

## 세포적합성 고분자 표면에 관한 연구 II. 표면 개질된 고분자에의 세포 배양

이진호 · 강길선 · 박경희 · 이해방 · \*Joseph D. Andrade

### Polymer Surfaces for Cell Adhesion II. Cell Culture on Surface-modified Polymers

Jin Ho Lee, Gil Son Khang, Kyung Hee Park, Hai Bang Lee, \*Joseph D. Andrade

#### — Abstract —

Chinese Hamster Ovary(CHO) cells were cultured on the surface-modified polymers described in the previous study("Polymer Surfaces for Cell Adhesion. I. Surface Modification of Polymers and ESCA Analysis," J. of KOSOMBE, Vol. 10, No. 1, 43-51, 1989). Among the physicochemical treatment methods, the chloric acid treatment was found to be the best method of rendering the polymer surfaces adhesive for CHO cells probably due to the high density of hydroxyl groups on the surface. Among the biological methods, the fibronectin treatment was best for CHO cell-compatibility probably due to specific active sites existed on the cell-binding domains of the fibronectin structure. When we compare the cell-compatibility of the chloric acid-and the fibronectin-treated PET surfaces, the number of cells attached on the surfaces were increased by 460.5 % and 559.0 %, respectively, after 32 hr CHO cell culture, compared to that of untreated PET.

#### 1. 서 론

고분자를 이용한 인공장기 개발에 가장 큰 문제가 되는 것은 인공장기를 인체내에 이식시켰을때 혈액

<접수: 1989년 6월19일>

한국 화학 연구소, 고분자 제3연구실

Polymer Research Lab. 3, Korea Research Institute of Chemical Technology

\*Utah 대학교, 생체공학과

\*Dept. of Bioengineering, University of Utah, U. S.A.

및 생체적합성 문제이다. 즉 이물질이 인체내에 삽입되었을때, 이에 대한 생체내 거부반응으로 인해 주변의 조직세포에 변질이 생기고 이로 인해 인체내에 부작용이 생기거나, 인공장기 표면에 인체내의 여러가지 단백질이나 혈액 구성분들이 흡착됨으로서 인공장기의 기능이 시간이 경과함에 따라 저하하게 된다. 특히 인공혈관의 경우 "혈액적합성(blood compatibility)"이 가장 중요한 요인이 되고 있는데, 혈액적합성을 가지려면 재료표면이 "항혈전성(thromboresistance)" 또는 "항응혈성(anticoagulation)"을 가져야 함은 물론이러니와 혈액과 접촉시 혈액내 단백질, 효소, 혈소판, 혈구등과 같은 구성분들을 변

질시키거나 손상해서도 안된다.

고분자 재료의 혈액적합성을 향상시켜 주기 위한 연구가 세계 곳곳에서 수십년동안 진행되어 왔지만 아직 완벽한 혈액적합성을 나타내는 재료는 개발되지 않고 있는 실정이다.<sup>1-8)</sup> 완벽한 혈액적합성을 나타내는 model case로서 혈관 내벽을 예로 들 수가 있는데, 혈관 내벽이 혈액적합성을 가지는 것은 혈관 내벽에 단일층으로 도포되어 있는 "내피세포(endothelial cell)"라 불리는 얇은 다각형 세포들에 의한 것이다.<sup>9, 10)</sup> 따라서 우리가 인위적으로 고분자 시료에 내피세포를 이식 배양시켜 준다면 혈관 내벽과 유사한 혈액적합성을 가진 표면을 만들 수가 있을 것이지만, 일반적으로 내피세포나 이와 유사한 세포들이 고분자 표면에 쉽사리 부착 성장하지 않는다는 것이 문제시되고 있다.

따라서 본 연구의 전편<sup>11)</sup>에서는 polyethylene, polystyrene과 같은 단순한 화학적 구조를 가진 고분자와 인공혈관 재료로 널리 쓰이는 polyester의 표면을 세포적합성이 향상되도록 여러가지 방법으로 개질하였다.

본 연구에서는 여러가지 물리화학적 및 생물학적으로 표면개질된 고분자 시료에 내피세포와 유사한 성질을 가진, 포유동물의 단층세포인 Chinese Hamster Ovary(CHO) cell을 부착 배양시키고, 각 표면개질 방법에 따른 세포적합성을 비교 검토하였다.

