효과

박수아<sup>†</sup> · 이정복<sup>\*\*\*</sup> · 김양은 · 김지은<sup>\*\*</sup> · 권일근<sup>\*\*</sup> · 이준희 · 김완두 · 김형근<sup>\*\*\*</sup> · 김미은<sup>\*\*\*\*</sup> · 이준식<sup>\*\*\*\*</sup>  
한국기계연구원 나노융합기계연구본부, \*경희대학교 치의학전문대학원 악안면생체공학교실, \*\*밴더빌트대학교 의용공학과,  
\*\*\*전남대학교병원 심혈관계 융합연구센터, \*\*\*\*조선대학교 자연과학대학 생물학과 면역제어연구실  
(2014년 6월 12일 접수, 2014년 8월 4일 수정, 2014년 8월 5일 채택)

## Effect of Sodium Hydroxide Treatment on Scaffold by Solid Freeform Fabrication

SuA Park<sup>\*,†</sup>, JungBok Lee<sup>\*\*\*</sup>, YangEun Kim, JiEun Kim<sup>\*\*</sup>, IlKeun Kwon<sup>\*\*</sup>, JunHee Lee, WanDoo Kim,  
HyungKeun Kim<sup>\*\*\*</sup>, MiEun Kim<sup>\*\*\*\*</sup>, and JunSik Lee<sup>\*\*\*\*</sup>

Nano Convergence & Manufacturing Systems Research Division,  
Korea Institute of Machinery & Materials (KIMM), Daejeon 305-343, Korea

\*Dept. of Maxillofacial Biomedical Engineering, School of Dentistry, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

\*\*Dept. of Biomedical Engineering, Vanderbilt University, Nashville, TN37235, United States

\*\*\*Cardiovascular Convergence Research Center, Chonnam National University Hospital, Gwangju 5-1-757, Korea

\*\*\*\*Dept. of Biology, College of Natural Science, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

(Received June 12, 2014; Revised August 4, 2014; Accepted August 5, 2014)

**초록:** 조직공학에서의 인공지지체는 세포의 부착과 증식 및 분화가 잘 되어야 하고, 우수한 생체친화성 및 생분해성을 지녀야 한다. 다양한 인공지지체 제작 방법이 시도되어지고 있으며, 최근들어 3D 프린팅 기술을 이용한 방식이 활발하게 연구되어지고 있다. 폴리카프로락톤(polycaprolactone, PCL)은 낮은 녹는점을 가지고 있어 3D 프린팅하기에 우수한 생체적합 고분자 합성재료이다. 본 연구에서는 3D 프린팅 기술을 이용하여 3차원 PCL 인공지지체를 제작하였고, 지지체의 표면개질을 위해 수산화나트륨(NaOH)을 이용하였다. 표면개질된 인공지지체의 표면특성을 SEM으로 확인한 결과, 수산화나트륨을 처리한 PCL 인공지지체가 처리하지 않은 PCL 인공지지체에 비해 거칠기가 증가함을 보였으며, 접촉각 측정을 통해 친수성이 증가함을 확인하였다. *In vitro* 실험결과, 수산화나트륨을 처리한 PCL 인공지지체가 처리하지 않은 PCL 인공지지체에 비해 세포의 증식과 분화가 증가함을 보였고, 세포의 부착 모습은 균일하고 밀집된 형태로 부착됨을 확인하였다. 따라서 조형가공기술을 이용하여 수산화나트륨을 처리한 표면개질된 PCL 인공지지체를 제작하고 분석함으로써, 세포적합성을 통해 체내 인공지지체 개발 적용 가능성을 제시하였다.

**Abstract:** Scaffolds of tissue engineering should be biocompatible and biodegradable for cell attachment, proliferation and differentiation. In the various scaffold fabrication, 3D printing technique can make the three dimensional scaffold with interconnected pores for cell ingrowth. Polycaprolactone (PCL) is biodegradable polyester with a low melting temperature and has been approved by the Food and Drug Administration (FDA). In this study, PCL scaffold was fabricated by 3D bioprinting system and surface modification of PCL scaffold was controlled by NaOH treatment. Morphological change and wettability of NaOH-treated scaffold were observed by SEM and contact angle measurement system. The remnant of PCL treated with NaOH was measured by ATR-FTIR. *In vitro* study of scaffolds was evaluated with WST-1 and ALP activity assay. NaOH treatment of PCL scaffolds increased surface roughness, hydrophilicity, cell proliferation and osteogenic differentiation. These results indicate that NaOH-treated PCL scaffold made by 3D bioprinting has tissue engineered potential for the development of biocompatible material.

