

감마선을 이용한 아크릴산이 도입된 골조직공학용 PCL/BCP 나노섬유 지지체의 개발

정진오[#] · 정성린[#] · 신영민[#] · 박종석 · 권희정 · 안성준* · 허중보** · 신홍수*** · 임윤목[†]

한국원자력연구원 첨단방사선연구소 공업환경연구부, *농업회사법인 (주)자담,
부산대학교 치의학과, *한양대학교 생명공학과
(2014년 8월 9일 접수, 2014년 10월 1일 수정, 2014년 11월 16일 채택)

Development of Acrylic Acid Grafted Polycaprolactone (PCL)/Biphasic Calcium Phosphate (BCP) Nanofibers for Bone Tissue Engineering Using Gamma-Irradiation

Jin-Oh Jeong[#], Sung In Jeong[#], Young Min Shin[#], Jong-Seok Park, Hui-Jeong Gwon, Sung-Jun An*,
Jung-Bo Huh**, Heungsoo Shin***, and Youn-Mook Lim[†]

Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute,
1266 Sinjeong-dong, Jeongeup-si, Jeollabuk-do 580-185, Korea

*Jadam Co, Topyeong-dong, Seogwipo-si, Jeju 697-860, Korea

**Department of Prosthodontics, School of Dentistry, Pusan National University, Dental Research Institute,
Beomeo-ri, Mulgeum-eup, Yangsan, Gyeongnam 626-870, Korea

***Department of Bioengineering, Division of Applied Chemical and Bio Engineering, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

(Received August 9, 2014; Revised October 1, 2014; Accepted November 16, 2014)

초록: Polycaprolactone(PCL)과 biphasic calcium phosphate(BCP)는 생체적합성 및 골 형성 촉진 등으로 인해 정형외과 소재로 사용되고 있다. 하지만, PCL은 표면이 소수성으로 인해 세포의 부착 및 증식에 제한적이기 때문에 이를 극복하기 위해 본 연구에서는 감마선을 이용하여 골 재생을 위한 친수성이 향상된 PCL/BCP 나노섬유를 제조하였다. 나노섬유는 전기방사를 통해 제작했으며, 감마선을 이용하여 acrylic acid(AAc)를 도입하였다. SEM을 통해 나노섬유 표면을 확인하였고, AAc가 도입된 나노섬유 위에서 MG63의 초기 생존율이 현저히 증가한 것을 확인하였다. 알칼리성 포스파테이즈 활성은 1.239 ± 0.226 nmole/ $\mu\text{g}/\text{min}$ 으로 개질되지 않은 나노섬유(0.590 ± 0.286 nmole/ $\mu\text{g}/\text{min}$) 보다 증가하였다. 따라서, AAc가 도입된 PCL/BCP 나노섬유는 골조직 재생에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

Abstract: Polycaprolactone (PCL) and biphasic calcium phosphate (BCP) have been considered as useful materials for orthopedic devices and osseous implants because of their biocompatibility and bone-forming activity. However, PCL-based scaffolds have hydrophobic surfaces reducing initial cell adhesion or proliferation. To overcome the limitation, we fabricated surface-modified PCL/BCP nanofibers using gamma-irradiation for bone tissue engineering. PCL/BCP nanofibers were prepared by electrospinning and then we supplemented hydrophilicity by introducing acrylic acid (AAc) through gamma-irradiation. We confirmed the surface of nanofibers by SEM, and then the initial viability of MG63 was significantly increased on the AAc grafted nanofibers, and alkaline phosphatase activity(1.239 ± 0.226 nmole/ $\mu\text{g}/\text{min}$) improved on the modified nanofibers than that on the non-modified nanofibers(0.590 ± 0.286 nmole/ $\mu\text{g}/\text{min}$). Therefore, AAc-grafted nanofibers may be a good tool for bone tissue engineering applications.

Keywords: polycaprolactone, biphasic calcium phosphate, electrospinning, gamma-irradiation, acrylic acid, bone tissue engineering.

서론

최근 전 세계가 고령화 사회로 변화되면서 사고와 노화로

인한 조직과 장기의 손상이 많이 발생한다. 예를 들어 뼈에 금이 가거나 골절, 골다공증과 같은 골 질환과 인대 파열로 인한 손상으로 인해 고통이 증가하고 있다. 따라서 이를 치료하거나 대체할 수 있는 지지체를 조직공학적 측면에서 개발하는 연구가 활발하게 진행 중이다.¹ 조직공학용 지지체를 개발하기 위해 다양한 종류의 고분자 소재와 세라믹 소재가 사용되고 있는데 대표적인 생체적합성 합성고분자로는

[#]These three authors contributed equally to this work.

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: ymlim71@kaeri.re.kr

©2015 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

poly(l-lactide)(PLLA), poly(glycolide)(PGA), poly(l-lactide-co-glycolide) (PLGA), polycaprolactone(PCL) 등이 사용되고 있다.^{2,4}

PCL은 ϵ -caprolactone(CL)으로부터 중합반응을 통해 얻어지며 용점이 60 °C이고 유리전이온도가 -60 °C인 부분결정성 고분자이다. PCL은 유연성이 좋아 다른 소재들과 혼합하여 많이 사용하며, 소수성이 강해 인체 안에서 가수 분해가 더디게 일어나 조직공학용 지지체와 약물전달체로 많이 사용되고 있다.⁵⁻⁸

골 이식재로 많이 사용되며 친수성을 갖는 biphasic calcium phosphate(BCP)는 인회석이라고도 불리는 hydroxyapatite(HA)와 β -tricalcium phosphate(β -TCP)를 혼합한 세라믹이다. HA를 체내에 이식하면 시간이 지날수록 HA에서 뼈와 유사한 아파타이트층이 형성되어 골 조직이 형성된다. 하지만, HA는 생분해가 느리기 때문에 이를 보완하기 위해 생체적합성이 우수하며 생분해성이 빠른 β -TCP를 혼합하여 제조한 BCP가 골 이식재로 많이 사용되고 있다.⁹⁻¹² 이러한 합성 골 이식재는 최근 전 세계적으로 많은 연구가 보고되고 있으며, 상당부분 골 재건 수술에 사용되고 있는 것으로 보고되고 있다.¹³

