

초임계 유체 공정에 의한 다공성 스캐폴더와 연골세포(chondrocytes) 배양 기술

University of Liverpool
Research Fellow, 이준영

1. 개론

본 연구는 기공 구조의 제어 및 초임계 유체와 같은 친환경 용매를 이용하는 방법과 기공도에 따른 소재의 특성을 분석하고 연골세포의 도입 및 성장에 있어서 고분자 지지체로의 응용에 대한 연구이다. 현재 S.M. Howdle 그룹은 영국 노팅험대학에서 이와 관련된 연구를 활발하게 진행하고 있다.

본 연구에 사용된 구체적 소재로는 폴리(에틸메타크릴레이트)/(테트라 하이드로퍼피릴 메타크릴레이트) (PEMA/THFMA) 을 이용하며 연골세포의 도입 및 성장을 위하여 *in vivo* 및 *in vitro* 테스트가 병행되어졌다. 특히 PEMA/THFMA 소재는 초임계 이산화탄소에 의하여 포밍 되어졌으며, 57 %의 열린기공 형태로 82 %의 다공도를 갖고 있다. 기공의 크기는 약 100 μm 이며, 제조된 기공소재의 표면 또는 벌크 소재의 표면에 연골세포를 도입하여 세포의 성장과 모폴로지 등을 비교 연구하였다. 본 연구는 PEMA/THFMA 다공성 소재가 연골세포 성장 지지체로서 우수한 능력을 지니고 있음을 시사하고 있다.

2. PEMA/THFMA 다공성 스캐폴더

일단 PEMA/THFMA 지지체는 초임계 이산화탄소에서 포밍 공정을 거쳐서 불투명한 디스크 형태의 스캐폴더를 얻을 수 있다. 이때 디스크의 부피는 약 4.5 배 가량 증가하며, 유리질의 불투명한 외형은 흰색으로 변화된다. 또한 포밍 후 샘플은 3

부분으로 명확하게 보여지는데, 외부쪽의 표면영역과 기공영역, 그리고 디스크 중앙의 유리질 영역을 볼 수 있다. 이때 초임계 이산화탄소에서 충분한 시간 동안 포화되었는지를 비교할 수 있도록, 제조된 PEMA/THFMA 샘플의 유리질 코어 부분을 백분율로 표시하였다. 즉, 일정한 온도와 압력의 초임계 이산화탄소에 대한 노출 시간의 증가는 샘플 속으로 좀 더 큰 확산이 이루어지며 이로 인해 유리질 코어 부분의 영역이 감소하게 된다 (Fig. 1). 본 연구에서는 초임계 이산화탄소에 대한 노출 시간이 8 시간인 경우에 샘플의 모든 영역에 이산화탄소가 확산 및 침투 됨을 알 수 있다.

제조된 PEMA/THFMA 의 SEM 분석에서는 외부 표면 영역은 기공이 형성되지 않았음을 보여준다 (Fig. 2a). 이때 공정 압력을 증가시키면 표면 영역의 두께는 감소하며 기공의 크기도 감소됨을 알 수 있다. 이는 PMMA 소재의 연구에서 Goel 과 Beckman [1], Polystyrene의 연구에서는 Arora 그룹 [2] 에 의해 밝혀진 바 있다.