## 2. 실험

### 2-1 표면개질 방법

사용한 고분자 시료는 첨가제가 전혀 함유되어 있지 않은 저밀도 polyethylene(LDPE, 한양화학) film, polystyrene(PS) plate(녹십자 의료공업(주)), polyethylene terephthalate(PET) film ((주) 신경) 등이다. 이들 고분자 시료들을 적당한 크기로 잘라 ethanol에서 2회 30분간 ultrasonication 시킨후 ethanol로 여러번 세척하여 진공 건조후 사용하였다.

이들 고분자 시료의 세포적합성을 향상시키기 위해 사용한 표면개질 방법은 크게 두가지로 나눌 수 있는데, 하나는 O<sub>2</sub> 플라즈마 방전, 코로나 방전, sul-

**Table 1.** Surface modification methods and treatment condition.

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

furic acid 처리, chloric acid 처리 등과 같은 물리 화학적 표면산화 처리 방법이고 다른 하나는 plasma, serum, fibronectin 등과 같은 혈액내 단백질을 고분자 표면에 흡착시키는 생물학적인 방법이다. 이들 각각의 방법에 의한 고분자 시료의 처리조건을 간단히 요약하여 표 1에 나타내었다. 구체적인 처리방법에 대해서는 본 논문의 전편<sup>11)</sup>에 기술되어 있다.

### 2-2 세포 배양

#### 1) 시료 준비

표면처리된 고분자 시료를 무진실에서 15 W Germicidal U.V. lamp로 45 cm 거리에서 1시간동안 멸균하고 배양액내에서 1시간동안 평형시킨후 세포를 배양하였다.

#### 2) 사용세포 및 배양용액

인체내 혈관 내벽과 유사한 혈액적합성을 지닌 재료를 만들기 위해서는 고분자 시료 표면에 혈관 내피세포를 부착 증식시켜야 하는데, 내피세포는 세포의 채집 분리 뿐만 아니라 그 배양조건이 까다롭고, 구입이 쉽지 않아서 본 연구에서는 이와 유사한 특성을 가지며 세포의 구입, 채집 분리, 배양조건등이 비교적 쉬운 영구분열 세포인 Chinese Hamster

Ovary (CHO) cell(Oak Ridge National Laboratory)을 표면개질된 고분자 시료의 세포적합성을 조사하기 위해 사용하였다.

계대 배양을 위해 사용한 완충용액은  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ 가 제거된 Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)<sup>12)</sup>을 pH 7.2-7.3으로 조절하여 121 °C, 1기압에서 15분간 autoclave 멸균처리하여 사용하였다.

Trysin 용액은  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ 을 제거시킨 Hank's balanced salt solution<sup>12)</sup>을 pH 7.2-7.3으로 조절하여, 0.05 % 용액으로 제조하고 멸균후 사용하였다.

배양액은 Ham's F-12 nutrient mixture<sup>12)</sup>에 박테리아의 증식을 억제하기 위해서 penicilin G sodium (NF grade, GIBCO Laboratories) 100 unit/ml와 streptomycin sulfate(GIBCO Laboratories) 100 unit/ml를 첨가하고 세포의 부착과 성장을 촉진하며 trypsin inhibitor 역할을 하는 fatal bovine serum(FBS, GIBCO Laboratories)을 5 %로 혼합하여 membrane filter(Millipore Co., GS-0.2  $\mu m$ )로 여과 멸균하여 사용하였다.

### 3) CHO cell 배양 방법

(A) PBS 용액, 0.05 % trypsin 용액, 배양액을 미리 37 °C로 유지시켰다.

(B) 세포 배양용 polystyrene flask(녹십자 의료공업 (주))에서 계대 배양되고 있는 세포의 배양액을 pasteur pipette을 사용하여 제거하고, flask 표면에 남아있는 serum을 제거하기 위해 PBS로 두번 정도 헹구어 주었다.

(C) 0.05 % trypsin 용액 1 ml을 flask 내에 넣고 바닥에 골고루 퍼지도록 흔들어 준후, 1-2분동안 37 °C로 유지해 준 다음 손바닥으로 flask 바닥을 부드럽게 쳐서 바닥에 부착되어 있던 세포를 suspension 상태로 떼어내었다.