골 이식재로 사용되는 친수성 세라믹인 BCP와 의료용 고분자인 PCL을 이용하여 생체재료로서의 가능성을 증명하기 위해 3차원적 다공성 지지체를 개발하는 방법으로 염침출법, 염발포법, 상분리법, 전기방사법 등이 있다.¹⁴⁻¹⁶ 이러한 방법들 중 전기방사법은 수백 나노미터에서 수 마이크로미터의 직경을 갖는 섬유를 제작할 수 있으며,¹⁷ 높은 표면적과 세포의 기질과 유사한 3차원적인 구조를 가지고 있기 때문에 섬유 지지체에서 세포의 퍼짐성, 부착, 증식, 분화에 대한 특성에 대한 연구가 진행되었다.¹⁸⁻²⁰ 하지만, 전기방사법으로 제작한 생분해성 합성고분자인 PLLA, PLGA, PCL 나노섬유는 강한 소수성 표면으로 인해 세포의 퍼짐성, 부착 및 증식이 낮은 단점이 있기 때문에 이 같은 문제점을 극복하기 위하여 나노섬유 표면에 친수성이나 콜라겐 또는 생체활성 물질을 도입할 수 있는 다양한 표면개질 기술이 필요하다.²¹⁻²⁴

생분해성 합성고분자의 세포친화성 향상을 위한 표면개질 기술로는 산 또는 염기 처리를 통한 표면개질, 플라즈마, 방사선 조사를 통한 표면개질 기술이 대표적이다.²⁵ 이러한 표면개질 방법 중에서 방사선 조사기술은 감마선 또는 전자선을 조사하였을 경우, 피 조사체와 친수성을 갖는 아크릴계 단량체가 이온화 에너지를 흡수하여 자유라디칼 형성으로 인해 피 조사체 표면에 개시제나 촉매제와 같은 화학 첨가제 없이 친수성 단량체를 도입할 수 있는 장점이 있다.²⁶ 또한 고체상태나 저온에서도 반응이 일어나며, 단시간 처리가 가능하여 에너지 소비를 최소화할 수 있다. 이러한 장점을 지닌 방사선 표면 개질 기술을 이용하여 생분해성 합성고분자 표면에 친수성을 높인 후 세포의 접착력과 증식률을 증가시켜 조직공학용 지지체의 응용 및 가능성을 확인할 수 있다. 이전에

본 연구실에서도 감마선을 이용하여 PLCL 필름과²⁸⁻³⁰ 박테리아 셀룰로오스에²⁷ 아크릴산을 도입하여 친수성을 높여 세포의 접착과 증식을 증가시키는 조직공학용 응용의 가능성을 증명하였다.

따라서 본 연구에서는 효율적인 골 재생을 위해 골 이식재인 BCP와 PCL을 혼합한 후 전기방사법을 이용하여 PCL과 PCL/BCP 나노섬유를 제작하였으며, 고분자 표면의 친수성에 따른 세포친화성과 골분해를 향상시키기 위해 아크릴산과 BCP에 대한 영향 평가를 실시하였다. 방사선으로 표면 처리된 나노섬유의 화학적 특성분석과 세포 접착력, 증식률, 골분해성 평가를 통해 조직공학용 골재생용 지지체로서의 응용 가능성을 확인하였다.

실 험

시약 및 재료. Polycaprolactone(PCL), acrylic acid(AAc), toluidine blue O(TBO), *L*-ascorbic acid, β -glycerolphosphate는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였으며, biphasic calcium phosphate(BCP)는 ossgen(kyungsan, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 또한 methanol, tetrahydrofuran(THF)은 Duksan reagent(Ansan, Korea)로부터 구입하여 사용하였고, *N,N*-dimethyl formamide(DMF)는 Showa(Tokyo, Japan)로부터 구입하여 사용하였다. 그 외 실험에 사용된 모든 시약과 용매는 추가적인 정제 과정 없이 사용하였다.

전기방사를 이용한 나노섬유 제작. PCL 13 wt%를 THF와 DMF 혼합용액(70:30)에 용해한 후 BCP 30 wt%를 혼합하여 30초간 40%의 세기로 ultrasonication을 5회 실시하여 충분히 분산시킨 후 실린지에 충전하여 전기방사하였다. 이 고분자 용액은 11.3 kV 전압에서 5시간 동안 2 mL/h의 방출속도로 방사하였으며, 방사 후 상온에서 48시간 동안 완전히 건조하였다. 전기방사를 이용하여 제작된 PCL/BCP 나노섬유의 전체적인 모식도는 Figure 1(a)에 나타내었다.

감마선을 이용한 아크릴산 도입. 전기방사에 의해 제조된 나노섬유를 감마선을 이용하여 아크릴산을 도입하였다. PCL과 BCP가 혼합되어 제조된 나노섬유를 0.01 M Mohr's salt의 5 wt% 아크릴산 수용액에 담지한 후 선량률 10 kGy/호로 10 kGy에서 감마선을 조사하였다. 조사 완료 후 미반응된 단량체를 제거하기 위해서 삼차증류수를 이용하여 72시간 동안 세척한 후 동결건조기를 이용하여 48시간 동안 동결건조하였다. 아크릴산이 도입된 PCL/BCP 나노섬유의 전체적인 모식도는 Figure 1(b)에 나타내었다. 또한 PCL 나노섬유를 PCL, PCL/BCP 나노섬유를 PCL/BCP, 아크릴산이 도입된 PCL 나노섬유를 AAc-PCL, 아크릴산이 도입된 PCL/BCP 나노섬유를 AAc-PCL/BCP로 명명하였다.