**Keywords:** tissue engineering, polycaprolactone (PCL), solid freeform fabrication (SFF), surface modification.

## 서 론

조직공학에서 인공지지체는 생체적합성이 우수해야 하며,

세포독성이 없어야 하고, 생분해성 및 기계적 특성을 가져야 한다. 또한 구조적으로 인공지지체 내부에 세포의 부착을 용이하게 하기 위하여 큰 표면적의 부피와 다공성을 가져야 한다.<sup>1,2</sup> 인공지지체를 제작하는 방식은 여러 가지가 있으나 아직 정형화 또는 표준화된 방식이 없다. 최근들어 3차원 구조

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: psa@kimm.re.kr

적 인공지지체의 물리적 조건들을 만족시키기 위해 조형가공 기술을 이용한 3D 프린팅 방법이 사용되고 있다. 조형가공 기술의 대표적인 방법은 입체인쇄술(stereolithography, SLA), 선택적 레이저 소결 기술(selective laser sintering, SLS), 압출 방식(fused deposition modeling, FDM), 3D 프린팅(three dimensional printing) 방식 등이 있다. 이러한 방법들은 컴퓨터 제어를 통해 제작되어짐으로 인공지지체 제작법의 재현성이 높고, 가공의 구조제어가 가능하며 3차원 형상을 정교하게 제작할 수 있다. 또한 이러한 방법을 통해 제작된 3차원적 인공지지체는 가공을 가지는 우수한 내부연결구조를 지니고 있어 세포의 침투를 통해 세포의 증식과 분화를 향상시켜 균일한 조직의 재생을 기대할 수 있다.<sup>3,4</sup>

SLA 방식은 액체의 재료를 이용하여 레이저 광을 선택적으로 조사하여 지지체 구조를 한층한층 쌓아가는 방식으로 사용되는 광가교성 재료가 독성이 있어 생체적합성이 떨어진다는 단점을 가지고 있다. SLS는 분말타입의 재료를 사용하여 재료의 가격이 비싸며 정교한 형태를 구현하기 힘들다. 또한 FDM은 스트랜드의 가장자리를 녹여 층층이 붙여주기 때문에 연결성이 약하다는 단점을 가지고 있다. 따라서 본 연구에서는 생체재료를 용융하여 사용할 수 있는 플로팅 기법을 조형가공기술의 프린팅 기술에 이용하였다. 이러한 프린팅 기술에 사용되는 생체재료는 합성재료와 천연재료로 나뉘어질 수 있는데, 그 중에서 생분해성/생체적합성 합성재료인 폴리카프로락톤(polycaprolactone, PCL)은 FDA의 승인을 받은 생체적합소재로서, 녹는점이 낮아 플로팅 기법에서 사용하기에 용이하며 적절한 탄성 및 기계적 강도를 가져 주로 골이식재료로 사용되고 있다.<sup>5</sup> 일반적으로 생체내 환경 및 세포배양을 위해서는 생체재료가 친수성을 가지는 것이 좋다. 그러나 PCL은 구조적으로 메틸기를 가지고 있어 상대적으로 높은 소수성을 지니고 있어 단백질 부착에 어려움을 가질 수 있으며 이로 인하여 세포부착의 효율을 떨어뜨릴 수 있으므로, 세포의 초기부착률과 조직재생률에 영향을 미칠 수 있다. 따라서 이러한 PCL의 단점을 보완하여 초기세포 부착능력 및 세포성장 속도를 향상시킬 수 있는 방법에 대한 연구가 진행되고 있다.<sup>6-8</sup> 그 중 수산화나트륨을 이용하여 PCL표면의 거칠기를 조절함으로써 세포의 부착을 높이고 증식 및 분화에 대한 연구가 있다.<sup>9</sup>

본 연구에서는 조형가공기술의 프린팅 기법을 이용하여 제작된 인공지지체에 수산화나트륨을 처리하여 인공지지체의 특성변화 및 그로 인한 세포반응을 관찰하였다.