(D) 떼어낸 세포를 배양액으로 희석하여, 자체 제작한 표면개질된 고분자 시료용 배양용기(배양면적, 9.06  $cm^2$ )에 분주하였다.

(E) 37 °C 포화 수증기와 5 %  $CO_2$ 가 유지되고 있는 incubator(Forma Science, Model 3326)에서 적정 시간동안 세포를 배양하였다.

(F) 배양하는 동안 세포의 성장을 억제하거나 형

태변화를 야기시킬수 있는 박테리아, 곰팡이의 오염을 수시로 점검하였다.

(G) 배양이 끝난후 PBS로 2회에 걸쳐 세척하여 미부착 세포를 시료 표면으로부터 제거한 다음, 0.05 % trypsin 용액으로 시료 표면에 부착된 세포를 suspension 상태로 떼어낸 후, 세포가 함유된 suspension 용액을 Haemocytometer의 counting chamber에 채워 3회에 걸쳐 세포수를 계산하고 평균을 내었다.

(H) 시료 표면에 부착되어 있는 세포를 10 % formalin 액으로 10분간 고정시킨 후 5 % Giemsa (BDH, England)액으로 30분간 염색하여 건조시킨뒤, 위상차 현미경(Nikon Inverted Microscope Diaphot-TMD)으로 세포의 부착 및 성장상태를 관찰하였다.

## 3. 결과 및 고찰

여러가지 방법으로 표면처리한 고분자 시료의 세포적합성을 평가하기 위해, CHO 세포를 이용해 각 시료의 세포 부착 및 증식 경향을 조사하였다. 일반적으로 혈관 내피세포나 CHO 세포와 같은 포유동물의 단층세포가 증식하려면 우선 세포가 재료표면에 강력히 부착되어야 한다. 세포가 재료표면에 부착되지 않으면 성장을 할수가 없기 때문에 재료표면의 세포 부착성을 높여주기 위해 여러가지 방법으로 표면처리를 하게 된다. 처리된 표면의 세포적합성을 평가하기 위해서는 in vitro 세포부착 실험을 통하여 일정시간 세포배양후 표면에 부착 성장된 세포수를 계산하여 평가하는 것이 일반적인 방법이 되고 있다.

표 2는 여러가지 물리화학적 및 생물학적으로 표면개질된 고분자 시료들에 일정량의 CHO 세포를 seeding 하고 일정시간동안 배양하여, 시료 표면에서 부착 증식된 세포수를 산출해 놓은 것이다. 일반적으로 세포는 재료 표면이 친수성을 어느정도 띠게 되면 부착이 잘 되어 증식성이 양호해지는데,<sup>13)</sup> LDPE, PS, PET와 같은 고분자들은 소수성 재료로서, 본 연구에서 사용한 물리화학적 또는 생물학적 표면처리에 의해 친수성이 증가된다. 표 2에서 보듯이 미

**Table 2.** Comparison of CHO cell-compatibility of surface-modified polymers (No. of seeded cells,  $4 \times 10^4$  /  $\text{cm}^2$ ; Culture time, 32 hr)

Treatment method	polymer sample	No. of cells attached / $\text{cm}^2$ ( $\times 10^4$ )
Untreated	PET	1.9
Corona*	LDPE	3.1
Sulfuric acid(10 min)	PS	9.7
Chloric acid(10 min)	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,  $9 \times 10^4$  /  $\text{cm}^2$ ; Culture time, 19 hr.

처리된 PET에 부착 증식된 세포수가  $1.95 \times 10^4$  /  $\text{cm}^2$ 인데 비해 표면처리된 모든 시료에 부착 증식된 세포수가 증가하였다.

