

## 플라스마 처리와 아크릴산 결합에 의한 PLLA 필름 및 지지체의 최적 친수화와 연골세포 정착

양희석\*\*\* · 박귀덕\* · 안광덕\* · 김병수\*\* · 한동근\*†

\*한국과학기술연구원 생체재료연구센터, \*\*한양대학교 화공과  
(2006년 1월 4일 접수, 2006년 3월 9일 채택)

### Optimal Hydrophilization and Chondrocyte Adhesion of PLLA Films and Scaffolds by Plasma Treatment and Acrylic Acid Grafting

Hee Seok Yang\*\*\*, Kwideok Park\*, Kwang-Duk Ahn\*,  
Byung Soo Kim\*\*, and Dong Keun Han\*†

\*Biomaterials Research Center, Korea Institute of Science and Technology,  
P.O. Box 131, Cheongryang, Seoul 130-650, Korea

\*\*Department of Chemical Engineering, Hanyang University,  
17 Haengdang-dong, Seongdong-gu, Seoul 133-791, Korea

(Received January 4, 2006; accepted March 9, 2006)

**초록 :** 기존의 고분자 지지체의 소수성 및 세포친화성을 향상시켜 조직공학용 고기능성 지지체로 사용하기 위해서 여러 가지 플라스마 처리와 카복실기를 함유한 아크릴산(AA)을 직접 chamber내에서 *in situ* 그래프트 결합을 행하여 최적의 친수성을 갖는 생분해성 poly(L-lactic acid) (PLLA) 필름 및 이중기공 지지체를 제조하였다. 표면분석 결과, 표면개질된 비다공성 PLLA 필름 및 이중기공 지지체 표면은 미처리 PLLA control에 비해서 접촉각의 감소와 카복실기 함량의 증가로 친수성이 크게 증가하였다. 특히 여러 가지 표면개질 방법 중 Ar(아르곤)/AA 시료나 Ar+TP(열중합) 시료보다는 Ar 플라스마와 AA를 차례로 처리한 Ar+AA+AA 시료가 다른 시료들보다 접촉각이 낮고 카복실기가 많아서 최적의 표면 친수화 처리조건임을 알 수 있었으며, 표면개질된 PLLA 필름 및 이중기공 지지체의 경우 친수성이 증가함에 따라서 연골세포의 정착과 증식도 크게 향상되었다.

**Abstract :** To utilize as highly functional scaffolds for tissue engineering by improving hydrophobicity and cell compatibility of the exist polymer scaffolds, the biodegradable poly(L-lactic acid) (PLLA) films and scaffolds having the optimal hydrophilicity were prepared by *in situ* plasma treatment and grafting of a carboxyl acid-containing monomer, acrylic acid (AA) in the chamber. From the results of surface analyses, surface-modified nonporous PLLA film and dual pore scaffold surfaces showed high hydrophilicity due to the decrease in contact angle and the increase in carboxylic groups as compared with untreated PLLA control. In particular, among various surface modification methods, Ar(argon)+AA+AA sample prepared by Ar plasma and then acrylic acid treatments displayed lower contact angle and more carboxylic groups than Ar/AA and Ar+TP(thermal polymerization) samples, indicating that Ar+AA+AA sample was optimally treated for improving its hydrophilicity. In the cases of surface-modified nonporous PLLA films and dual pore scaffolds, the adhesion and proliferation of chondrocytes increased with increasing their hydrophilicity.

**Keywords :** tissue engineering, biodegradable scaffolds, plasma treatment, acrylic acid grafting, hydrophilization, chondrocyte adhesion.

## 서 론

인간의 생명 연장에 대한 무한한 탐구 노력으로 생명과학 및 의학 분야의 눈부신 발전과 더불어 미래를 선도해 나아갈 신기술인 조직공학 분야도 하나의 학문으로 정립되고 있다.<sup>13</sup> 조직공학의 필요성은 장기이식에 대한 관심으로부터 출발되었으며 초창기 장기이식 분야는 인류의 건강증진, 나아가 생명연장이라는 매우 중요한 역할을 하였으나 점차 필요로 하는 장기의 수보다는 기증된 장기의 숫자가 현

저히 부족하다는 한계에 이르게 되었다. 장기 이식의 수급 불균형은 여러 가지 사회적, 윤리적 문제를 초래하였고 이러한 문제를 해결하기 위하여 인공적으로 생체조직 또는 장기를 재생하려는 조직공학이라는 분야가 현재 각광을 받고 있다.

일반적으로 기본적인 조직공학 기법은 먼저 환자의 몸에서 필요한 조직을 일부 채취하고 그 조직편으로부터 세포를 분리한 다음 분리된 세포를 배양을 통하여 필요한 양만큼 증식시킨 다음 다공성을 가지는 생분해성 고분자 지지체(scaffold)에 주입하여 일정기간 체외 배양한 후 이 하이브리드형 세포/고분자 지지체를 다시 인체내에 이식함으로써 인공적으로 필요한 부분에서 조직이나 장기를 재생하는 것이다. 이

†To whom correspondence should be addressed. E-mail: dkh@kist.re.kr

렇게 이식된 생분해성 고분자 지지체는 체내에서 주위 조직과 융화가 잘 되어야 하며 염증 반응이 없고 일정 기간이 지난 후 원하는 시간에 스스로 분해하여 이물질로 남지 않아야 한다.<sup>45</sup>

최근 생분해성 polyglycolide(PGA), poly(L-lactic acid)(PLLA), poly(lactide-co-glycolide) (PLGA), poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) 등의 합성 고분자 또는 콜라겐(collagen), 키토산(chitosan) 및 히알론산(hyaluronic acid) 등의 천연 고분자가 조직공학용 지지체로 많이 연구되고 있다.<sup>67</sup> 합성 고분자 지지체의 경우 우수한 기계적 강도와 분해속도를 조절할 수 있는 장점이 있으나 표면의 소수성과 세포적합성의 결여로 초기 세포접착 및 성장이 천연 고분자에 비해 낮으며, 반면에 천연 고분자 지지체는 표면 성질이 우수하나 기계적 물성이 떨어지고 세포배양 시 지지체 자체가 수축하여 원하는 크기 및 형태를 유지할 수 없는 것으로 알려져 있다. 특히 합성 고분자 재료는 모두 소수성이고 또한 기능성기가 없기 때문에 특히 조직공학적 응용에 있어서 세포 및 조직적합성이 낮다는 단점이 있다. 이러한 문제점을 개선하기 위하여 여러 가지 방법으로 고분자 지지체의 표면을 개질하려는 연구가 많이 진행되고 있다.