주사전자현미경(Scanning Electron Microscope). PCL과

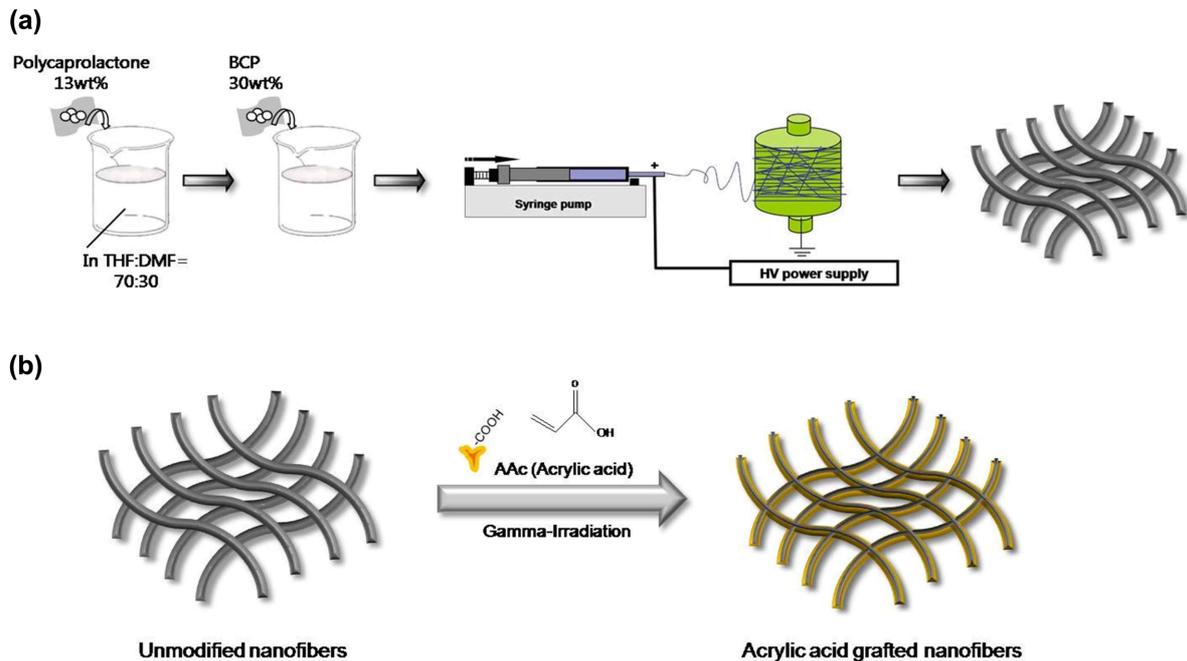


Figure 1. Schematic diagrams of (a) fabrication of PCL/BCP nanofibers using electrospinning; (b) acrylic acid grafted nanofibers using gamma-irradiation.

BCP가 혼합되어 제조된 나노섬유에 아크릴산 도입에 따른 형태변화를 관찰하기 위해 주사전자현미경(JSM-6390, JEOL, Japan)을 이용하여 확인하였다. 나노섬유의 고해상도의 이미지를 얻기 위해서 sputter coater를 이용하여 70초 동안 백금 코팅을 하였으며, 10 kV의 전자빔, 10-20 mm의 거리의 조건을 사용하여 확인하였다.

전반사 적외선 분광 분석기(Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy). 아크릴산이 도입된 나노섬유 표면의 화학적 특성을 전반사 적외선 분광 분석기(Bruker TENSOR 37, Bruker AXS. Inc., Germany)를 이용하여 분석하였다. 시료의 크기는 직경 8 mm였으며, 해상도는 4 cm^{-1} 이었고, $500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ 의 스펙트럼에서 64회 스캔하여 분석하였다.

접촉각 측정(Water Contact Angle Measurement). 아크릴산이 도입된 나노섬유의 친수화도를 확인하기 위해서 접촉각 측정기(Phoenix-300, Surface electro optics Ltd, Korea)를 이용하여 접촉각을 측정하였다. 측정용 액체로 정제된 증류수를 주사기를 이용하여 $10\ \mu\text{L}$ 씩 나노섬유 표면에 떨어뜨렸다.

아크릴산 정량 분석. PCL과 BCP가 혼합되어 제조된 나노섬유 표면에 결합된 아크릴산의 carboxyl group을 확인하기 위해 TBO 분석법을 이용하여 염색과 정량을 하였다. 아크릴산이 도입된 나노섬유를 TBO 용액(0.01 M 염산, 60 mg 염화나트륨, 12 mg TBO)에 4시간 이상 반응시킨 후, 삼차증류수를 이용하여 세척하였다. 세척이 끝난 나노섬유를 0.1 M 수산화나트륨과 에틸알코올(1:4) 혼합 용액에 용출시킨 후 용

출된 용액을 microplate spectrophotometer(PowerWave XS, Biotek, USA)를 이용하여 580 nm에서 흡광도를 측정하였다.²⁷

세포 접착력 및 증식을 평가. 아크릴산 도입 후 나노섬유에 세포를 배양하기 위해 24 well plate에 나노섬유를 넣고 MG63(Lonza, USA)을 현탁액 1×10^5 의 밀도로 나노섬유 표면에 접종한 후 10% FBS와 1% PS가 혼합된 DMEM(Gibco, USA) 배지에 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 7일 동안 배양하였다. 주사전자현미경을 통해 아크릴산 도입에 따른 세포 접착력을 확인하였으며, 나노섬유에 대한 MG63의 1, 4, 7일 동안의 증식을 확인하기 위해 cell counting kit-8(CCK-8, Dojindo, Japan)을 통해 확인하였다. 배지와 CCK-8용액의 비율은 9:1의 비율로 혼합하였으며, $500\ \mu\text{L}$ 씩 각각의 나노섬유에 넣고 37°C에서 2시간 동안 처리한 후 spectrometer를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.²⁹

Alkaline Phosphatase(ALP) 활성 평가. 세포가 부착되어 있는 나노섬유가 골 분화에 의한 골 형성의 역할에 영향을 주는지 확인하기 위해 ALP 활성을 확인하였다. MG63를 현탁액 1×10^5 의 밀도로 나노섬유에 접종한 후 골분화 배지($2.84 \times 10^{-4}\text{ M}$ L-ascorbic acid, $1 \times 10^{-2}\text{ M}$ β -glycerol-phosphate)에 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 7일 동안 배양하였다. RIPA Lysis buffer(pH 7.2) 용액 주입 후 4°C에서 20분간 처리하였으며, 나노섬유와 세포를 homogenizer를 이용하여 분쇄하였다. 분쇄된 나노섬유를 ALP 용액과 1:20의 비율로 혼합하여 37°C에서 30분간 처리한 후 spectrometer를 이용하여 405 nm에서 측정하였다. 또한 각각의 나노섬유에 대한 단백

질을 정량하기 위해 Micro BCA(Thermo Scientific, IL, USA)를 이용하였으며, 562 nm에서 측정하였다.⁹

통계처리. 모든 실험 결과의 통계처리는 각각의 시료에 대한 평균±표준오차로 나타내었으며, two-tailed unpaired Student's *t*-test(Excel, Microsoft)로 $p < 0.05$ 수준에서 실시하여 평가하였다.