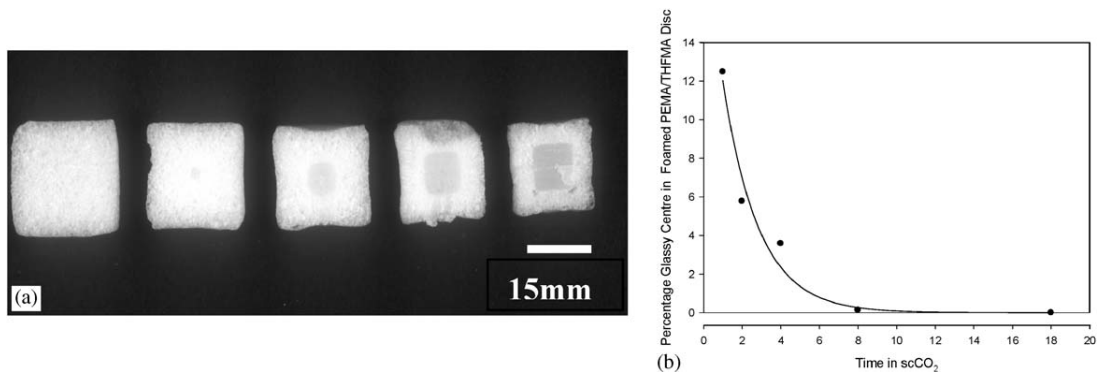


Fig. 1. (a) Differences in swelling sizes that occurred with increasing scCO₂ exposure. Left to right, foams that were saturated for 18, 8, 4, 2 and 1 h. (b) Decrease in the volume of the glassy centre with increased diffusion of scCO₂.

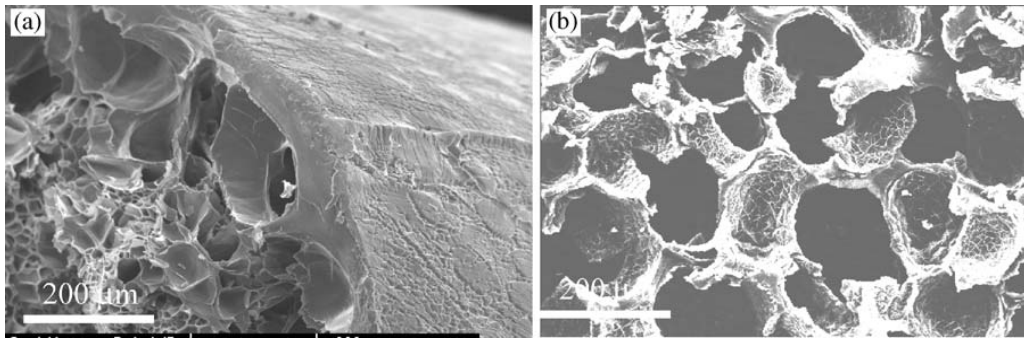


Fig. 2. (a) SEM of the foamed PEMA/THFMA disc showing the non-porous outer skin. (b) SEM of one of the foams following removal of the outer skin.

본 연구에서는 제조된 샘플의 표면 영역을 제거한 후에 세포배양 재료로 이용하였다. 기공의 구조 및 크기는 SEM 측정에 의해 대략 100 μm 정도이며, 최고 200 μm 까지 형성됨을 알 수 있다 (Fig. 2b). 특히, Mercury intrusion porosimeter 의 측정에 의하면 35 μm 의 평균 기공 분포를 보여준다 (Fig. 3a). 이러한 두 방법에 의해 평균 기공 크기가 서로 다르게 나타나는데, 그 이유는 porosimeter 는 열린 기공의 크기를 측정하며, 그 안쪽 기공의 실질적인 크기보다는 작기 때문이다. Fig. 3b 에서 알 수 있듯이 수많은 작은 기공들이 (20 μm 이하) porosimeter 에 의해 측정될 수 있다. 결론적으로 초임계 이산화탄소를 이용하는 포밍 공정에 의해 열린 기공 형태의 다공성 PEMA/THFMA 디스크를 얻을 수 있다.

Mooney 그룹은[3] 93 % 까지 기공 함량을 가지며, 100 μm 의 기공 크기를 보이는 다공성 poly(lactide-co-glycolide) 를 제조하였다. 그러나 얻어진 재료는 기공들 사이에 단지 10-30 % 만이 서로 연결된 구조를 보이고 있다. 그래서 대안으로 그들은 gas foaming 과 salt leaching 방법을 동시에 사용하여 이를 해결하려고 하였다[4]. 그러므로 본 고에서는 salt leaching과 같은 방법을 사용하지 않으면서 높은 상호 연결성을 갖는 기공 형성 가능성에 대하여 설명하고자 한다.