조직공학용 고분자 지지체의 친수성 및 세포친화성을 향상시키기 위하여 물리화학적 방법을 이용하고 있다. 대표적인 화학적인 방법으로는 수산화나트륨과 같은 알칼리성이나<sup>8,10</sup> 염산과 같은 산성<sup>11</sup> 수용액으로 처리하는 방법, 과산화수소 수용액으로 처리하는 방법 등이<sup>12</sup> 알려져 있다. 그러나 이러한 산/알칼리 또는 과산화수소 수용액을 사용하는 방법의 경우에는 그 수용액에 의하여 지지체 자체가 분해되어 기계적 성질이 저하될 수 있기 때문에 최근에는 다른 한편으로 물리적인 방법이 더 많이 연구되고 있다.<sup>13</sup> 이를 위해서 주로 자외선(UV) 조사,<sup>12,14</sup> 전자선 조사,<sup>15</sup> 감마선 조사,<sup>15</sup> 플라스마 처리<sup>16,20</sup> 등이 사용되고 있으며 이중 플라스마 처리방법은 얻어진 기능성기를 이용하여 펩타이드와 단백질,<sup>21</sup> 콜라겐,<sup>22,23</sup> 키토산<sup>10</sup> 등을 결합하여 세포친화성을 향상시키고 있다. 특히 고분자 지지체에 친수성, 생체적합성 및 기능성기를 동시에 부여할 수 있는 카복실기를 도입하려는 연구도 많이 진행 중이다. 카복실기는 중합단량체인 아크릴산(AA)이나 메타크릴산을 분해성 PLLA, PCL, 전분(starch)이나 비분해성 폴리에스터(PET) 고분자에 플라스마 처리로 활성화한 다음 UV조사나<sup>14,22,24,25</sup> 열중합에<sup>26,27</sup> 의해서 그래프트하여 도입하고 있다.

이와 관련하여 본 연구팀은 이전 연구에서 기존 고분자 지지체의 단점을 해결하기 위해서 가스 발포법과 상분리법을 병합하여 새롭게 고안된 제조방법으로 단일기공과 이중기공의 다공성 고분자 지지체를 제조하였다. 이렇게 얻어진 다공성 고분자 지지체는 조직공학용으로 사용할 수 있는 우수한 물리적 및 기계적 특성과 적당한 생분해성을 나타내었다.<sup>28,29</sup> 또한 이러한 지지체의 소수성과 세포친화성을 개선시키기 위해서 같은 성분의 고분자 필름에 산소나 아르곤(Ar)을 이용하여 플라스마 처리한 다음 AA를 기존의 chamber 외에서의 UV조사나 열중합이 아닌 직접 chamber내에서 *in situ* 그래프트 중합에 의해서 결합시켰다. AA로 표면개질된 고분자 필름은 친수성이 크게 증가하였으며 이로 인하여 섬유아세포(fibroblast)의 배양실험 결과 미처리 필름에 비해 세포의 정착 및 증식이 현저히 향상되었다.<sup>30,31</sup>

본 연구에서는 기존의 플라스마 처리를 이용하여 최적의 친수성 및 생리활성물질과 결합할 수 있는 카복실기를 갖는 조직공학용 생분해성 고분자 지지체를 제조하기 위해서 Ar 플라스마에 의한 여러 가지 표면개질 방법에 따라 AA를 직접 chamber 내에서 *in situ* 그래프트 결합시켰으며, 이렇게 개질된 PLLA 필름 및 지지체의 표면 특성

과 연골세포(chondrocyte)와의 상관관계를 미처리 PLLA control과 비교하여 평가하였다.

## 실 험

**재료 및 시약.** 다공성 필름 및 3D 이중기공 고분자 지지체를 제조하기 위한 생분해성 고분자 재료로 poly(L-lactic acid) (PLLA, 분자량 = 220000; 독일 Boehringer Ingelheim사)을 사용하였다. 지지체를 제조하는데 있어서 기공형성을 위한 무독성, 수용성 및 비등성 혼합물로는 sodium bicarbonate(NaHCO<sub>3</sub>)와 citric acid를 사용하였으며, 용매는 chloroform 및 1,4-dioxane을 사용하였고 비용매로는 3차 증류수를 사용하였다. 카복실기 함유 친수성 중합단량체는 Aldrich사의 아크릴산(acrylic acid, AA)을 사용하였다. 그 밖의 다른 시약들은 1급 제품으로 정제없이 그대로 사용하였다.

**비다공성 PLLA 필름의 제조.** 비다공성 PLLA 필름은 용매 주형방법으로 제조하였다. 즉, PLLA를 chloroform에 8% 용액으로 제조한 다음, Vortex 혼합기를 이용하여 균일하게 완전 혼합하여 용해하였다. 이 혼합액을 glass dish에 부어 24시간 공기 중에서 건조하고 48시간 상온에서 진공펌프를 이용하여 용매를 완전히 제거하였다. 제조된 비다공성 PLLA 필름의 두께는 0.4~0.5 mm였다.

**이중기공 PLLA 지지체의 제조.** 이중기공 PLLA 지지체는 가스 발포법에 의한 큰 기공과 상분리법에 의한 작은 기공을 동시에 갖는 형태로 제조하였다.<sup>29</sup> 우선 PLLA를 40 °C에서 1,4-dioxane과 물(87/13 vol/vol)을 사용하여 용해하였으며 고분자 농도는 7%의 균일 혼합용액으로 만들었다. 비등성 혼합물인 sodium bicarbonate와 citric acid를 막자사발을 이용하여 분쇄한 후 sieve를 사용하여 입자크기별로 분류하여 200~300  $\mu$ m의 입자크기를 얻었다. 두 개의 비등성 혼합물(sodium bicarbonate와 citric acid의 혼합몰비=3:1)을 미리 제조된 고분자 용액에 비등성용/고분자용액의 중량비가 20/1이 되도록 동시에 넣고 Vortex 혼합기를 이용하여 균일하게 혼합하였다. 이 혼합용액을 일정한 형태의 실리콘 재질의 틀에 붓고 액체질소로 급랭시킨 후 동결건조하여 용매/비용매인 1,4-dioxane과 물을 모두 증발시켜서 디스크 형태의 시편을 제조하였다. 이 디스크 형태의 시편을 물과 에탄올과의 혼합비가 50:50인 발포매질에 넣고 교반하면서 48시간 정도 발포과정을 거친 후 시편을 꺼내어 진공에서 24시간 건조하여 최종적으로 3D 이중기공 PLLA 지지체를 제조하였다.