결과 및 토론

주사전자현미경(Scanning Electron Microscope). 전기방사를 이용하여 제작된 PCL과 BCP가 함유된 PCL/BCP의 나노섬유 형태를 확인하기 위해 주사전자현미경을 통해 확인하였다. Figure 2(a)-(b)에서 보는 바와 같이 PCL 섬유의 굵기가 약 50-300 nm의 분포를 가지며 불규칙한 섬유 구조와 섬유 표면이 부드러운 형태인 반면에 PCL과 BCP가 혼합된 PCL/BCP 섬유의 굵기가 약 100-500 nm의 분포를 가지며 불규칙한 3차원적 구조와 표면이 거친 형태를 가지고 있는 것을 확인할 수 있었는데 이는 PCL/BCP에서 세포의 골 친화성이 높은 BCP 분말이 섬유표면에 균일하게 분사된 결과로 사료된다. BCP에 의한 거친 표면으로 인해 골 재생 유도를 촉진시켜 주며, 골아세포의 접착 및 증식을 촉진시켜 줄 수 있다.³¹ 감마선 이용하여 아크릴산 도입 후 AAc-PCL과 AAc-PCL/BCP는 아크릴산 도입에 의해 섬유 굵기가 증가한 것처럼 보였으나, 감마선을 이용한 아크릴산의 도입 전후의 PCL과 PCL/BCP의 표면 형태가 거의 변화가 없음을 Figure 2(c)-(d)에서 확인할 수 있었다. 또한 Figure 2(e)에서 보는 바와 같이 감마선 처리 후 아크릴산 도입으로 AAc-PCL은 200-300 nm의 직경을 갖는 나노섬유 형태로 존재하는 것을 확인

하였다. 또한 아크릴산 도입 전과 후에서의 PCL/BCP와 AAc-PCL/BCP 직경 분포는 약 100-700 nm으로 섬유 직경 변화를 확인할 수 있었다. 따라서 감마선을 이용하여 아크릴산 도입으로 인해 AAc-PCL과 AAc-PCL/BCP 직경이 평균적으로 각각 약 150와 200 nm 증가한 것을 확인하였다.

전반사 적외선 분광 분석기(ATR-FTIR). 감마선을 이용하여 아크릴산이 개질된 나노섬유의 화학적 구조를 확인하기 위해 전반사 적외선 분광 분석기를 통해 나노섬유 표면의 화학적 특성변화를 관찰하였다. Figure 3(a)에서 보는 바와 같이 BCP가 함유된 PCL/BCP와 AAc-PCL/BCP에서 BCP의 무기물 피크인 1050 cm^{-1} 의 PO_4^{3-} 그룹을 확인하였다. 감마선 조사시 PCL/BCP 나노섬유 표면에 아크릴산이 도입될 때 세라믹인 BCP보다 PCL 고분자 표면에 개질되는 것으로 사료된다.⁹ PCL은 1730 cm^{-1} 에서 carbonyl group이 관찰되는 것을 확인할 수 있는데 Figure 3(b)에서 아크릴산이 도입된 AAc-PCL과 AAc-PCL/BCP의 경우 1700 cm^{-1} 에서의 carboxyl group과 carbonyl group이 합쳐져서 넓은 형태로 나타내고 있음을 확인할 수 있었다.^{25,27-30} AAc-PCL보다 AAc-PCL/BCP에서 carboxyl group이 높게 나온 이유는 세라믹 소재인 BCP의 영향으로 인해 거친 나노섬유의 표면적 증가로 인해 아크릴산 도입량의 증가가 있었음을 확인하였다.

접촉각 측정(Water Contact Angle Measurement). 아크릴산 도입 전후 PCL과 PCL/BCP 나노섬유의 친수화도를 확인하기 위해 접촉각을 측정하였다. Figure 4(a)에서 감마선을 처리하지 않은 PCL은 물이 흡수되지 않은 소수성 나노섬유 형태를 나타내고 있었으며, BCP가 혼합된 PCL/BCP는 BCP가 친수성 세라믹이기 때문에 비교적 많은 양의 물이 흡수될 것으로 예상하였다. 하지만, PCL/BCP는 물이 흡수되지 않은