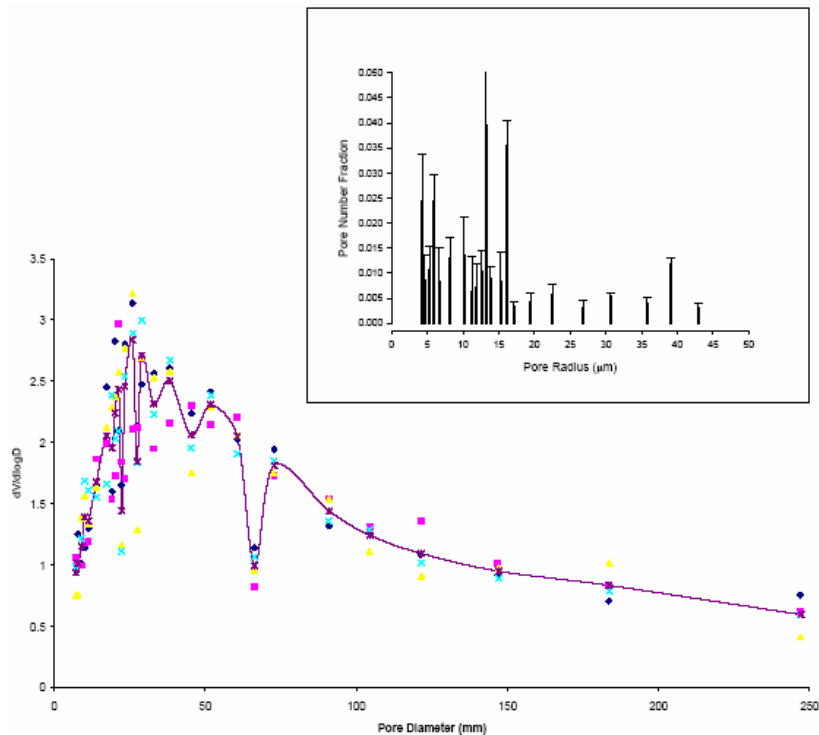


Fig. 3. Pore distribution obtained by mercury intrusion porosimeter of the PEMA/THFMA foams. Solid line shows the average for all points ($n = 4$). Inset shows the fraction of pores of a given radius and demonstrates the high incidence of smaller pores in the sample.

3. 연골세포의 성장 및 배양

3.1. 배양 세포의 모폴로지

초기에 **thermanox** 디스크 위에서 연골세포의 성장은 구형의 모폴로지를 보여준다. 보통 세포성장 2 일 이내에 섬유모세포의 형태로 전 영역에 확산되어진다. 3 일째까지 세포의 확산은 이루어지며, 4 일째에 다층 구조로 세포가 성장하게 된다. 이러한 세포의 성장을 본 연구에서 얻어진 PEMA/THFMA 다공성 고분자와 벌크 소재에서 시행하였으며, 2 일, 4 일, 8 일 후에 각각 SEM 을 통하여 모폴로지를 분석하였다. 셀 시딩 후 연골세포의 성장은 두 소재에서 모두 초기 4 일간은 서로 유사한 모폴로지를 보여주는데, 이때 **thermanox** 디스크 위에서 세포성장 보다 더 길고, 구형의 모폴로지

형태로 세포는 성장한다. 여기에 벌크 고분자 표면 위에서 성장한 연골세포는 그것의 둥근 라운드 모폴로지가 스핀들 형태로 변형된다 (Figs. 4a, b). Sawtell [5] 은 모폴로지의 변형 이유로 지지체의 하부쪽에 접촉할 수 있는 능력이 미흡하기 때문이라고 설명하고 있다.