**플라스마 처리 및 친수성 AA의 결합.** 플라스마 처리 장치는 높이 25 cm, 내경 20 cm인 chamber형 유리관, 플라스마 발생을 위한 라디오파 발생기(FET RF plasma generator, RF-GEN), 유량조절기(SS-48 MG), 진공펌프(SHI DAE Model No. 08032) 및 압력측정기(Terranova Model No. 924)로 구성된 국내 IDT Eng.사 제품을 사용하였다. 실험에 사용된 비다공성 PLLA 필름(1×2 cm<sup>2</sup>)과 이중기공 PLLA 지지체(지름 1.0 cm, 두께 0.8 cm)는 *in situ* 직접적인 AA 결합을 다양한 방법으로 chamber내에서 플라스마를 처리하였으며, 더 자세한 여러 가지 처리조건을 Table 1에 나타내었다. 즉, Ar 가스와 AA를 이용한 플라스마 반응에서 비다공성 필름과 이중기공 지지체를 플라스마 방전장치의 chamber내에 위치한 라디오파 발생 전극판 사이에 고정시킨 후 연결된 모든 밸브를 닫고 진공 펌프를 사용하여 chamber내 압력이 0.1 torr가 되도록 한 다음 이 상태에서 먼저 Ar 가스를 주입하여 chamber내 압력이 0.2 torr가 되게 하고 동시에

**Table 1. Surface Modification of PLLA Films and Scaffolds**

Sample	Treatment conditions		
1. PLLA control	No treatment		
2. Ar/AA <sup>a</sup>	Ar/AA simultaneous treatment (0.4 torr, 50 W, 1 min)		
3. Ar+AA+Ar	Ar plasma (0.2 torr, 50 W, 1 min)	-----> AA feed (0.2 torr, 0 W, 2 min)	-----> Ar plasma (0.2 torr, 25 W, 1 min)
4. Ar+Ar+AA	Ar plasma (0.2 torr, 50 W, 1 min)	-----> Ar feed (0.2 torr, 0 W, 10 min)	-----> AA feed (0.2 torr, 0 W, 2 min)
5. Ar+AA+AA	Ar plasma (0.2 torr, 50 W, 1 min)	-----> AA plasma (0.2 torr, 50 W, 1 min)	-----> AA feed (0.2 torr, 0 W, 2 min)
6. Ar+TP	Ar plasma (0.2 torr, 50 W, 1 min)	-----> Thermal polymerization (TP) (70 °C, 90 min, 50 rpm)	

<sup>a</sup>Ar: Argon gas, AA, acrylic acid.

AA를 감압, 기화하여 chamber내 압력이 0.4 torr가 되게 하였으며, 라디오 주파수(RF) 전원과 필드형 음전압을 가하여 50 watt에서 1분 동안 플라즈마 반응을 행하여 Ar/AA로 명명하는 시료를 제조하였다. 또한 Ar 가스로 PLLA의 표면을 활성화하는 Ar 플라즈마 방법과 AA를 PLLA의 표면에 공급하는 AA feed 방법을 이용하여 Ar과 AA의 처리방법과 시간에 따라서 Table 1에서와 같이 Ar+AA+Ar, Ar+Ar+AA 및 Ar+AA+AA 시료를 각각 제조하였다. 또 다른 방법으로 본 연구에서는 건식공정뿐만 아니라 습식표면 처리공정을 비교하기 위해서 비다공성 필름과 이중기공 지지체를 플라즈마 chamber내에서 앞선 방법으로 Ar 가스만으로 먼저 활성화시킨 후 실온에서 일정시간 동안 방치하여 라디칼을 안정시킨 다음 10% 수용액으로 제조된 AA 용액에 담귀서 70 °C에서 90분 동안 50 rpm으로 교반하면서 그래프트 증합하여 Ar+TP 시료를 제조하였다.<sup>26,27</sup>

**표면특성 분석.** 여러 가지 방법으로 표면개질된 PLLA 필름은 표면 분석 전에 에탄올로 세척한 후 건조한 다음 사용하였다. 먼저 PLLA 필름의 화학적인 구조를 확인하기 위하여 1 µm 범위의 표면특성을 측정할 수 있는 attenuated total reflection-Fourier transform infrared(ATR-FTIR, IFS 66 spectrometer, Bruker사)로 측정하였다. 그리고 표면개질된 PLLA 필름의 화학적 표면조성 분석은 electron spectroscopy for chemical analysis(ESCA, S-Probe, Surface Science사)를 사용하여 측정하였다. 사용한 ESCA 장치의 양극에는 300 watt의 전압과 1497 eV의 energy source(AlKα)가 장착되어 있으며 측정시 X-ray의 입사각은 45도로 하였다. 표면의 survey scan과 carbon 1s(C1s) core level scan spectra로부터 표면의 화학적 조성변화를 분석하였다. 비다공성 PLLA 필름과 이중기공 지지체의 표면개질 전, 후의 표면 모폴로지는 scanning electron microscopy(SEM, S-2500C, Hitachi사)로 관찰하였으며 금 코팅은 0.1~0.05 torr의 압력 하에서 6~7 mA의 ion current로 5분간 행하였다. 표면개질 전, 후의 PLLA 필름의 친수화 정도는 물 접촉각으로 평가하였다. 물 접촉각 측정 장치는 optical bench type contact angle goniometer(VCA Optima XE Video Contact Angle System, Crest Technology사)를 이용하였으며 비다공성 PLLA 필름 표면에 증류수(3 µL)를 떨어뜨리고 곧바로 goniometer를 사용하여 측정하였다. 또한 AA 단량체의 결합에 의한 카복실기는 Toluidine Blue O 염료를 이용하여 정량하였다.<sup>27,32</sup> 즉, Toluidine Blue O (0.5 mM, pH 10)의 용액에 PLLA 시료를 담귀서 30 °C에서 6시간 동안 Toluidine Blue O 염료와 카복실기를 반응시켰으며, 이때 Toluidine Blue O 염료와 카복실산은 1 : 1로 반응한다. 계속해서 수산화나트륨 용액(pH 9)에서

30초간 50 rpm으로 세척을 한 후 아세트산 50% 수용액에서 12시간 동안 1000 rpm으로 Toluidine Blue O를 탈착시킨 다음 이 수용액을 633 nm의 UV 흡광도로부터 카복실기를 정량하였다.