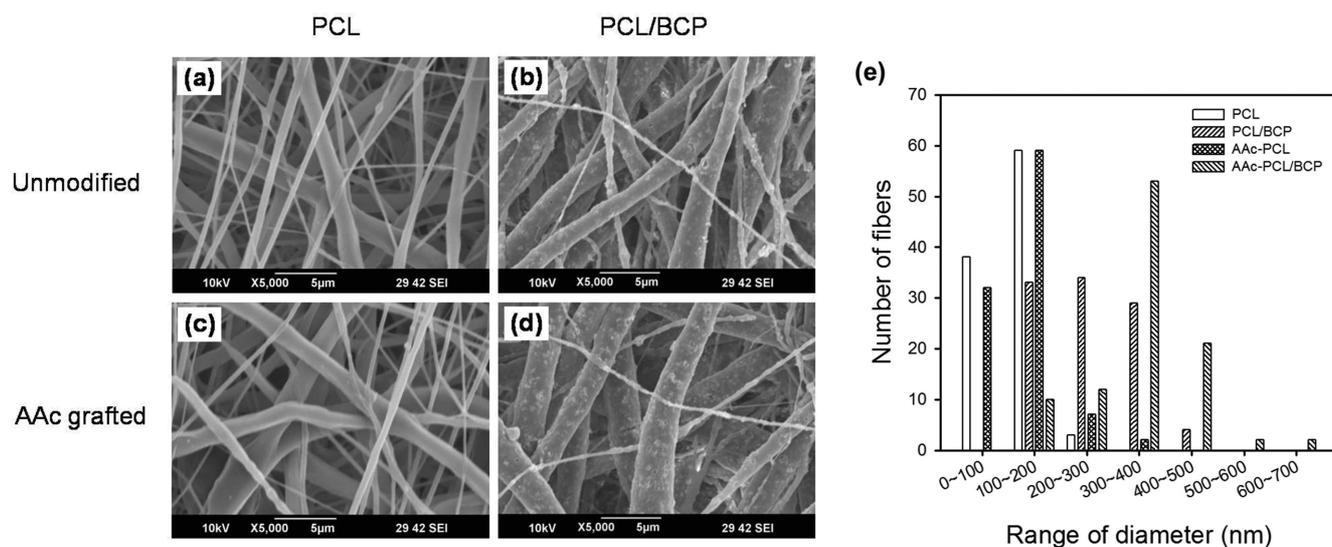


Figure 2. Scanning electron microscopy (SEM) images of (a) unmodified PCL nanofibers; (b) unmodified PCL/BCP nanofibers; (c) acrylic acid grafted PCL nanofibers; (d) acrylic acid grafted PCL/BCP nanofibers; (e) the distribution of mean diameters of nanofibers.

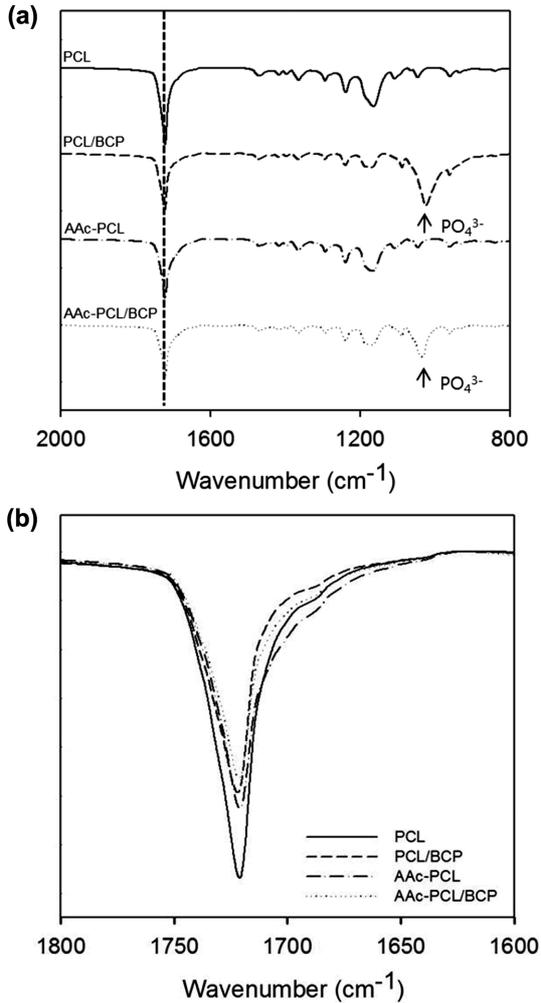


Figure 3. Surface chemical properties of the nanofibers by attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR): (a) spectra of PCL nanofibers, PCL/BCP nanofibers, acrylic acid grafted PCL nanofibers, and acrylic acid grafted PCL/BCP nanofibers; (b) peak shift of the acrylic acid grafted PCL nanofibers and acrylic acid grafted PCL/BCP nanofibers.

소수성 형태를 나타내는 것을 확인하였으며, 이는 소수성이 강한 PCL의 영향으로 인해 물이 흡수되지 않은 것으로 사료된다. 반면에, 아크릴산이 도입된 AAc-PCL과 AAc-PCL/BCP 모두 물이 흡수되는 것을 확인하여, 아크릴산의 영향으로 인해 나노섬유가 친수성을 나타내고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 Figure 4(b)에서 보는 바와 같이 소수성 고분자인 PCL은 90°의 높은 접촉각을 나타낸 반면에 아크릴산이 도입된 AAc-PCL은 친수성 증가로 인해 접촉각을 측정할 수 없었다. 또한 PCL/BCP의 접촉각은 85°로 친수성 세라믹인 BCP의 영향에 의해 PCL보다 낮은 접촉각을 보였지만 소수성이 강한 PCL의 영향으로 많은 차이의 접촉각 변화는 확인할 수 없었다. 반면에, PCL/BCP에 아크릴산 도입 후 접촉각 측정결과

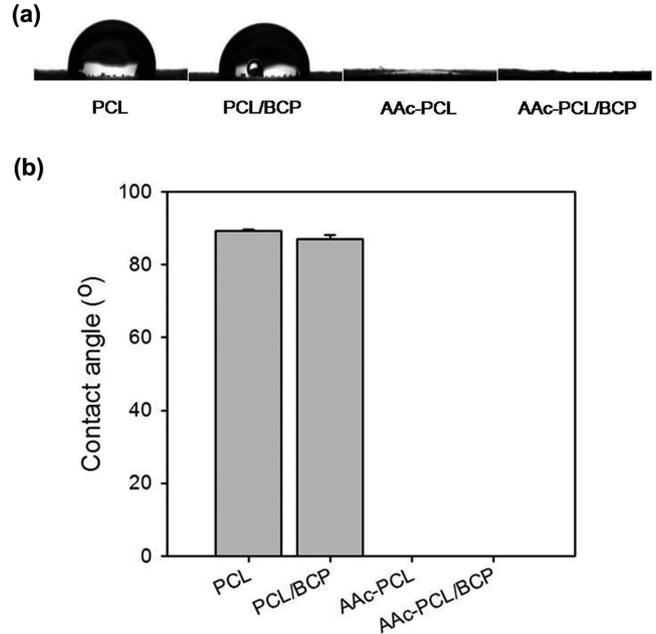


Figure 4. Water contact angle measurements: (a) images of water droplet on the unmodified PCL nanofibers, unmodified PCL/BCP nanofibers, acrylic acid grafted PCL nanofibers, and acrylic acid grafted PCL/BCP nanofibers; (b) dynamic water contact angles.