물리화학적 처리방법들 중에서는 chloric acid 처리한 표면의 세포적합성이 가장 좋게 나타났는데, 이는 전편 논문의 ESCA 분석 결과에서 고찰되었듯이<sup>11)</sup> chloric acid 처리를 하게 되면 다른 처리 방법에 비해 표면에 hydroxyl group의 분포가 많이 형성되기 때문인 것으로 판단된다. 아직 hydroxyl group의 분포가 많은 고분자 표면의 세포 친화력에 대한 구체적인 mechanism은 규명되어 있지 않지만, 고분자 표면의 hydroxyl group과 세포 표면의 polar group 사이의 hydrogen bonding에 의해 세포가 표면에 많이 부착하는 것이 아닌가하고 추정하고 있다.<sup>14)</sup>

생물학적인 처리방법들 중에서는 fibronectin을 흡착시킨 고분자 표면의 세포적합성이 가장 좋게 나타났는데, 그 원인을 규명하기 위해서는 fibronectin 분자의 구조와 성질, 세포와의 상관관계를 이해하여야 한다. Fibronectin은 blood plasma내에 0.3 g / l의 농도로 존재하는 단백질로서 분자량이 220,000

-250,000 dalton 정도의 단량체(subunit)들이 disulfide bond(-S-S-)로 연결되어진 dimer로 구성되어 있다.<sup>15, 16)</sup> 각 단량체들은 길이 60-70 nanometer, 두께 2-3 nanometer 정도의 길쭉한 모양을 하고 있으며, 일련의 domain 구조를 형성하고 있다. 단량체내의 각 domain들은 fibronectin이 fibrin, collagen, cell, heparin 등과 결합할수 있는 능력을 부여해 준다. 특히 세포와 결합할수 있는 domain은 arginine-glycine-aspartate-serine의 amino acid sequence로 구성된 active site를 가지고 있어, 세포 표면에 돌출되어 있는 glycoprotein들이 이 active site에 강하게 결합하게 된다.<sup>15)</sup> Fibronectin은 고분자 표면에 흡착되어, 고분자 표면과 세포를 결합시켜 주는 역할을 하는 이외에도, 각 domain 결합 특성에 따라 collagen, fibrin, heparin 등을 세포와 연결시켜 주는 매개체 역할을 하기도 한다.

표면처리 방법에 따른 세포적합성을 인공혈관 재료로 사용되는 PET경우만 따로 비교해 보면, 표 3에서 보듯이 chloric acid로 10분 처리했을때와 fibronectin 으로 처리했을때 미처리한 시료보다 각각 약 460 %와 560 % 정도로 세포적합성이 향상되었음을 알 수 있다. Chloric acid로 산화 처리한 경우에, 처리시간에 따라 표면에 부착된 세포의 수가 달라졌는데 10분간 처리했을때가 거의 최적 조건인 것으로

**Table 3.** Comparison of CHO cell-compatibility of untreated and surface-modified PET.

Treatment method	Cell culture time (hr)	No. of cells / $\text{cm}^2$ ( $\times 10^4$ )	Untreated PET base (%)
Control	32	1.95	100.0
(untreated)			
Chloric acid			
1 min	32	4.5	231.6
10 min	32	9.0	460.5
30 min	32	6.3	320.9
Plasma protein	19	2.8	143.1
Serum protein	32	3.3	170.0
Fibronectin	32	10.9	559.0

\*No. of seeded cells,  $9.0 \times 10^4$  /  $\text{cm}^2$  for plasma protein-treated surfaces and  $4.0 \times 10^4$  /  $\text{cm}^2$  for other surfaces.