**연골세포 배양 및 분석.** AA가 결합된 비다공성 PLLA 필름과 이중기공 지지체의 세포친화성을 확인하기 위하여, 연골세포의 배양실험을 행하였다. 사용한 연골세포는 토끼의 무릎에서 체외 분리한 다음 primary culture한 것을 사용하였다. 표면개질된 비다공성 PLLA 필름과 이중기공 지지체를 UV로 4시간 멸균한 다음 70% 에탄올 수용액에 1시간 정도 담근 후 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4) 용액으로 세척하였다. 계속해서 fetal bovine serum(FBS)이 첨가 안된 배지에 시료를 1시간 동안 담가둔 후 깨끗한 거름종이에 하나씩 소독된 핀셋을 이용하여 올려놓아 잔여 수분을 제거한 다음 세포실험에 사용하였다. 세포배양은 준비된 비다공성 필름당 연골세포 2.5 × 10<sup>3</sup>개, 이중기공 지지체당 5 × 10<sup>4</sup>개를 static seeding한 후 1시간 동안 흔들어서 준 다음 Dulbecco's modified Eagle's medium F-12(DMEM F-12) 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>에서 각각 2, 4 및 6일 동안 배양하였다. 배양 후 시료에 점착된 세포를 SEM으로 분석하기 위해서 4 °C에서 12시간 동안 2.5% glutaraldehyde로 고정화를 한 후 일련의 에탄올/물 혼합액(50/50, 60/40, 70/30, 80/20, 90/10 및 100/0)을 사용하여 순차적으로 각각 10분씩 세척하여 최종적으로 탈수시켰다. 이어서 deep freezer에 6시간 동안 냉동한 다음 freeze dryer에 넣어 완전 건조시킨 후 금 코팅하여 점착된 세포의 모폴로지를 관찰하였다. 또한 점착된 세포의 단백질은 비다공성 필름과 이중기공 지지체에 고정화된 연골세포를 WST-1(cell proliferation reagent) 시약을 이용하여 염색한 후 4시간 동안 37 °C에서 5% CO<sub>2</sub> 하에서 배양하여 450 nm의 최대 흡광도에서 ELISA reader로 측정하여 정량하였다.

**결과 및 토론**

PLLA 필름과 지지체의 표면개질. 조직공학적 기법으로 인공조직이나 장기를 재생시 대부분의 생분해성 합성 고분자 지지체의 표면이 소수성이기 때문에 세포 접착이 어렵고 또한 세포배양액이 잘 젖지 않아서 세포가 균일하게 배양되지 못한다고 알려져 있다. 이러한 단점을 해결하기 위하여 현재 여러 가지 물리화학적 방법으로 지지체의 표면개질을 행하고 있으며 특히 플라즈마 방법을 이용하면 재료의 벌크물성의 저하없이 단시간에 간단히 표면만을 개질할 수 있는 장점이 있다.<sup>16,20</sup>

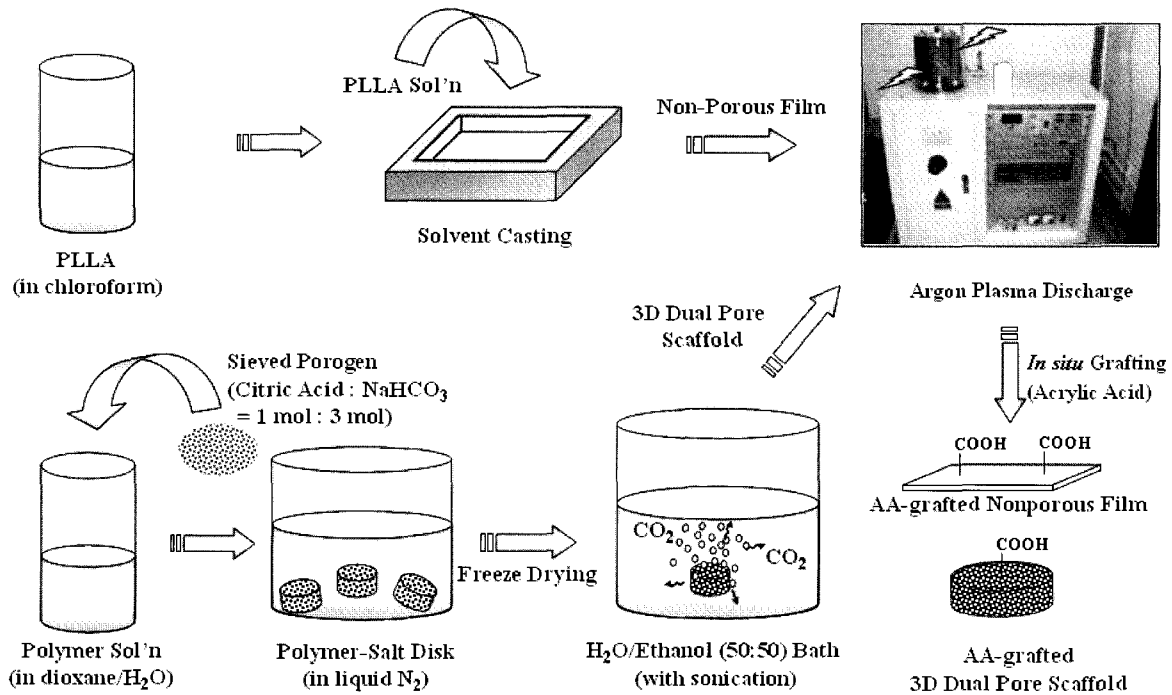


Figure 1. Preparation and surface modification of nonporous PLLA films and 3D dual pore scaffolds.

본 연구에서는 제조된 비다공성 PLLA 필름과 이중기공 지지체를 플라즈마 chamber에 넣은 후 먼저 Ar 가스를 주입하여 플라즈마 처리에 의하여 표면을 활성화한 다음 AA를 chamber내로 감압, 기화시켜 흘려보냄으로써 고분자 표면에 AA를 *in situ* 직접 그래프트 중합을 유도할 수 있었다(Figure 1과 Table 1). 즉, AA는 끓는점 (139 °C)이 비교적 낮아서 적정 조건으로 감압하면 상온에서도 기화되어 플라즈마 chamber내로 들어올 수 있고 또한 플라즈마 처리시 chamber내의 온도가 2~3 °C 정도 상승하는 효과가 있기 때문에 chamber의 가열없이 실온에서 AA의 기화에 의한 표면 그래프트 중합이 가능하였다.