역시 접촉각을 측정할 수 없을 정도의 친수성을 나타내었다. 따라서 아크릴산 도입에 따라 소수성을 나타내는 합성 고분자 지지체가 접촉각을 측정할 수 없을 정도의 친수성을 나타내는 것으로 사료된다.^{25,28}

아크릴산 정량 분석. PCL과 PCL/BCP에 도입된 아크릴산의 carboxyl group과 반응하는 TBO를 UV-visible spectrometer (580 nm)로 확인하였다. Figure 5(a)에서 보는 바와 같이 PCL은 푸른색으로 염색이 되지 않은 반면 아크릴산이 도입된 AAc-PCL은 carboxyl group과 TBO가 반응하여 푸른색을 보였다. 또한 PCL/BCP의 경우 BCP가 친수성 세라믹이기 때문에 TBO가 희미하게 염색이 되는 것을 확인할 수 있었으며, 아크릴산이 도입된 AAc-PCL/BCP의 경우 carboxyl group과 TBO가 반응하여 푸른색을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 아크릴산이 도입된 AAc-PCL과 AAc-PCL/BCP에 반응한 TBO 정량을 Figure 5(b)를 통해 확인한 결과 PCL은 아크릴산의 carboxyl group이 존재하지 않기 때문에 TBO가 정량되지 않았으며, PCL/BCP는 친수성 세라믹인 BCP의 TBO 용액의 흡수 영향으로 0.014±0.002 mM/mg의 TBO가 미세하게 측정된 것으로 사료된다.⁹ 반면에, 아크릴산이 도입된 AAc-PCL과 AAc-PCL/BCP의 carboxyl group과 반응한 TBO의 양은 각각 1.497±0.059, 2.351±0.103 mM/mg로 높은 TBO 양을 측정할 수 있었고, 특히 AAc-PCL보다는 AAc-PCL/BCP 지지체에서 혼합된 BCP에 따른 섬유 거친 표면적과 섬유 직경의 증가로 인해 많은 아크릴산이 도입되었음을 확인하였다.

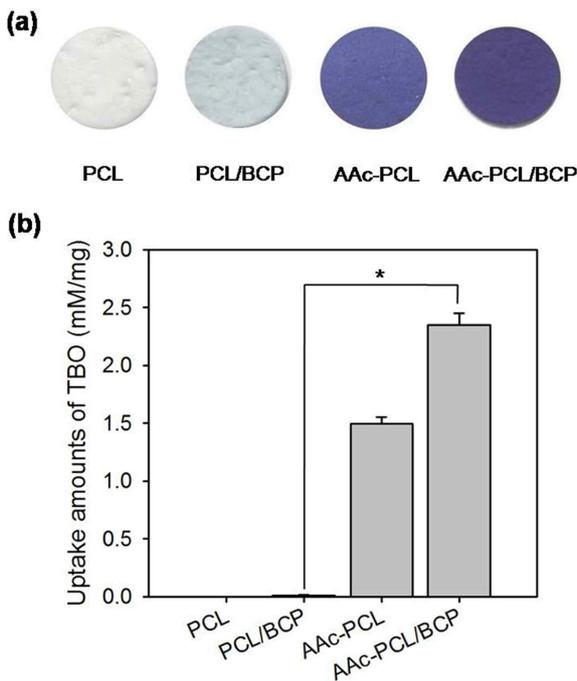


Figure 5. Quantification of carboxylic acid groups of acrylic acid grafted nanofibers: (a) images of toluidine blue O stained nanofibers; (b) quantification of carboxylic acid groups on the nanofibers (* $p < 0.05$).

세포 접착력 및 증식을 평가. 감마선을 이용하여 친수성기를 가진 아크릴산이 도입된 나노섬유 지지체에 세포의 접착력과 증식을 확인하기 위해 주사전자현미경과 CCK-8를 통해 확인하였다. 나노섬유에 MG63 세포를 7일 동안 배양 후 주사전자현미경으로 세포 접착력을 확인한 결과 Figure 6(a)-(b)에서 보는 바와 같이 감마선을 처리하지 않은 PCL과 PCL/BCP에서 세포가 섬유 사이사이에 접착되고 있음을 확인하였다. 또한 Figure 6(c)-(d)에서 보는 바와 같이 아크릴산이 도입된 AAc-PCL과 AAc-PCL/BCP에서 세포가 섬유 사이사이에 접착되어 있음을 확인하였으며, 친수성을 갖는 아크릴산이 도입된 나노섬유 지지체가 아크릴산이 도입되지 않은 나노섬유보다 세포가 넓은 형태로 접착되어 있음을 확인할 수 있었다. Figure 7에서 보는 바와 같이 CCK-8를 통한 세포 증식을 확인 결과 1일차의 경우 PCL보다 BCP가 혼합된 PCL/BCP에서 세포의 증식이 높은 것을 확인할 수 있었으며, 아크릴산이 도입된 나노섬유에서 아크릴산이 도입되지 않은 나노섬유보다 세포의 증식이 높은 것을 확인할 수 있었다. 또한 7일차의 경우 1일차보다 세포 증식이 증가되었음을 확인할 수 있었으며, 아크릴산이 도입된 AAc-PCL/BCP에서는 세포의 증식이 눈에 띄게 증가된 것을 확인할 수 있었다. 이는 아크릴산 도입으로 인해 친수성을 나타내는 나노섬유에 세포의 접착력과 증식을 높여주는 것으로 사료되며,^{28,29} 친수성 세라믹인 BCP의 영향으로 인해 아크릴산이 도입된 AAc-