## 실 험

**재료 및 시약.** 생분해성 고분자 폴리카프로락톤(PCL, 분자량 40000)과 표면개질을 위해 사용된 수산화나트륨(sodium hydroxide, NaOH)은 시그마 알드리치(Sigma-Aldrich, 미국)

에서 구입하였다. *In vitro* 세포실험을 위하여 사용한 MG-63 세포주는 한국세포주은행에서 분양받았다.

**3차원 인공지지체 제작 및 표면개질.** 3차원 인공지지체 제작을 위해 조형가공기술을 이용한 3차원 바이오프린팅 시스템을 사용하였다. 바이오프린팅 시스템은 3축 스테이지를 기본으로 압력 컨트롤러, 온도 컨트롤러와 노즐로 구성되어 있으며, 3차원으로 형상으로 이미지 파일을 제작하여 한층한층 적층할 수 있는 구동프로그램을 이용하여 인공지지체를 제작하였다. 히팅챔버에서 PCL을 충분히 녹인 후 노즐을 통해 토출되도록 하였고, 압력과 속도를 조절하여 3차원 인공지지체를 제작하였다. 300  $\mu\text{m}$ 의 노즐을 사용하여 300  $\mu\text{m}$ 의 스트랜드 간격으로 제작하였고, 마이크로 CT 장비를 이용하여 인공지지체의 기공률을 측정하였다. 이때 표면개질을 위한 수산화나트륨 처리는 PCL 인공지지체 5×5×5 mm 크기의 정육면체로 준비하였다. 준비한 시편을 10 N의 NaOH 용액으로 각각 2시간 및 4시간 동안 처리한 뒤 증류수를 이용하여 세척하였다.

**인공지지체의 특성 분석.** 제작된 인공지지체의 기공률은 마이크로 표면은 주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM; FEI)을 이용하여 관찰하였다. 표면개질된 지지체의 친수성은 접촉각 측정 장치(contact angle meter; Kyowa)를 이용하여 분석하였다. 시편에 증류수 10  $\mu\text{L}$ 를 떨어뜨린 뒤, 시편의 측방에서 접사 렌즈를 장착하여 디지털 카메라(D80, Nikon, Japan)로 촬영하여 시편의 표면에 떨어진 액적의 상태를 확인하였다.

인공지지체의 화학적인 구조는 전반사 적외선 분광기(attenuated total reflection-Fourier Transform infrared, ATR-FTIR; TENSOR FTIR spectrometer, Bruker)를 이용하여 분석하였다.

**인공지지체의 *in vitro* 분석.** 표면개질한 인공지지체를 평가하기 위해 세포는 human osteosarcoma cell line(골육종세포주, MG-63)을 사용하였다. 세포를 배양하기 위한 배지는 10% fetal bovine serum(FBS, Hyclone, NC, USA)와 1% Penicillin/Streptomycin를 포함하는 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM, Gibco BRL, MD, USA)을 사용하였으며, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. T75 플라스크에서 단층배양하여 증식된 MG-63 세포는 트립신으로 회수하여 5×10<sup>5</sup> 개를 접종하여 실험하였다.

인공지지체의 초기부착률을 알아보기 위해 세포배양 후 4 시간째 세포수를 측정하였다. 인공지지체에서 배양된 세포의 증식을 측정하기 위하여 WST-1 assay(Premix WST-1 Cell proliferation Assay System, Takara, Japan)를 이용하였다. 인공지지체에서 세포배양 시작 후 3일과 7일째에 세포가 부착된 지지체를 WST-1 용액 200  $\mu\text{L}$ 에 담근 후 37°C에서 1시간 동안 반응시키고 마이크로플레이트 리더를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포주의 골세포로의 분화를 측

정하기 위하여 ALP assay(TRACP & ALP assay kit, Takara, Japan)를 시행하였다. 인공지지체에 세포 부착 후 7일째에 지지체에 부착된 세포를 cell lysis buffer를 이용하여 lysate를 얻어내고 ALP 반응액에서 37 °C에서 1시간 동안 반응시켜 415 nm에서 흡광도를 측정하였고 총단백질양을 이용해 정량화하였다. 인공지지체에 MG-63 세포를 접종 후 7일 뒤 세포를 고정하였다. 고정된 세포를 형광염색한 뒤 현광현미경을 통해 부착된 세포의 형태학적 분석을 시행하였다.