특히 본 연구에서는 플라즈마 처리 및 AA의 결합에 의한 고분자 표면의 친수화의 최적 조건을 검토하기 위해서 Table 1과 같이 크게 3 가지 방법으로 나누어 표면개질을 수행하였다. 첫번째는 Ar 가스와 AA를 동시에 처리하여 Ar/AA 시료를 제조하였으며, 두번째는 Ar 플라즈마 처리와 AA 공급방법을 순서와 처리조건(플라즈마 진공도, 압력 및 시간)을 서로 달리하여 3가지의 각기 다른 Ar+AA+Ar, Ar+Ar+AA 및 Ar+AA+AA 시료를 제조하였다. 마지막으로 기존의 알려진 방법과 같이 chamber내에서 Ar 가스만으로 먼저 활성화시킨 다음 chamber외에서 열중합에 의해서 Ar+TP 시료를 제조하였다.<sup>26,27</sup> 이렇게 얻어진 비다공성 PLLA 필름 및 이중기공 지지체의 표면개질 정도와 특성을 몇가지 표면분석과 연골세포와의 정착실험을 통해서 비교, 평가하였다.

위와 같이 여러 가지 새로운 방법으로 비다공성 PLLA 필름 및 3D 이중기공 지지체에 친수성 중합단량체인 AA를 플라즈마 처리에 의해서 표면개질함으로써 친수성뿐만 아니라 생체적합성 및 리간드나 성장인자 등의 생리활성물질과 결합할 수 있는 기능성기를 동시에 갖는 조직공학용 생분해성 고분자 재료를 제조할 수 있었다.

PLLA 필름과 지지체의 표면특성. 조직공학용 친수성 고분자 지지체

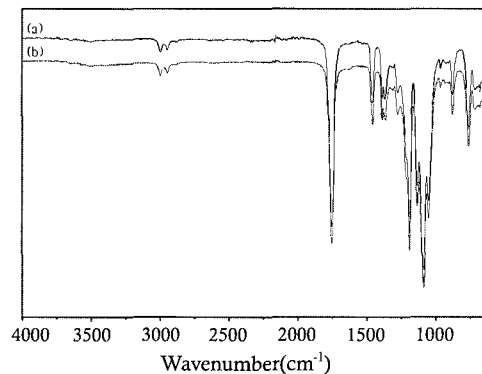


Figure 2. ATR-FTIR spectra of PLLA control (a) and AA-grafted PLLA (Ar+AA+AA) (b) films.

로 사용하기 위하여 여러 가지 플라즈마 처리방법으로 AA를 결합한 비다공성 PLLA 필름 및 이중기공 지지체의 표면특성은 ATR-FTIR, ESCA, SEM, 접촉각 및 카복실기 함량을 각각 분석하여 평가하였다.

Figure 2는 미처리 PLLA control과 AA가 결합된 PLLA(Ar+AA+AA) 표면의 대표적인 ATR-FTIR 스펙트럼을 나타낸 것이다. 특히 AA가 결합된 PLLA의 경우 플라즈마 처리방법 및 조건과 관계없이 비슷한 스펙트럼을 보였다. 2개의 스펙트럼을 비교해 보면 PLLA의 표면개질 전과 후의 스펙트럼이 크게 다르지 않았다. 즉, PLLA control은 1750 cm<sup>-1</sup> 근처에서 lactide에 의한 에스터의 특성 피크가 크게 나타났으며, AA가 결합된 PLLA의 경우도 거의 같은 위치에서 AA의 카복실기 피크가 에스터의 특성 피크에 합쳐져서 거의 하나의 피크로 나타났다.<sup>30,31</sup> 이와 관련하여 일부 연구에서는 AA의 카복실기가 lactide의 에스터기와 약간 다른 위치에서 나온다고 보고한 바도 있지만<sup>26</sup> 또 다른 연구에서는 본 연구와 같이 서로 겹쳐져서 구별할 수 없다고 보

도한 바도 있다.<sup>24</sup> 따라서 AA가 플라즈마 처리에 의해서 PLLA 표면에 그래프트 결합되었는지를 더 정확하게 확인하기 위하여 ESCA, 접촉각 및 카복실기 함량을 각각 분석하였다.

Figure 3은 미처리 PLLA control과 AA가 결합된 PLLA(Ar+AA+AA) 표면의 대표적인 ESCA C1s 스펙트럼을 나타낸 것이다. FTIR 결과와 마찬가지로 AA가 결합된 PLLA의 경우 플라즈마 처리방법 및 조건과 관계없이 비슷한 스펙트럼을 나타내었다. 일반적으로 고분자 표면의 화학적 조성을 알기 위해서 ESCA 원소분석을 행하지만 본 연구에서는 더 상세한 기능성기를 확인하기 위해서 ESCA C1s 분석을 행하였다. Figure 3(a)와 같이 PLLA control 표면 자체는 alkyl carbon(C-C, 285.0 eV), methine carbon(C-O, 286.1 eV) 및 ester carbon(O=C-O, 289.1 eV) 성분으로 거의 비슷한 비율로 구성되어 있다.<sup>25</sup> 그러나 AA가 결합된 PLLA(Figure 3(b)) 표면은 alkyl carbon에 비해서 카복실기에 의한 ester carbon이 상대적으로 증가하는 것으로 보아 효과적으로 AA가 결합되었음을 확인할 수 있었다.<sup>21</sup> 또한 비다공성 PLLA 필름과 이중기공 지지체의 표면 모폴로지 변화는 SEM 관찰 결과, 플라즈마 처리에 의한 AA 결합 전후의 PLLA 필름과 지지체의 표면 모폴로지는 거의 변화하지 않았음을 확인하였다.

Table 2는 여러 가지 표면개질 방법으로 제조된 PLLA 표면의 접촉

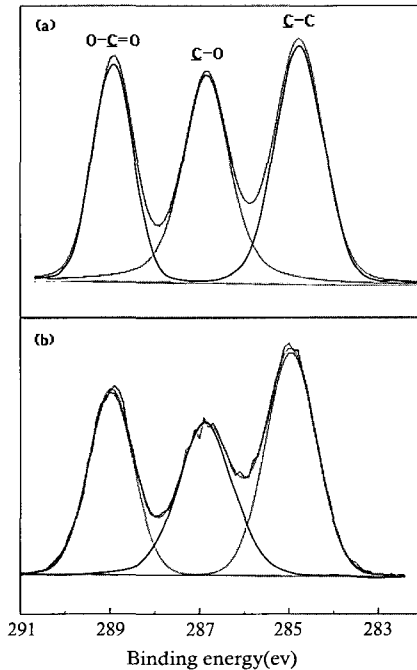


Figure 3. ESCA spectra of PLLA control (a) and AA-grafted PLLA (Ar+AA+AA) (b) films.