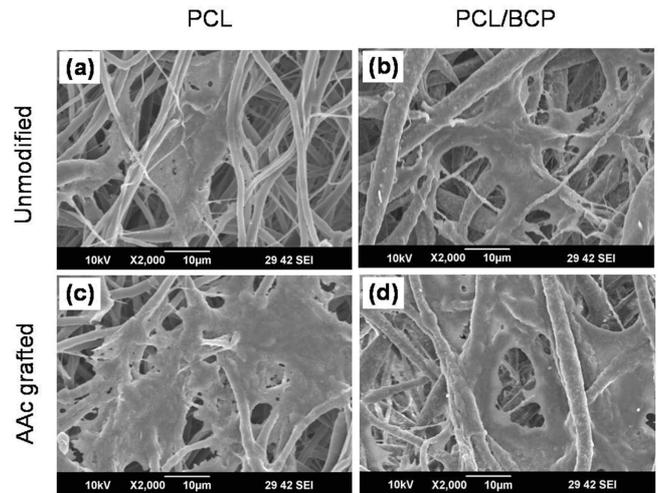


Figure 6. Morphologies of MG63 cultured on nanofibers for 7 days by SEM (a) unmodified PCL nanofibers; (b) unmodified PCL/BCP nanofibers; (c) acrylic acid grafted PCL nanofibers; (d) acrylic acid grafted PCL/BCP nanofibers.

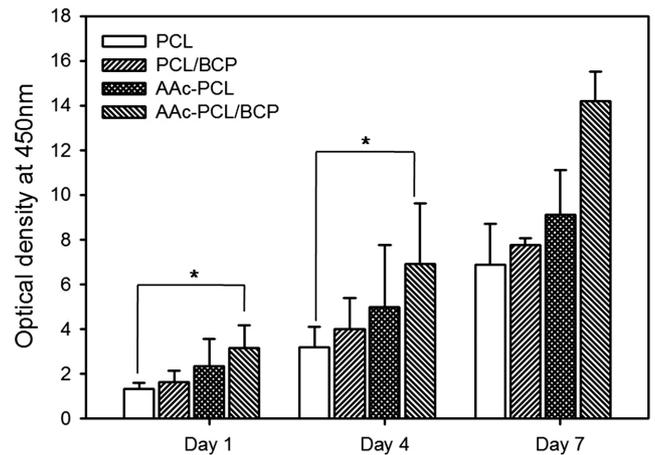


Figure 7. Proliferation of MG63 for 7 days (* $p < 0.05$).

PCL/BCP에서 높은 세포 증식을 확인할 수 있었다.

Alkaline Phosphatase 활성 평가. 세포가 부착되어 있는 나노섬유가 골 분화에 의한 골 형성의 역할에 영향을 주는지 확인한 결과 Figure 8에서 보는 바와 같이 아크릴산이 도입되지 않은 PCL과 PCL/BCP는 각각 0.404 ± 0.117 , 0.590 ± 0.286 nmole/ μ g/min로 측정할 수 있었으며, 골 이식재로 많이 사용되는 BCP의 영향으로 PCL보다 PCL/BCP에서 높은 골 분화 현상을 확인할 수 있었다. 또한 아크릴산이 도입된 AAc-PCL과 AAc-PCL/BCP는 아크릴산이 도입되지 않은 나노섬유보다 높은 골분화 현상을 확인하였으며, 각각 0.767 ± 0.093 , 1.239 ± 0.226 nmole/ μ g/min로 측정할 수 있었다. 이는 아크릴산의 도입으로 인해 세포의 증식이 증가됨에 따라 높은 골분

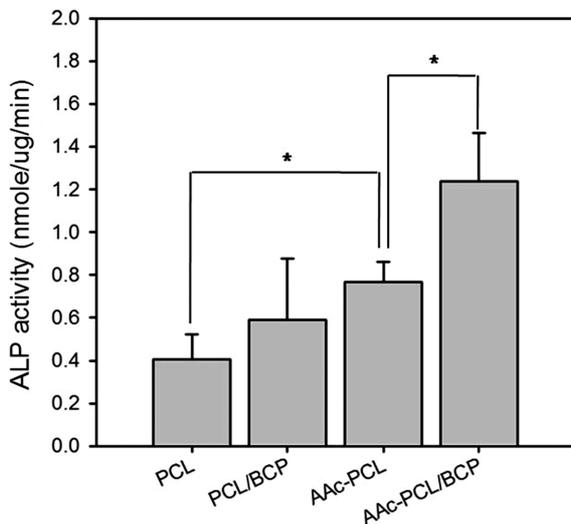


Figure 8. Alkaline phosphatase activity assay after 7 days of culture (* $p < 0.05$).

화 현상을 나타낸 것으로 사료되며,²⁸ BCP의 영향으로 인해 아크릴산이 도입된 AAc-PCL/BCP에서 보다 높은 골분화 현상을 확인하였다.³²

결 론

본 연구에서는 골 조직공학용 나노섬유 지지체를 개발하기 위해 강한 소수성으로 인해 약물전달체로 많이 사용되는 PCL과 골 이식재로 많이 사용되는 친수성 세라믹인 BCP를 혼합하여 전기방사를 통해 다공성 나노섬유 지지체를 제작하였다. 이렇게 제작된 나노섬유 지지체는 PCL의 영향으로 강한 소수성을 나타내고 있기 때문에 세포접착과 증식을 높여주기 위해 감마선을 이용하여 아크릴산을 도입한 친수성 나노섬유 지지체를 개발하였다. 아크릴산 도입을 확인하기 위해 전반사 적외선 분광기를 통해 1700 cm^{-1} 에서의 carboxyl group이 carbonyl group과 합쳐져서 넓은 형태로 나타내고 있음을 확인 하였으며, 접촉각 측정결과 PCL과 PCL/BCP는 각각 90° , 85° 의 접촉각을 나타낸 반면 아크릴산이 도입된 AAc-PCL과 AAc-PCL/BCP의 경우 아크릴산에 의해 친수성을 나타내고 있기 때문에 접촉각이 측정되지 않은 것을 확인하여 아크릴산 도입을 증명하였다. 또한 AAc-PCL과 AAc-PCL/BCP의 carboxyl group과 반응하는 TBO의 양은 각각 1.497 ± 0.059 , $2.351 \pm 0.103\text{ mM/mg}$ 로 측정하여 아크릴산 도입을 증명하였다. MG63을 이용하여 SEM, CCK-8을 통해 아크릴산 도입에 따라 세포 접착력과 증식률이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 ALP 활성 평가를 통해 아무것도 처리하지 않은 PCL/BCP에서 $0.590 \pm 0.286\text{ nmole/}\mu\text{g/min}$ 보다 아크릴산이 도입된 AAc-PCL/BCP에서 $1.239 \pm 0.226\text{ nmole/}\mu\text{g/min}$ 의 높

은 농도의 골 분화현상이 일어나는 것을 확인하였다. 따라서 이는 골 조직공학용 지지체로서의 응용 가능성을 확인하였다.