**결과 및 토론**

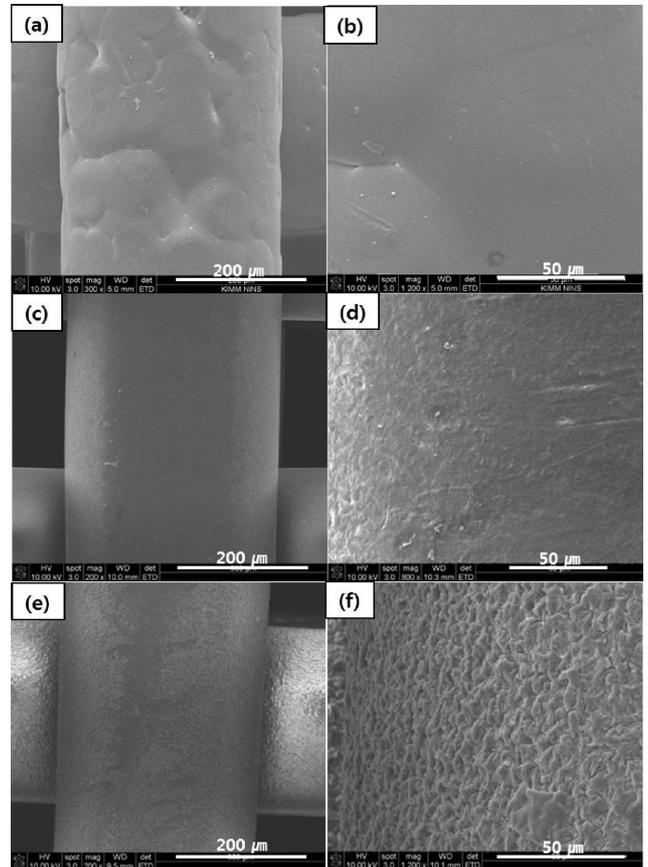
본 연구에서는 3D 바이오프린팅 시스템을 이용하여 제작한 인공지지체의 세포친화성을 높이기 위해 수산화나트륨을 처리하여 지지체의 거칠기 및 친수성 개질을 하였으며 MG-63 세포 배양을 통해 지지체의 생체적합성을 확인하였다(Figure 1).

**인공지지체의 특성분석.** 3D 바이오프린팅을 이용하여 제작되어진 인공지지체의 기공률 측정 결과, 300 μm 스트랜드 굵기를 가지고, 300 μm 간격을 가지는 샘플의 예상 기공률은 50.0%이며, 마이크로 CT를 통해 얻어진 실제 기공률은 53.5%로서, 인공지지체의 예상 기공률과 측정 결과 기공률의 큰 차이가 없음을 확인하여 인공지지체를 디자인할 때 기공률을 예측할 수 있다.

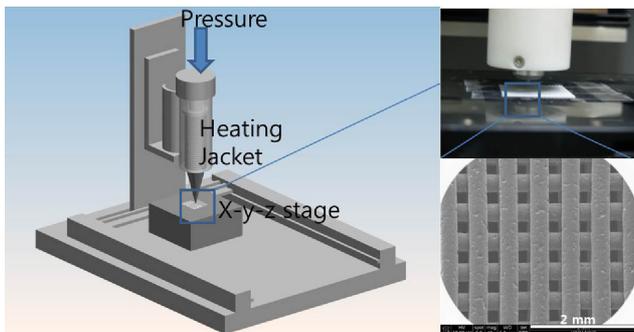
수산화나트륨에 의한 인공지지체 표면의 패턴변화를 확인하기 위하여 지지체 표면을 SEM을 이용하여 관찰하였다(Figure 2). 표면개질 전과 후의 인공지지체 모두 균일한 격자구조를 가지고 있으므로 일정한 세포의 침투가 가능할 것으로 보여진다. 표면개질하지 않은 지지체에 비해 표면개질한 지지체 표면의 거칠기가 수산화나트륨 처리시간에 따라 증가함을 보였다.