Table 2. Surface Properties of AA-grafted PLLA Films

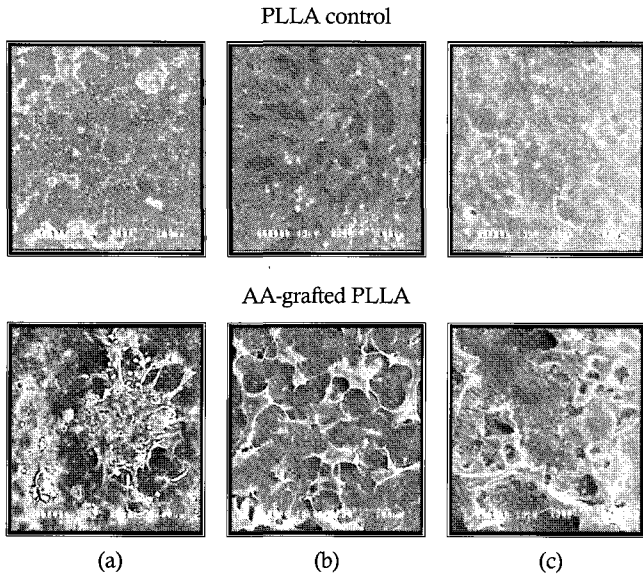
Sample	Contact angle (degree)	-COOH content (mmol/cm <sup>2</sup> )
1. PLLA control	75.1±1.5	-
2. Ar/AA	57.1±1.2	4.06×10 <sup>4</sup>
3. Ar+AA+Ar	52.6±2.3	7.28×10 <sup>4</sup>
4. Ar+Ar+AA	48.6±1.6	1.60×10 <sup>3</sup>
5. Ar+AA+AA	45.3±1.0	6.89×10 <sup>3</sup>
6. Ar+TP	64.2±1.4	2.26×10 <sup>4</sup>

각과 카복실기 함량을 나타낸 것이다. 먼저 접촉각의 경우, 미처리 PLLA control의 접촉각이 75도로 전형적인 소수성 표면을 나타내었으며, 이것을 AA로 표면개질함에 따라서 접촉각이 감소하였다.<sup>12,16,30,31</sup> 이는 AA가 결합됨으로써 PLLA 표면이 친수화가 많이 진행되었음을 의미한다. 특히 Ar 가스와 AA를 동시에 처리한 Ar/AA 시료나 Ar 가스만으로 먼저 활성화시킨 다음 chamber 외에서 열증합에 의한 Ar+TP 시료보다는 Ar 플라즈마 처리와 AA 공급방법의 순서와 처리조건을 달리한 3가지의 Ar+AA+Ar, Ar+Ar+AA 및 Ar+AA+AA 시료가 AA가 더 많이 결합되어서 더 낮은 접촉각을 보였다. 이중 Ar 플라즈마 처리 후 AA 플라즈마 처리한 다음 마지막으로 AA를 다시 공급하여 일정시간 안정화한 Ar+Ar+AA 시료가 가장 낮은 접촉각(45도)을 보여 친수화가 제일 잘 되었음을 알 수 있었다.

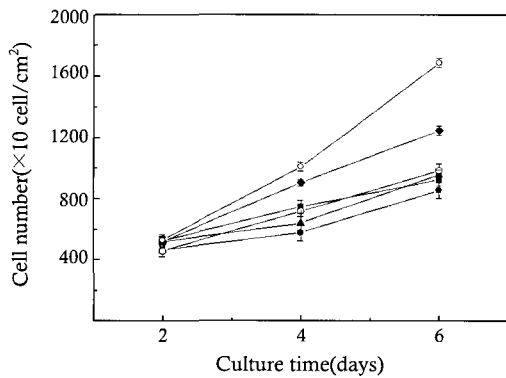
한편 Toluidine Blue O 염료를 이용하여 정량한 카복실기의 함량으로부터 여러 가지 플라즈마 처리조건에 의하여 PLLA 표면에 AA의 그래프트 정도를 평가하였다. 대체로 정량한 카복실기의 함량은 접촉각과 반비례 관계를 나타내었다. 즉, 접촉각이 낮아서 친수성 표면을 보일수록 카복실기의 함량은 증가하였다.<sup>21,25,30,31</sup> 특히 Ar+Ar+AA 시료가 가장 높은 카복실기 함량(6.89×10<sup>3</sup> mmol/cm<sup>2</sup>)을 보였으며, 이는 접촉각 결과와 잘 일치하였다. 그러나 기존의 방법인 플라즈마 처리 후 형성된 라디칼을 안정화시킨 다음 70 °C에서 열증합한 시료는 접촉각과 카복실기의 함량 측정 결과, 미처리 PLLA control과 Ar+Ar+AA 시료의 중간값을 보였다. 이것은 본 연구에서 Ar+Ar+AA의 플라즈마 처리로 행한 표면개질 방법이 PLLA의 표면을 친수화하는데 가장 효과적인 최적의 방법임을 확인하였다. 이상의 표면분석으로부터 접촉각은 카복실기의 함량과 아주 밀접한 관계가 있음을 알 수 있으며 이렇게 그래프트된 카복실기가 많을수록 접촉각이 감소하여 그 표면이 어느 정도 친수화됨으로써 세포와의 상호작용에 호의적으로 작용할 것으로 기대된다.

PLLA 필름과 지지체의 연골세포 점착성. 플라즈마 처리에 의한 AA가 결합된 비다공성 PLLA 필름 및 이중기공 지지체 표면의 친수화에 따른 세포친화성에 미치는 영향을 평가하기 위해서 연골세포 배양 실험을 행하였다. Figure 4는 PLLA control과 AA가 결합된 PLLA(Ar+AA+AA) 필름시료에 연골세포를 2, 4 및 6일간 배양한 후의 SEM 사진이다. 전반적으로 미처리 PLLA control에 비해서 표면개질한 비다공성 필름이, 또한 표면개질한 시료 중에서는 Ar+AA+AA 필름 시료가 각각 연골세포가 더 많이 점착되었으며 spreading도 더 잘 이루어졌다. 또한 배양시간이 증가할수록 세포의 점착과 증식은 시료의 처리방법에 관계없이 증가하였다. 실제로 점착된 세포와 배양시간에 따라 이들로부터 증식된 세포들의 수를 정량화한 결과(Figure 5) PLLA control에 비해 표면개질된 필름시료에서 많은 단백질 함량을 확인할 수 있었다.<sup>12,25,26</sup> 특히 Ar+AA+AA 시료의 경우 다른 시료와 달리 더 많은 연골세포가 점착되었으며 그 경향은 배양시간이 2일에서 6일로 증가함에 따라 더 현저하였다.