감사의 글: 본 연구는 미래창조과학부에서 주관하는 원자력연구개발사업(2012M2A2A6013196)과 보건복지부 의료기기기술개발사업(HI14C0744)의 지원에 의해 이루어진 것으로, 이에 감사 드립니다.

참 고 문 헌

1. G B. Park, J. W. Park, H. W. An, D. J. Yang, S. K. Choi, I. S. Jang, S. I. Yeo, and J. Y. Seo, *J Korean Acad. Periodontol.*, **36**, 797 (2006).
2. M. S. K. Chong, C. N. Lee, and S. H. Teoh, *Mater. Sci. Eng., C*, **27**, 309 (2007).
3. Z. Ma, C. Gao, Y. Gong, and J. Shen, *Biomaterials*, **26**, 1253 (2005).
4. G. E. Park, M. A. Pattison, K. Park, and T. J. Webster, *Biomaterials*, **26**, 3075 (2005).
5. J. M. Williams, 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. Y. Lei, B. Rai, K. H. Ho, and S. H. Teoh, *Mater. Sci. Eng., C*, **27**, 293 (2007).
7. B. Y. Tay, S. X. Zhang, M. H. Myint, F. L. Ng, M. Chandrasekaran, and L. K. A. Tan, *J. Mater. Proc. Tech.*, **182**, 117 (2007).
8. K.-J. Wu, C.-S. Wu, and J.-S. Chang, *Proc. Biochem.*, **42**, 669 (2007).
9. Y. M. Shin, J. S. Park, S. I. Jeong, S. J. An, H. J. Gwon, Y. M. Lim, Y. C. Nho, and C. Y. Kim, *Biotechnol. Bioproc. Eng.*, **19**, 341 (2014).
10. I. Manjubala and M. Sivakumar, *Mater. Chem. Phys.*, **71**, 272 (2001).
11. Y. Li, W. Weng, and K. C. Tam, *Acta Biomater.*, **3**, 251 (2007).
12. C. Shuai, P. Feng, C. Cao, and S. Peng, *Biotechnol. Bioproc. Eng.*, **18**, 520 (2013).
13. C. Mangano, E. Bartolucci, and C. Mazzocco, *Clin Oral Implants Res.*, **18**, 23 (2003).
14. R. Langer and J. P. Vacanti, *Science*, **260**, 920 (1993).
15. B. S. Kim and D. J. Mooney, *TIBTECH*, **16**, 224 (1998).
16. M. S. Bae, S. I. Jeong, S. E. Kim, J. B. Lee, D. N. Heo, and I. K. Kwon, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **5**, 196 (2008).
17. I. K. Kwon, S. Kidoaki, and T. Matsuda, *Biomaterials*, **26**, 3929 (2005).
18. Z. Shahrooz and H. A. Vahid, *Iran Polym.*, **19**, 457 (2010).
19. Z. Chen, X. Mo, and F. Qing, *Mater. Len.*, **61**, 3490 (2007).
20. K. Ma, C. K. Chan, S. Liao, W. Y. K. Hwang, Q. Feng, and S. Ramakrishna, *Biomaterials*, **29**, 2096 (2008).
21. T. G. Kim and T. G. Park, *Tissue Eng.*, **12**, 221 (2006).
22. H. S. Yang, K. Park, J. J. Kim, B. S. Kim, and D. K. Han, *Tissue*

- Eng. Regen. Med.*, **5**, 498 (2008).
23. L. Grondahl, A. Chandler-Temple, and M. Trau, *Biomacromolecules*, **6**, 2197 (2005).
 24. J. Choi, H. J. Jung, B. J. Park, Y. K. Joung, K. Park, and D. K. Han, *Polym. Korea*, **36**, 357 (2011).
 25. Y. M. Shin, W. J. Kim, J. S. Park, H. J. Gwon, Y. C. Nho, and Y. M. Lim, *Journal of Radiation Industry*, **5**, 371 (2011).
 26. H. A. Kim, J. S. Park, J. B. Choi, Y. M. Lim, and Y. C. Nho, *Polym. Korea*, **36**, 71 (2011).
 27. J. B. Choi, S. I. Jeong, H. J. Gwon, J. S. Park, Y. C. Nho, Y. H. Choi, K. J. Park, M. Y. Park, H. Shin, and Y. M. Lim, *Journal of Radiation Industry*, **6**, 159 (2012).
 28. J. Y. Lim, Y. M. Shin, J. B. Choi, J. O. Jeong, H. J. Gwon, S. I. Jeong, J. S. Park, and Y. M. Lim, *Journal of Radiation Industry*, **7**, 45 (2013).
 29. Y. M. Shin, K. S. Kim, Y. M. Lim, Y. C. Nho, and H. Shin, *Biomacromolecules*, **9**, 1772 (2008).
 30. Y. M. Shin, J. Y. Lim, J. S. Park, H. J. Gwon, S. I. Jeong, and Y. M. Lim, *Biotechnol. Bioproc. Eng.*, **19**, 118 (2014).
 31. S. Y. Jo, M. H. Youn, Y. M. Lim, H. J. Gwon, J. S. Park, and Y. C. Nho, *Journal of Radiation Industry*, **4**, 147 (2010).
 32. A. Saadat, A. Behnamghader, S. Karbasi, D. Abedi, M. Soleimani, and A. Shafiee, *Biotechnol. Bioproc. Eng.*, **18**, 587 (2013).