

물리화학적 및 생물학적으로 표면개질된 고분자의 세포 적합성 연구

이진호[○], 박경희, 강길선, 이해방, J. D. Andrade^{*}
한국화학연구소, 고분자제3연구실, *Utah대학교, 생체공학과

Cell-compatibility of physicochemically and biologically modified polymer surfaces

J. H. Lee[○], K. H. Park, G. S. Khang, H. B. Lee, and J. D. Andrade^{*}
Polymer Research Lab.3, Korea Research Institute of Chemical Technology^{*}Department of bioengineering, University of Utah, U. S. A.

We have treated polymer surfaces such as polyethylene, polystyrene and polyester by various physicochemical and biological surface modification methods to be suitable for cell adhesion. The physicochemical methods we used were O₂ plasma discharge, corona discharge, sulfuric acid and chloric acid treatments. For the biological treatments, blood proteins such as plasma protein, serum protein and fibronectin were adsorbed onto the polymer surfaces. Chinese Hamster Ovary (CHO) cells were cultured on the surface-modified polymers and the cell-compatibility of those surfaces were compared. The chloric acid and fibronectin treatments were found to be the best methods of rendering the polymer surfaces adhesive for CHO cells.

1. 서 론

고분자 재료는 병연 및 일반 가정에서 사용되는 각종 의료용 기구 및 치료제의 구성재료일 뿐만 아니라 인공장기를 만드는 데 가장 중요한 소재로서, 고분자를 이용한 인공심장, 인공신장, 인공혈관, 인공관절 등의 인공장기 개발이 활발히 행해지고 있다. 고분자를 이용한 인공장기 개발에 있어서 가장 큰 문제가 되는 것은 인공장기를 인체내에 이식시켰을 때 혈액 및 생체적합성 문제이다. 즉 이물질이 인체에 삽입되었을 때, 이에 대한 생체 내 거부반응으로 인해 주변의 조직세포에 변질이 생기고 이로 인해 인체내에 부작용이 생기거나, 인공장기 표면에 인체내의 여러가지 단백질이나 혈액 구성분들이 흡착함으로써 혈액응고 현상이 생겨 인공장기의 기능이 시간이 경과함에 따라 저하하게 된다. 특히 인공혈관의 경우, 인체내 이식시 생체 거부현상이 없어야 함은 물론이러키와 끊임없는 수축팽창을 통해 혈관내를 상당한 압력을 받으며 흐르는 혈류에 견딜 수 있는 유연성과 기계적, 물리적 특성을 지녀야 하며, 혈관내 혈액응고 현상등을 유발시키지 않아야 한다. 고분자 표면의 항혈전성을 높여주기 위한 하나의 방법으로서 내피세포 (endothelial cell)를 고분자 표면에 이식하여 주면 인체내 혈관 내부표면과 유사한 항혈전성을 지닐 수가 있는데, 일반적으로 고분자 표면은 세포와의 적합성이 좋지 않아 쉽게 세포가 고분자 표면에서 부착 성장할 수가 없게 된다.

본 연구에서는 polyethylene, polystyrene 과 같은 단순한 화학적 구조를 가지는 고분자와 인공혈관 재료로 널리 쓰이는 polyester 의 표면을 세포 적합성이 좋도록 여러가지 방법으로 개질하여 내피세포와 유사한 성질을 가진 Chinese Hamster Ovary(CHO) cell를 배양하였고, 표면개질 방법들 간의 세포 적합성을 비교검토 하였다.

2. 실험방법

사용한 고분자 재료는 첨가제가 전혀 함유되어 있지 않은 polyethylene terephthalate(PET) film ((주)선경), 저밀도 polyethylene(LDPE) film, polystyrene(PS) plate ((주)녹신자의료공업) 등이다. 이들 고분자 시료들을 적당한 크기로 잘라 ethanol에서 2회 30분간 ultrasonication 시킨후 ethanol로 여러번 세척하여 진공건조후 사용하였다.