또한 개질된 인공지지체의 친수성 증가를 측정하기 위하여 접촉각을 측정하였다(Figure 3). 그 결과, 수산화나트륨을 처리하지 않은 지지체에서 물방울이 표면에 둥근 형태로 맺혀 있는 반면에 수산화나트륨을 처리한 인공지지체에서는 증가

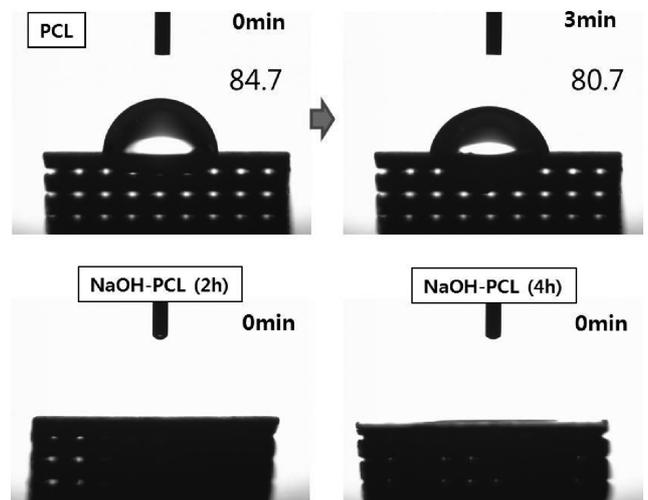
된 표면 친수성에 의해 물방울이 지지체 표면에 떨어트림과 동시에 표면으로 빠르게 스며드는 것을 확인할 수 있었다. 수산화나트륨을 처리하지 않은 실험군에서는 시간이 지남에



**Figure 2.** SEM images of 3D bioprinted scaffolds: (a) and (b) PCL scaffold; (c) and (d) NaOH treated PCL scaffold for 2 hours; (e) and (f) NaOH treated PCL scaffold for 4 hours.



**Figure 1.** 3D bioprinting system and scaffold fabrication.



**Figure 3.** Contact angle measurement of 3D bioprinted scaffolds.

따라서도 접촉각의 큰 변화를 나타내지 않았다.

개질된 인공지지체의 표면 구조 분석을 위해 전반사 적외선 분광기(attenuated total reflection-fourier transform infrared, ATR-FTIR)를 이용하여 측정하였다(Figure 4). 1727과 1170  $\text{cm}^{-1}$ 에 나타나는 밴드는 PCL의 C=O와 C-O를 나타내며 수산화나트륨 반응 시간에 따라 -OH 밴드가 증가함을 확인하였다. 이는 수산화나트륨에 의해 지지체 표면이 PCL의 가수분해에 의해 -COOH와 -OH가 형성되기 때문이다.

**인공지지체의 *in vitro* 분석.** 앞선 결과에서 얻어진 친수성 및 거칠기가 증가된 인공지지체의 초기 세포부착 영향을 알아보기 위해 세포점착률을 측정하였다. 세포 접종 후 4시간 뒤 세포 수 측정 결과, 수산화나트륨을 처리한 군과 처리하지 않은 군의 세포 수에서 유의한 차이를 나타내지 않았다(Figure 5).

수산화나트륨의 처리로 인하여 표면개질화 및 친수성이 증가된 인공지지체에서의 골세포 증식 및 분화정도를 측정하였다. 수산화나트륨을 처리하지 않은 인공지지체와 2시간, 4시간 처리한 인공지지체에 MG-63 세포를 부착하여 배양하였으며 3일과 7일째에 WST-1을 측정하여 세포의 증식을 확인하였다(Figure 6). 그림에서와 같이 모든 군에서 3일째보다 7일째에 더 높은 세포 증식을 확인할 수 있었으며, 이는 인공