8 일 후 벌크 고분자 위에서 세포는 좀 더 섬유모세포의 형태로 변화되어지고, 그것들의 둥근 모양도 변형되며, 또한 벌크 고분자 표면 위에 전체를 뒤덮으며 성장하게 된다 (Fig. 4c). 반면 다공성 고분자 위에서는 기공 내부에 연골세포가 둥근 형태를 유지하면서 성장하게 된다 (Fig. 4d). Wyre 와 Downes [6]는 벌크형태의 PEMA/THFMA 는 연골세포의 성장 시 *thermanox* 위에서 보다 더 긴 형태의 세포로 성장함을 보여주었다. 그러나 다공성 스캐폴드 위에서 연골세포의 성장은 기공 주변에 또는 기공 내부에 둥근 모폴로지를 잃어가면서 성장하게 된다 (Fig. 4d). 이런 결과는 연골세포의 성장 및 확산에 도움을 줄 수 있는 다공성 모폴로지 환경을 주며, 영양분의 공급 또한 원활하게 할 수 있다. 즉, 세포 감응의 차이점은 세포의 물리적 자극에 의한 적절한 압축과 응력을 제공할 수 있는 다공성 소재의 기공 곡면이 존재함으로써 설명될 수 있다[7,8].

3.2. 세포의 신진대사 거동

연골세포의 신진대사 거동은 14 일간의 연구를 진행하여 얻어졌으며, *thermanox* 위에서 성장한 세포의 경우 가장 강한 활성을 보여준다 (Fig. 5a). 즉, 초기 2-6 일간은 신진대사 거동이 급격하게 증가하며, 6-14 일간은 평형상태에 도달하게 된다. 한편, 벌크 고분자 위에 시딩된 연골세포는 다공성 고분자 위에서 보다 더욱 큰 신진대사를 보여준다. 그 활성은 초기에 급격히 증가하다가 6 일 후 부터는 평형상태에 도달하게 된다. 이에 반해 다공성 지지체 위에서의 신진대사 거동은 초기에는 매우 느리다. 그러나 6 일 후 부터는 좀더 빠르게 진행된다. 즉, 연골세포의 활성은 14일 이후에는 커다란 변화가 없으나, 그때까지 벌크 지지체에서 보다는 좀더 느리게 진행된다.