이들 고분자 재료의 세포 적합성을 향상시키기 위해 사용한 표면개질 방법은 크게 두가지로 나눌 수 있는데, 하나는 O₂ plasma 방전, corona 방전, sulfuric acid 처리, chloric acid 세리 등과 같은 물리화학적 표면산화 처리 방법이고 또 하나는 plasma, serum, fibronectin 등과 같은 혈액 내 단백질을 고분자 표면에 흡착시키는 생물학적인 방법이다. 이들 각각의 방법에 의한 고분자 시료의 처리조건을 간단히 요약하여 표 1 에 나타내었다.

표면개질된 고분자 시료들은 무진실에서 U.V. lamp로 1시간 동안 멸균처리후 Chinese Hamster Ovary Cell(CHO cell, Oak Ridge National Lab. U.S.A.)을 37°C 포화수증기와 5% CO₂ 분위기를 유지하고 있는 배양기 안에서 적정시간동안 배양시켰다. 세포배양에 사용한 배양액은 Han's F-12 (GIBCO, U.S.A.)에 penicilin G, Na 100 unit/ml와 streptomycin sulfate 100 unit/ml, fetal bovine serum(FBS, GIBCO) 5% 용액을 첨가하여 혼합후 여과 멸균 하였다. 배양이 끝나면 시료표면에 미부착된 세포를 phosphate buffer saline(PBS)으로 세척해 제거하고, 0.05% trypsin 용액으로 부착된 세포를 suspension 상태로 떼어낸후, 세포 수를 Haemocytometer를 이용해 계산하였다.

Table 1. Surface modification methods and treatment condition

Method	Treatment condition
Physicochemical	
Plasma gas discharge	O ₂ gas, 0.3 torr vacuum, 30 sec
Corona discharge	Air atmosphere, 60 sec
Sulfuric acid treatment	H ₂ SO ₄ (98%), 10 min
Chloric acid treatment	70% HClO ₄ / saturated aqueous KClO ₃ (3/2 ratio), 10 min
Biological	
Plasma protein adsorption	1% human plasma, 30 min
Serum protein adsorption	20% fetal bovine serum, 37°C, 24 hr
Fibronectin adsorption	50 ug/ml bovine fibronectin, 1 hr

Table 2. Composition(%) of oxidized functional groups on the LDPE surfaces

Treatment method	C-OH (286.6eV)	C=O (287.9eV)	C-OH (289.1eV)
O ₂ plasma	59.5	27.9	12.6
Corona	58.2	30.9	10.9
Sulfuric acid	60.0	20.0	20.0
Chloric acid	86.4	12.1	1.5

Table 3. Comparison of cell-compatibility of surface modified polymers (No. of seeded cells, 4x10⁴/cm² : culture time, 32 hr)

Treatment method	Polymer sample	No. of cells/cm ² (x10 ⁴)
Control	PET	1.9
Corona*	LDPE	3.1
Sulfuric acid	PS	9.7
Chloric acid	PS	16.6
	PET	9.0
Plasma protein*	LDPE	3.1
	PS	3.1
	PET	2.8
Serum protein	LDPE	3.2
	PET	3.3
Fibronectin	LDPE	7.9
	PS	12.7
	PET	10.9