한편 Figure 6은 PLLA control과 AA가 결합된 여러 가지 이중기공 PLLA 지지체에 6일간 연골세포를 배양한 후의 SEM사진이다. 모든 이중기공 지지체내의 큰 기공과 작은 기공 사이에 많은 양의 연골세포가 점착되어 있음을 관찰할 수 있었으며, 연골세포를 PLLA 필름에서 배양한 결과(Figure 4)와 마찬가지로 PLLA control보다는 표면개질한 이중기공 지지체가, 또한 표면개질한 지지체 중에서는 Ar+AA+AA 지지체가 더 많은 연골세포의 점착을 확인할 수 있었



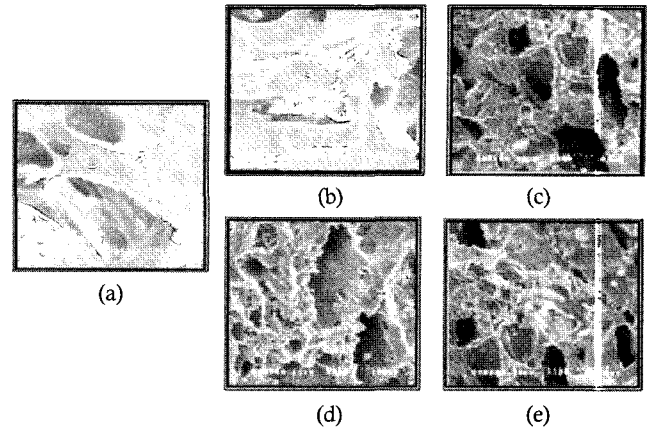
**Figure 4.** SEM morphologies of chondrocyte adhesion on PLLA control and AA-grafted PLLA(Ar+AA+AA) films: (a) 2 days, (b) 4 days, and (c) 6 days.



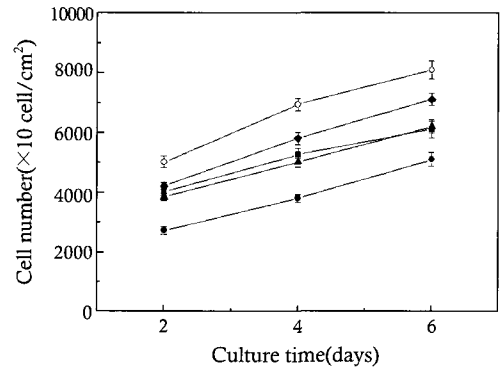
**Figure 5.** WST-1 protein content of chondrocyte adhesion on various surface-modified PLLA films: (●) PLLA control, (▲) Ar/AA, (■) Ar+AA+Ar, (◆) Ar+Ar+AA, (○) Ar+AA+AA, and (○) Ar+TP.

다.<sup>12,25,26</sup> 특히 기존의 방법대로 열중합해서 제조된 지지체(Ar+TP)는 너무 격한 반응조건으로 인하여 크기가 상당히 많이 감소(수축)하여 세포점착 실험을 시행할 수 없었다. Figure 7은 이중기공 PLLA 지지체에 점착된 연골세포의 단백질 함량 분석에 따른 증식정도를 나타낸 것으로, Figure 5의 PLLA 필름과 마찬가지로 연골세포의 정착 및 증식은 미처리 이중기공 지지체보다는 표면개질한 지지체가, 표면개질한 것 중에서는 Ar+AA+AA 지지체가, 또한 증식시간이 증가할수록 증가하였다.

전술한 바와 같이 조직공학학을 이용한 인공조직이나 장기를 재생하기 위하여 기존에 사용하고 있는 소수성 고분자 지지체의 단점을 보완하기 위해서 표면개질 방법이 많이 연구되고 있다. 특히 간단한 플라즈마 처리에 의한 카복실기의 도입은 지지체의 친수성을 크게 증가시킬 수 있으며 이로 인하여 연골세포,<sup>10,12</sup> 섬유아세포,<sup>19,24,30,31</sup> 및 혈관세포<sup>8,26</sup> 등의 여러 세포의 정착 및 증식을 크게 향상시키는 것으



**Figure 6.** SEM morphologies of chondrocyte adhesion after 6 days culture on various surface-modified dual pore PLLA scaffolds: (a) PLLA control, (b) Ar/AA, (c) Ar+AA+Ar, (d) Ar+Ar+AA, and (e) Ar+AA+AA.



**Figure 7.** WST-1 protein content of chondrocyte adhesion on various surface-modified dual pore PLLA scaffolds: (●) PLLA control, (▲) Ar/AA, (■) Ar+AA+Ar, (◆) Ar+Ar+AA, and (○) Ar+AA+AA.

로 보고되고 있다.<sup>34,35</sup> 이러한 경향은 본 연구에서의 결과와도 아주 잘 일치하는 것으로 고분자 지지체의 세포배양은 그 표면이 소수성보다는 표면개질에 의해서 어느 정도 적당한 친수성일때 배양액의 침투가 쉽고 세포를 고르게 분산시킬 수 있어서 세포점착이 더 잘 됨을 확인할 수 있었다.