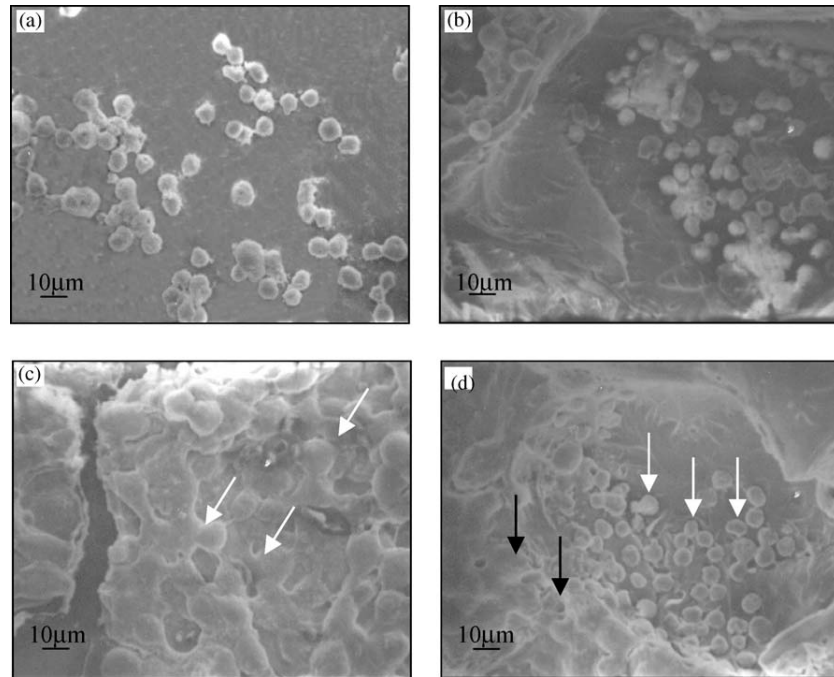


Fig. 4. Chondrocytes growing on the unfoamed (left) and foamed (right) PEMA/THFMA substrates. a: Chondrocytes on the unfoamed polymer discs at day 4, b: Chondrocytes on the foamed polymer discs, at day 4. c: Chondrocytes on the unfoamed polymer discs at day 8. Spread cells on flat surface (white arrows). d: Chondrocytes on foamed polymer discs at day 8. Spread cells on flat surface above pore (black arrows). Round cells in pore (white arrow).

이러한 결과는 샘플에 DNA가 도입되어졌을 때에도 *thermanox* 위에서의 연골세포는 매우 커다란 신진대사 거동을 보여준다 (Fig. 5b). 또한 14 일간의 시간동안 그 활성/DNA는 모두 일정한 값을 보여준다. 벌크 지지체 위에서 연골세포의 활성은 14 일의 시간동안 감소되어진다. 다공성 지지체 위에서 성장한 연골세포의 활성/DNA는 2-6 일 사이에는 감소하나, 6-14 일 사이에는 커다란 변화가 없다.

시간에 따른세포의 신진대사 거동은 번식 능력에서 서로 다르기 때문에 여러 선행 연구에서 [5] 증가되고 있음이 알려졌다 (Fig. 5). 이러한 결과는 DNA 함량에 의하여 표준화시켰을 때 DNA의 단위당 그 활성의 감소가 는 의 증가는 연골세포 또는 섬유모세포의 활성에 따른 차이점에 기인한다고 사료된다.

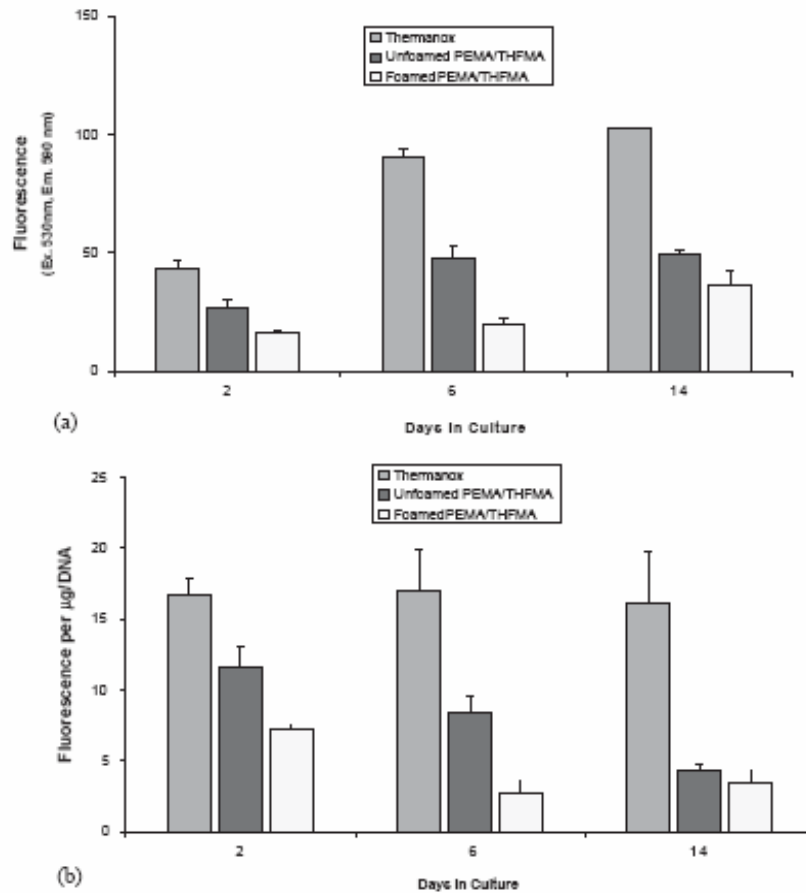


Fig. 5. (a) Change in metabolic activities of chondrocytes over a 14-day period using the Alamar Blue assay. (b) Change in the metabolic activity of chondrocytes, normalised to the amount of DNA present. Each point shows the mean \pm standard error $n = 3$: Data demonstrate the increased metabolic activity of the de-differentiated chondrocytes.