* No. of seeded cells, 9x10⁴/cm² : culture time, 19 hr

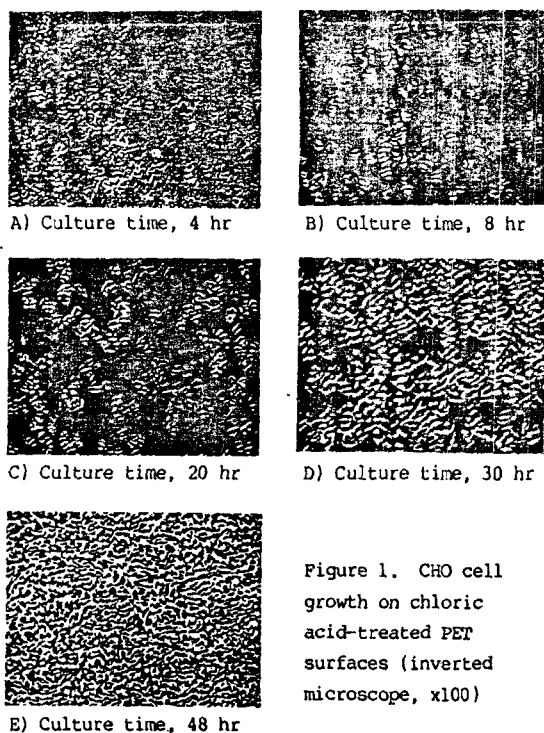


Figure 1. CHO cell growth on chloric acid-treated PET surfaces (inverted microscope, x100)

시료표면에서 세포의 증식상태를 조사하기 위해서, 세포를 10% formalin액으로 10분간 고정후 5% Giemsa액(BDH, England)으로 30분간 염색하여 건조한뒤 위상차 현미경으로 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

고분자 시료를 여러가지 물리화학적 방법으로 산화 처리하였을 때 시료표면의 화학적 구조 변화를 확인하기 위해, 고분자들 중에서는 가장 단순한 화학적 구조를 가진 LDPE film에 여러가지로 표면처리를 하여 ESCA로 분석하였다. 표면처리가 되지 않은 LDPE의 경우, C-1S core level spectrum이 결합 에너지 285 eV (C-C bond에 의한) 근처에서 하나의 peak로 나타나지만 표면의 탄소가 산화처리에 의해 산소와 결합하게 되면 결합된 관능기의 화학적 구조에 따라 탄소의 결합 에너지가 달라져 spectrum 상에 여러개의 peak가 나타난다. 즉 1개의 산소와 단일결합된 탄소의 결합 에너지는 286.6 eV 정도이며, 2개의 산소와 단일 결합된 탄소 또는 1개의 산소와 이중 결합된 탄소의 결합 에너지는 287.9 eV 정도이고, carboxylate와 carbonate 탄소의 결합 에너지는 각각 289.1 eV와 290.4 eV 정도로 나타난다. 표 2 에 서로 다른 표면처리 방법으로 LDPE를 산화한 표면에 나타나는 관능기들의 조성비를 ESCA C-1S core level spectrum상에 나타나는 peak들의 면적비로부터 산출해 비교해 보았다. 표에서 보듯이 표면을 산화 처리했을때, 사용한 방법에 상관없이 표면에 hydroxyl group이 상당량 형성되고 있으며, sulfuric acid 처리를 하게되면 plasma나 corona처리 보다는 carboxyl group이 많이 형성됨을 알 수 있었다. Chloric acid 처리를 하게 되면 다른 방법에 비해 상당히 hydroxyl group의 분포가 많은 표면을 얻을 수 있다는 것도 알게 되었다. 산화된 표면의 산소조성은 사용한 처리방법과 조건에 의해 차이가 있겠으나 대략 10-25 atomic % 정도로 나타났다. PS 나 PET 의 경우도 정도의 차이는 있으나 대략 LDPE의 경우와 비슷한 양상의 표면관능기 분포를 보여주었다.

생물학적으로 표면개질된 LDPE의 ESCA 분석결과를 보면, C-1S core level spectrum상에 결합에너지 288.1 eV 부근에서 peak가 나타나고 있는데 이는 표면에 흡착된 단백질의 peptide bond(CO-NH)에 의한 것이다. Survey scan spectrum을 보면 C-1S, O-1S peak들 이외에도 흡착된 단백질로부터의 N-1S peak가 나타나는데, plasma protein 흡착의 경우, 이들 peak의 면적비로부터 산출된 원소분석 결과는 C:O:H 의 atomic %가 75:18:7 정도로 나타났다. 즉 표면에 흡착된 단백질로부터의 질소 atomic %가 7% 정도로 나타났는데, 이는 흡착된 단백질이 표면에서 monolayer를 형성했을때 나타나는 수치와 거의 일치한다 (1).