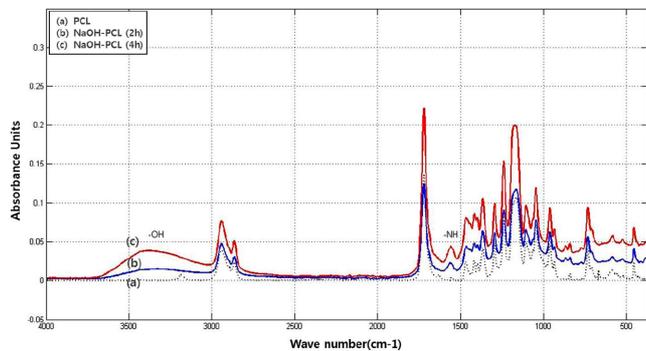


Figure 4. ATR-FTIR results of 3D bioprinted scaffolds.

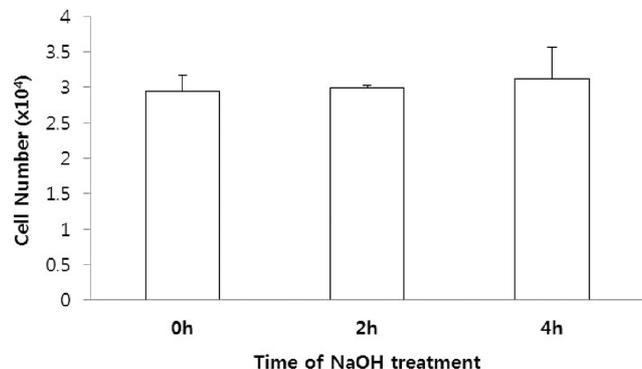


Figure 5. Cell counts of 3D bioprinted scaffolds (n=4).

지지체에 부착된 세포가 인공지지체에서 지속적으로 세포성장을 하였음을 알 수 있었다. 2시간 및 4시간 수산화나트륨을 처리한 인공지지체의 세포성장률이 처리하지 않은 지지체에 비해 더 높은 세포성장률을 나타내었다. 따라서 수산화나트륨을 처리한 인공지지체에서 골육종세포의 세포성장을 촉진하는 것을 확인하였다.

세포의 성장을 촉진시키는 수산화나트륨의 효과가 세포의 분화에 영향을 미치는지 확인하기 위하여 골육종세포를 인공지지체에 부착시킨 후 7일간 배양한 뒤 골세포 분화의 지표가 될 수 있는 alkaline phosphatase(ALP)를 측정하였다(Figure 7). 그 결과, 수산화나트륨을 처리한 인공지지체에서 배양된 세포에서 ALP의 양이 증가함을 확인하였고 따라서, 인공지지체에 수산화나트륨을 처리하였을 경우, 골육종세포의 분화를 증가시킴을 확인할 수 있었다.

3D 바이오프린팅 기법을 이용하여 제작되어진 PCL 인공지지체와 수산화나트륨을 처리한 인공지지체의 표면에 세포의 부착모습을 형광현미경을 이용하여 관찰한 결과(Figure 8), 수산화나트륨을 처리한 인공지지체에서 처리하지 않은 그룹

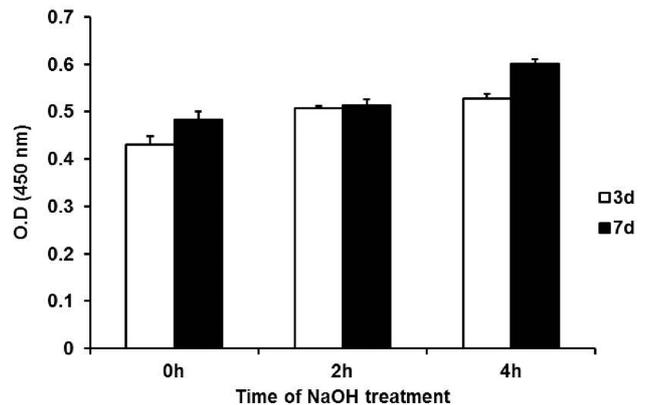


Figure 6. WST-1 results of 3D bioprinted scaffolds (n=4).