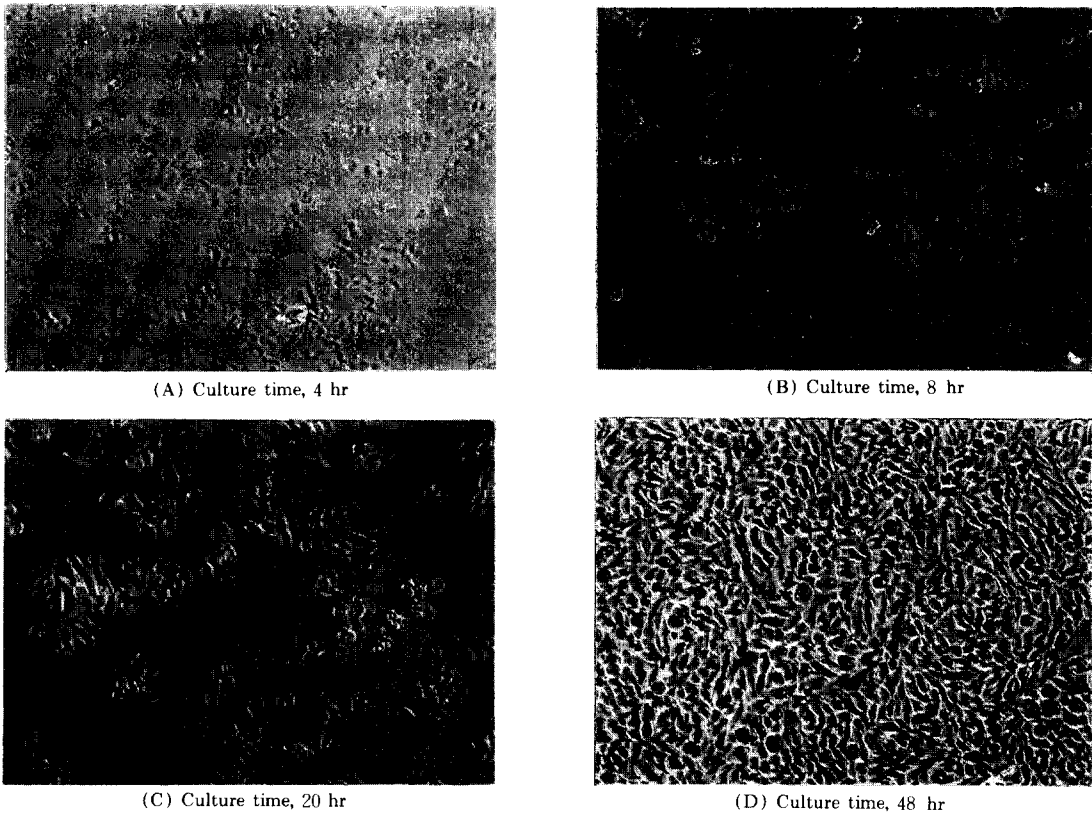


Fig 1. CHO cell growth on chloric acid(10 min)-treated PET surfaces (Inverted microscope,  $\times 100$ ).

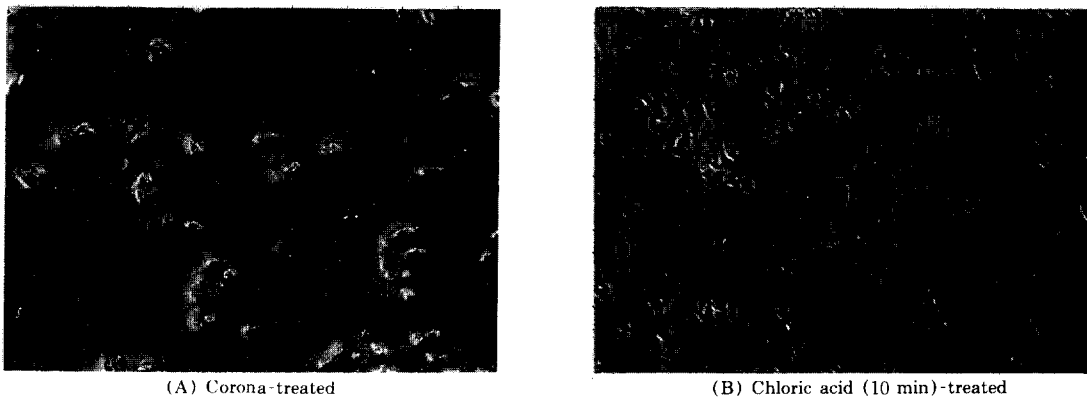


Fig 2. Comparison of CHO cell growth on corona-treated and chloric acid(10 min)-treated PET surfaces (Cell culture, 20 hr; Inverted microscope,  $\times 100$ )

나타났다.

Chloric acid로 10분간 처리한 PET 표면에 부착된 CHO 세포의 성장과정을 위상차 현미경으로 관

찰해 보면(그림. 1), 배양시간이 길어짐에 따라 표면에서의 세포수가 증가해 약 48시간 정도가 되면 시료 표면에서 세포가 완전히 밀집되어 있는 것을 볼

수가 있다.

그림. 2는 참고로 코로나 방전처리한 PET와 chloric acid 처리한 PET 표면에서 증식하고 있는 CHO 세포의 상태를 비교해 본 것이다. 그림에서 보듯이 chloric acid 처리한 시료 표면에서 훨씬 많은 세포들이 균일하게 퍼져 자라고 있는 것을 볼수 있었다.