이와같이 여러가지 방법으로 표면처리한 고분자 시료에 CHO 세포를 배양시켜 각 처리방법에 따른 세포 증식경향을 조사하였다. 일반적으로 혈관 내피세포나 CHO 세포와 같은 포유동물의 단층세포가 증식하려면 우선 세포가 재료표면에 강력히 부착되어야 한다. 처리된 표면의 세포 적합성을 평가하기 위해서는 in vitro 세포 부착 실험을 통하여 일정시간 세포를 배양한 후 표면에 부착 성장된 세포수를 계산하여 평가하는 것이 일반적인 방법이 되고 있다. 표 3 은 여러가지 방법으로 표면 개질된

고분자 시료들에 일정양의 CHO cell을 seeding하고 일정시간 동안 배양하여, 재료표면에서 부착 증식한 세포수를 산출하여 비교해 놓은 것이다. 일반적으로 세포는 재료표면이 친수성을 띠게 되면 부착성이 좋아져 증식성이 양호해 지는데, LDPE, PS, PET 와 같은 고분자 시료들은 소수성 재료로서, 본 연구에 사용한 물리화학적 또는 생물학적인 표면 처리에 의해 친수성이 증가된다. 미처리된 PET의 경우와 비교해 보면, 미처리된 PET에 부착 증식된 세포수에 비해 표면처리된 모든 시료에 부착 증식된 세포수가 증가하였다.

물리화학적 처리 방법들 중에서는 chloric acid로 처리한 표면의 세포 적합성이 가장 월등한 것으로 나타났는데, 그 이유는 앞의 ESCA 분석결과에서 나타났듯이 chloric acid를 처리시에 다른 처리방법에 비해 고분자 표면에 hydroxyl group이 상당히 많이 형성되기 때문일 것으로 예측된다. 아직 hydroxyl group의 분포가 많은 고분자 표면의 세포친화력에 대한 구체적인 mechanism은 규명되어 있지 않지만, 고분자 표면의 hydroxyl group 과 세포 표면의 polar group 사이의 hydrogen bonding에 의해 세포가 표면에 강하게 부착력을 가지는 것으로 추정되고 있다 (2).

생물학적인 처리 방법들 중에서는 fibronectin을 흡착시킨 고분자 표면의 세포 적합성이 가장 좋게 나타났는데 이는 fibronectin의 단량체 (subunit)내에 세포 표면과 강하게 결합할 수 있는 active site (arginine-glycine-aspartate-serine으로 된 4개의 amino acid로 형성되어 있다)가 존재하기 때문인 것으로 판단되고 있다 (3).

인공혈관 재료로 사용되는 PET의 경우, chloric acid 와 fibronectin으로 처리한 시료와 미처리한 시료의 세포 적합성을 비교해 보면 (표 3), chloric acid 와 fibronectin으로 처리했을때 세포부착 및 증식성이 표면처리를 하지 않았을때보다 각각 460% 와 560% 로 상당히 향상되었음을 알 수 있다.

Chloric acid로 처리한 PET 표면에 부착된 CHO cell의 성장과정을 위상차 현미경으로 관찰해 보면, 배양시간에 따라 급격히 세포수가 늘어나다가 48시간 정도가 되면 시료표면에 세포가 밀집되어 더 이상 세포의 증가가 일어나지 않는 것을 관찰할 수가 있었다 (그림 1).

참 고 문 헌

- 1) J.H. Lee, "Interactions of PEO-containing polymeric surfactants with hydrophobic surfaces," Ph.D. Thesis, University of Utah, U. S. A., 1988
- 2) A.S.G. Curtis, J.V. Forrester, C. McInnes, and F. Lawrie, *J. Cell Biology*, 97, 1500-1506, 1983
- 3) R.O. Hynes, *Sci. Amer.*, 254(6), 32-41, 1986