섬유모세포는 일반적으로 두가지 형태의 세포 신진대사 거동에서 좀 더 크게 보여준다. 즉, DNA의 표준화 또는 표준화하는 것 없이, PEMA/THFMA 지지체에서 보다는 thermanox 표면 위에서 좀 더 커다란 세포의 신진대사 거동을 보여주는데,

이는 섬유모세포의 형상에 의해 영향을 받기 때문이다. 이러한 결과는 앞에서 밝혀진 세포의 모폴로지에서 확인할 수 있다. 다공성 지지체 위에서 14 일 동안 진행된 연골세포의 활성화는 가장 낮은 값을 갖는데, 벌크 지지체에서 값과는 커다란 차이를 보여주지 않는다.

4. 결론

이산화탄소는 고분자 스캐폴더와 같은 다공성 소재를 제조하는데, 친환경 용매로 사용될 수 있다. 즉, 이산화탄소는 독성이 없으며 고분자 매트릭스에 잔류 용매를 남기지 않는다. 이에 본 연구에서는 초임계 이산화탄소를 이용하여 다공성 PEMA/THFMA 스캐폴더를 제조하는 방법과 연골세포의 배양에 의한 다양한 결과들을 소개하였다.

본 고에서는 기공이 없는 PEMA/THFMA 지지체의 경우, *thermanox* 시스템과 비교하여 더 긴 형태의 연골세포로 성장됨을 확인하였다 [6,9,10]. 또한 지지체의 모폴로지의 변화가 세포의 성장에 중요한 환경을 제공할 수 있음을 시사하였다. 이것은 유리질의 연골 치료용 조직으로 사용될 수 있으며 좀더 기공도가 높은 스캐폴더의 제조에 의해 세포의 능력을 극대화시킬 수 있다는 점이 중요하다.

스캐폴더와 원하는 다른 물질과 결합시키는 방법은 기공도 또는 내부 기공의 모양과 같은 구조적 특성에 의해 크게 영향을 받으며, 세포를 위한 영양분의 공급을 위한 구조 및 우수한 기계적 물성을 제공하여야 한다 [11]. 본 연구에서 소개되어진 다공성 스캐폴더는 우수한 연골세포 감응 반응을 보여주고 있다.

6. 참고문헌

- [1] Goel SK, Beckman EJ., *Polym Eng Sci* 1994;34:1148–56.
- [2] Arora KA, Lesser AJ, McCarthy TJ., *Macromolecules* 1998;31:4614–20.
- [3] Mooney DJ, Baldwin DF, Suh NP, Vacanti JP, Langer R., *Biomaterials* 1996;17:1417–22.
- [4] Harris LD, Kim B-S, Mooney DJ., *J Biomed Mater Res* 1998;42:396–402.

- [5] Sawtell RM, Downes S, Patel MP, Clarke RL, Braden M., J Mater Sci: Mater Med 1997;8: 667–74.
- [6] Wyre RM, Downes S., Biomaterials 2000;21:335–43.
- [7] Boyan BD, Humbert TW, Dean DD, Schwartz Z., Biomaterials 1996;17:137–46.
- [8] Ingber DE., J Cell Sci 1993;104: 613–27.
- [9] Sawtell RM, Downes S, Kayser MV., J Mater Sci: Mater Med 1995;6:676–9.
- [10] Sawtell RM, Kayser MV, Downes S., Cells Mater 1995;5:63–71.
- [11] Taboas JM, Maddox RD, Krebsbach PH, Hollister SJ., Biomaterials 2003;24:181–94.