#### 4. 결 론

본 연구를 통하여, 다양한 방법으로 표면개질된 고분자 시료의 세포적합성이 비교 검토되었다.

플라즈마 방전처리, 코로나 방전처리, sulfuric acid 처리, chloric acid 처리 등과 같은 물리화학적 산화 처리 방법들 중에서는, chloric acid 처리된 고분자 시료에 세포 부착 및 증식성이 가장 양호하게 나타났는데, 이는 chloric acid 처리시 표면에서 hydroxyl group의 분포가 상당히 많게 되어 이들 관능기가 hydrogen bonding을 통하여 세포표면과 결합력을 가지는 것으로 추정된다. Plasma protein, serum protein, fibronectin 등을 고분자 시료 표면에 흡착시키는 생물학적인 처리 방법들 중에서는, fibronectin을 고분자 시료에 흡착시킨 표면의 세포적합성이 가장 좋게 나타났는데, fibronectin 분자 구조내에 cell-binding domain이 있어 세포표면과 특수하게 결합할 수 있는 active site를 가지기 때문인 것으로 추정된다.

Chloric acid와 fibronectin 처리한 PET 표면의 세포적합성은, 미처리된 PET 표면과 비교할때 32시간 CHO 세포를 배양한 후 부착된 세포의 수가 각각 460.5 %와 559.0 % 정도로 증가하였다. Chloric acid 처리한 PET 표면에서의 세포 증식은 배양시간이 지남에 따라 증가하나 약 48시간 배양을 하게 되면 표면에서 세포가 완전히 밀집되어 있는 것을 볼수가 있었다.

본 연구 결과를 토대로, 인공혈관 내부 표면을 개질하고 내피세포를 이식하여 동물실험을 통해 성능을 평가하는 연구를 추진중에 있다.

감사의 글: 이 논문은 1988년도 과학 기술처 특정 연구 개발사업(N88-0124)의 연구비 지원으로 연구

되었다.

#### 참 고 문 헌

- 1) R.E.Baier, Bull. N. Y. Acad. Med., 48, 257, 1972.
- 2) J.D.Andrade, S.Nagaoka, S.Cooper, T.Okano, and S.W.Kim, ASAIO J., 10, 75, 1987.
- 3) A.S.Hoffman, Ann. N. Y. Acad. Sci., 516, 96, 1987.
- 4) Y.IKada, in "Polymers in Medicine," K. Dusek, ed., APS Ser. 57, Springer-Verlag, p. 103, 1984.
- 5) A.S.Hoffman, in "Biomaterials: Interfacial Phenomena and Applications," S.L.Cooper and N.A.Peppas, eds., ACS 199, ACS Press, Washington, D.C., p. 3, 1982.
- 6) J.Black, "Biological Performance of Materials," Marcel Dekker, New York, 1981.
- 7) L.L.Hench and E.C.Ethridge, "Biomaterials: An Interfacial Approach," Academic Press, New York, 1981
- 8) S.W.Kim and J.Fei jin, in "CRC Critical Reviews in Biocompatibility," Vol. 1, CRC Press, Boca Raton, p. 215, 1985.
- 9) W.Bloom and D.W.Fawcett, "A Textbook of Histology," 9th ed. Saunders, Philadelphia, 1968.
- 10) J.D.Andrade, H.B.Lee, and M.S.Jhon, Trans. ASAIO, 19, 1, 1973.
- 11) J.H.Lee, G.S.Khang, K.H.Park, H.B.Lee, and J.D.Andrade, J. KOSOME, 10, 43, 1989.
- 12) "GIBCO Laboratories Catalogue and Reference Guide," GIBCO Laboratories, Life Technologies, Inc., 1987.
- 13) H.B.Lee and J.D.Andrade, Trans. 3rd World Biomaterials Congress, Kyoto, Japan, p. 43, 1988.
- 14) A.S.G.Curtis, J.V.Forrester, C.McInnes, and F.Lawrie, J. Cell Biol., 97, 1500, 1983.
- 15) R.O.Hynes, Sci. Amer., 254(6), 32, 1986.
- 16) K.M.Yamada, Ann. Rew. Biochem., 52, 761, 1983.