## 결론

조직재생용 기능성 고분자 지지체로 사용하기 위해서 여러 가지 플라즈마 처리와 AA를 직접 chamber내에서 *in situ* 그래프트 결합을 행하여 최적의 친수성 및 생리활성물질과 결합할 수 있는 카복실기를 동시에 부여할 수 있는 생분해성 PLLA 필름 및 지지체를 제조하였다. 표면개질된 PLLA 필름 및 지지체는 미처리 PLLA에 비해서 표면분석 결과 접촉각의 감소와 카복실기의 증가로 친수성이 증가하였으며 이로 인하여 연골세포의 정착과 증식도 크게 향상되었다. 여러 가지 표면개질 방법 중 Ar 가스와 AA를 동시에 처리한 Ar/AA 시료나 Ar 가스만으로 먼저 활성화시킨 다음 chamber외에서 열중합에 의한 Ar+TP 시료보다는 Ar 플라즈마 처리와 AA 공급방법의 순서와 처

리조건을 달리한 3가지의 Ar+AA+Ar, Ar+Ar+AA 및 Ar+AA+AA 시료가 AA가 더 많이 결합되었으며, 특히 Ar+AA+AA 처리 시료가 다른 시료들보다 접촉각이 낮고 카복실기가 가장 많아서 최적의 표면 친수화 처리조건임을 알 수 있었다. 따라서 이상의 결과로부터 본 연구에서 제조한 AA가 결합된 이중기공 고분자 지지체는 연골세포 이식 후 표면의 적당한 친수성에 의하여 세포의 정착성뿐만 아니라 점착된 세포들이 많이 증식하여 보다 안정되게 연골 조직화할 수 있을 것으로 기대된다. 더욱이 이러한 지지체는 조직공학적으로 연골조직이나 다른 장기를 재생하는데 있어서 필요한 리간드 펩타이드나 성장인자들의 생리활성물질을 고정화할 수 있는 고기능성 지지체로 사용이 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글 : 본 연구는 KIST 핵심역량심화사업(2V00940)과 기관고유사업(2E18652)으로 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. R. Langer and J. P. Vacanti, *Science*, **260**, 920 (1993).
2. J. A. Hubbell and R. Langer, *Chem. Eng. News*, **March 13**, 42 (1995).
3. R. M. Nerem and A. Sambanis, *Tissue Eng.*, **1**, 3 (1995).
4. A. Atala and R. P. Lanza, eds., *Methods of Tissue Engineering*, Academic Press, San Diego, 2002.
5. J. A. Hubbell, *Trends Polym. Sci.*, **2**, 20 (1994).
6. R. P. Lanza, R. Langer, and W. L. Chick, *Principle of Tissue Engineering*, Academic Press, San Diego, 1997.
7. C. W. Patrick Jr., A. G. Mikos, and L. V. McIntire, *Frontiers in Tissue Engineering*, Elsevier Science Press, Oxford, 1998.
8. J. Gao, L. Niklason, and R. Langer, *J. Biomed. Mater. Res.*, **42**, 417 (1998).
9. G. E. Park, M. A. Pattison, K. Park, and T. J. Webster, *Biomaterials*, **26**, 3075 (2005).
10. Y. L. Cui, A. D. Qi, W. G. Liu, X. H. Wang, H. Wang, D. M. Ma, and K. D. Yao, *Biomaterials*, **24**, 3859 (2003).
11. E. D. Boland, T. A. Telemeco, D. G. Simpson, G. E. Wnek, and G. L. Bowlin, *J. Biomed. Mater. Res.: Appl. Biomater.*, **71B**, 144 (2004).
12. Z. Ma, C. Gao, Y. Gong, and J. Shen, *Biomaterials*, **24**, 3725 (2003).
13. J. P. Nuutinen, C. Clerc, T. Virta, and P. Tormala, *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, **13**, 1325 (2002).
14. Z. Ma, C. Cao, J. Yuan, J. Ji, Y. Gong, and J. Shen, *J. Appl. Polym. Sci.*, **85**, 2163 (2002).
15. Y. Yang, M. -C. Porte, P. Marney, J. Alicia, E. Haj, J. Amedee, and C. Baquey, *Nuclear Inst. Method Phy. Res. B*, **207**, 165 (2003).
16. H. Chim, J. L. Ong, J.-T. Schantz, D. W. Huttmacher, and C. M. Agrawal, *J. Biomed. Mater. Res.*, **65A**, 327 (2003).
17. C. E. Holy, C. Cheng, J. E. Davies, and M. S. Shoichet, *Biomaterials*, **22**, 25 (2001).
18. M. B. O. Riekerink, M. B. Claase, G. H. Engbers, D. W. Grijpma, and J. Feijen, *J. Biomed. Mater. Res.*, **65A**, 417 (2003).
19. J. Yang, G. Shi, J. Bei, S. Wang, Y. Cao, Q. Shang, G. Yang, and W. Wang, *J. Biomed. Mater. Res.*, **62**, 438 (2002).
20. Y. Wan, J. Yang, J. Yang, J. Bei, and S. Wang, *Biomaterials*, **24**, 3757 (2003).
21. G. C. M. Steffens, L. Nothdurft, G. Buse, H. Thissen, H. Hocher, and D. Klee, *Biomaterials*, **23**, 3523 (2002).
22. J. Yang, J. Bei, and S. Wang, *Biomaterials*, **23**, 2607 (2002).
23. J. Yang, Y. Wan, J. Yang, J. Bei, and S. Wang, *J. Biomed. Mater. Res.*, **67A**, 1139 (2003).
24. Z. Cheng and S. H. Teoh, *Biomaterials*, **25**, 1991 (2004).
25. C. Elvira, F. Yi, M. C. Azevedo, L. Rebouta, A. M. Cunha, J. S. Roman, and R. Reis, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **14**, 187 (2003).
26. I. Bisson, M. Kosinshi, S. Ruault, B. Gupta, J. Hilborn, F. Wurm, and P. Frey, *Biomaterials*, **23**, 3149 (2002).
27. B. Gupta, J. G. Hilborn, I. Bisson, and P. Frey, *J. Appl. Polym. Sci.*, **81**, 2993 (2001).
28. Y. M. Ju, K. Park, K. -D. Ahn, J. -W. Rhie, and D. K. Han, *Biomaterials*, submitted (2006).
29. H. J. Jung, K. Park, K. -D. Ahn, D. J. Ahn, and D. K. Han, *Biomacromolecules*, submitted (2006).
30. H. S. Yang, K. -D. Ahn, and D. K. Han, *Biomater. Res.*, **8**, 135 (2004).
31. H. J. Jung, K. -D. Ahn, and D. K. Han, *Macromol. Res.*, **13**, 446 (2005).
32. S. Sano, K. Kato, and Y. Ikada, *Biomaterials*, **14**, 817 (1993).
33. D. K. Han and J. A. Hubbell, *Macromolecules*, **30**, 6077 (1997).
34. J. H. Lee, H. W. Jung, I. -K. Kang, and H. B. Lee, *Biomaterials*, **15**, 705 (1994).
35. G. Khang, S. J. Lee, J. H. Jeon, J. H. Lee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **24**, 869 (2000).