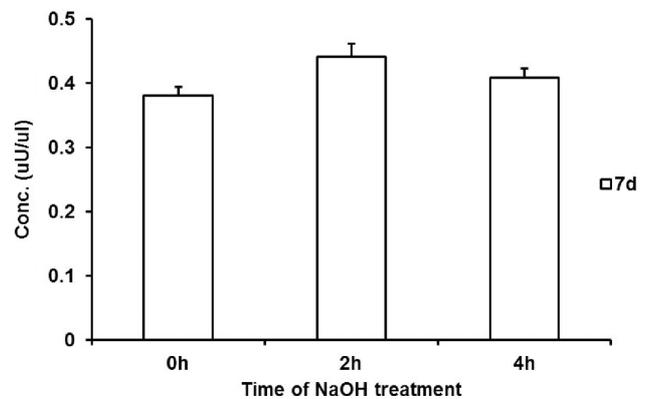
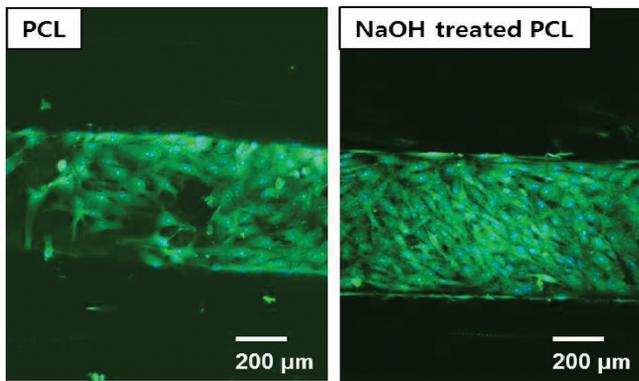


Figure 7. Alkaline phosphatase activities of 3D bioprinted scaffolds (n=4).



**Figure 8.** Fluorescent images of 3D bioprinting scaffolds.

에 비해 비교적 많은 수의 세포가 부착되어 있었으며 균일한 세포 부착모습으로 조밀도가 높았음을 확인할 수 있었다.

## 결 론

본 연구는 쾌속조형가공기술을 이용한 3D 프린팅장비를 이용하여 3차원의 PCL 인공지지체를 제작하였으며, 인공지지체의 기능성 생체재료 개발을 위하여 수산화나트륨 처리를 통해 세포친화성 및 분화율을 증가시킬 수 있는지 확인하고자 하였다. 그 결과, 수산화나트륨은 PCL 인공지지체의 표면의 개질화와 친수성을 증가시키고 세포증식과 분화를 촉진시킴을 확인하였다. 따라서 수산화나트륨이 처리된 PCL 인공

지지체가 조직 재생을 위한 생체적합성 재료로 개발이 가능함을 의미한다.

**감사의 글:** 본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업(HI13C1527)과 지식경제부 기술혁신사업(10038666)의 지원에 의하여 이루어진 것임.

## 참 고 문 헌

1. D. W. Hutmacher, *Biomaterials*, **21**, 2529 (2000).
2. F. Jakob, R. Ebert, A. Lgnatius, T. Matsushita, Y. Watanabe, J. Groll, and H. Walles, *Maturitas*, **75**, 118 (2013).
3. W. Y. Yeong, C. K. Chua, K. F. Leong, and M. Chandrasekaran, *Trends in Biotechnology*, **22**, 643 (2004).
4. L.G. Griffith, *Ann. NY Acad. Sci.*, **961**, 83 (2002).
5. J. M. Willams, A. Adewunmi, R. M. Schek, C. L. Flanagan, P. H. Krebsbach, S. E. Feinberg, S. J. Hollister, and S. Das, *Biomaterials*, **26**, 4817 (2005).
6. T. K. Dash and V. B. Konkimalla, *Mol. Pharmaceut.*, **158**, 15 (2012).
7. M. E. Hoque, D. W. Hutmacher, W. Feng, S. Li, M. H. Huang, M. Vert, and Y. S. Wong, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **16**, 1595 (2005).
8. L. Shor, S. Guceri, R. Chang, J. Gordon, Q. Kang, L. Hartsock, Y. An, and W. Sun, *Biofabrication*, **1**, 015003 (2009).
9. M. C. Serrano, M. T. Portoles, M. Vallet-Regi, I. Izquierdo, L. Galletti, J. V. Comas, and R. Pagani, *Macromol. Biosci.*, **5**, 415 (2005).