

PCL/TiO₂ Nanoparticle 3차원 지지체 제조 및 특성 평가

김정호* · 이옥주* · Faheem A. Sheikh* · 주형우* · 문보미* · 박현정* · 박찬흠*,**,†

*한림대학교 나노바이오재생의학 연구소, **한림대학교 춘천성심병원 이비인후과
(2013년 9월 10일 접수, 2013년 10월 17일 수정, 2013년 11월 6일 채택)

Fabrication and Characterization of PCL/TiO₂ Nanoparticle 3D Scaffold

Jung-Ho Kim*, Ok Joo Lee*, Faheem A. Sheikh*, Hyung Woo Ju*, Bo Mi Moon*,
Hyun Jung Park*, and Chan Hum Park*,**,†

*Nano-Bio Regenerative Medical Institute, Hallym University, 1 Hallymidaehak-gil, Chuncheon, Gangwon-do 200-702, Korea

**Departments of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Chuncheon Sacred Heart Hospital, School of Medicine,
Hallym University, 77 Sakju-ro, Chuncheon, Gangwon-do 200-704, Korea

(Received September 10, 2013; Revised October 17, 2013; Accepted November 6, 2013)

초록: Polycaprolactone(PCL)은 생분해성 고분자로 인장강도, 신장률, 충격강도 등의 기계적 물성이 우수하다. TiO₂ (titanium dioxide) nanoparticle은 친수성으로 밀도가 높고 생체적합성이 우수하다. 본 연구에서는 PCL과 TiO₂(titanium dioxide) nanoparticle을 이용하여 salt-leaching방법으로 3차원 다공성 지지체를 제작하였다. 제작한 지지체를 FE-SEM, FTIR, TGA, 압축강도 측정 등을 통해 물성을 분석하였다. TiO₂ nanoparticle에 의해 물흡수도와 팽윤도는 감소하였으나 압축강도는 증가하였다. CCK-8 assay를 통해 세포의 증식률을 확인한 결과, TiO₂ nanoparticle에 의한 세포 독성은 없는 것으로 확인되었다. 이러한 연구결과는 PCL/TiO₂ nanoparticle 지지체의 생체재료로 사용가능성을 제시하였다.

Abstract: Polycaprolactone (PCL) is a synthetic biodegradable polymer with excellent mechanical properties. TiO₂ (titanium dioxide) has a hydrophilic, high density and excellent biocompatibility. In this work, we produced three-dimensional porous scaffolds with PCL and TiO₂ nanoparticles using a salt-leaching method. Physical properties of the scaffolds were analyzed by FE-SEM, FTIR, TGA and compressive strength. Interestingly, the addition of TiO₂ nanoparticles decreased the water absorption and swelling ratio of the porous scaffolds. However, the compressive strength was increased by TiO₂. CCK-8 assay, which is generally used for the analysis of cell growth, shows that TiO₂ nanoparticles have no cytotoxicity. Taken together, we suggest that the PCL/TiO₂-scaffold can be used for biomedical applications.

Keywords: PCL, TiO₂ nanoparticle, scaffold, salt-leaching.

서 론

조직공학 분야에서는 다양한 생체재료를 이용하여 여러 모양의 지지체를 다양한 방법으로 개발해 왔다.¹⁻³ 특히 단순한 모양 제작을 넘어 세포 및 성장인자들을 지지체에 이식함으로써 생체 내 면역반응을 최소화하고 다양한 조직으로서 재생되도록 하는 연구가 활발히 진행되고 있다.⁴⁻⁶ 조직재생을 위해 이용되는 이상적인 지지체는 체내하중을 견뎌내야 할 충분한 기계적 강도, 세포친화적인 표면 화학적 성질, 세포의 접착과 분화가 원활히 이루어지게 하며, 상호연결성이 우수한 공극 구조를 지녀야 한다. 다양한 지지체 모양 중 3차원

다공성 지지체는 세포 부착이 용이하여 세포증식률이 공극이 없는 지지체에 비해 높다.⁷ 이러한 지지체를 만들기 위한 조직공학용 재료에는 천연고분자, 합성고분자, 세라믹 등이 있다.^{8,9} 천연고분자에는 실크, 콜라겐, 키토산 등이 있으며, 세포적합성이 매우 뛰어나다.¹⁰⁻¹² 하지만, 다른 고분자들에 비해 기계적인 특성이 약하고, 재료의 가격이 비싼 단점을 가지고 있다.¹³ 합성고분자들은 천연고분자에 비해 미흡한 세포적합성을 가지고 있지만, 가공성이 좋고 기계적 특성이 좋은 장점을 가지고 있다.^{14,15} Polycaprolactone(PCL)은 소수성이며 생체적합성을 가진 생분해성 고분자이다. 상처 드레싱, 조직공학 등의 생명 공학 분야에 응용되고 있으며 미국 FDA 승인을 받은 물질이다. 최근에는 PCL의 생체적합성과 기계적 강도를 이용해서 실크 피브로인의 물성을 보완하기 위한 연구도 진행되었다.

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: hlpch@paran.com

TiO₂(titanium dioxide) nanoparticle는 anti-microbial에 뛰어나며, 밀도가 높아 강도가 강하다는 특성을 가지고 있다.^{16,17} 게다가, 친수성이며, 세포의 증식률 또한 증가시켜준다고 알려져 있다.^{18,19} 본 연구에서는 PCL과 TiO₂ nanoparticle을 사용하여 salt-leaching 방법으로 3차원 다공성 지지체를 제작하였다. PCL 10%에 TiO₂ nanoparticle을 2, 4%로 지지체를 제작하였다. 제작된 지지체의 기계적 강도를 평가하였고, *in vitro* 세포 적합성을 확인하였다. 그 결과, 기계적 강도 및 세포적 합성이 향상되었다. 이는 제작된 지지체가 향후 생체재료로 사용 가능할 것이다.

실 험

시료 및 시약. Polycaprolactone(PCL)은 평균분자량(M_n) 70000~90000을 Aldrich(USA)사에서 구입하여 사용했으며, 분자량(M_w) 284.22 g/mol, titaniume(IV) isopropoxide를 Aldrich(USA)사에서 구입하였다. TiO₂ nanoparticle은 황산법을 이용해 제작하였다. 세포 증식률 측정은 NIH3T3 세포를 이용하여, Cell Counting Kit-8(Enzo Life Sciences)를 사용해 측정하였다. 세포배양에 사용된 배지는 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM, Welgene, USA)에 10% fetal bovine serum(FBS, GIBCO, USA)와 1% penicillin-streptomycin(P/S, GIBCO, USA)를 첨가해 사용하였다. 세포분열을 위해서 trypsin-EDTA(GIBCO, USA)와 phosphate buffered saline(PBS, GIBCO, USA)를 사용하였다.

지지체 제조. PCL을 *N,N*-dimethylformamide(DMF)에 12시간 동안 교반기를 이용해서 10% 농도로 용해시켰다. 만들 어진 PCL 용액에 TiO₂ nanoparticle을 2, 4%로 각각 섞어주었다. 각각의 용액을 결정의 크기가 300 μm인 NaCl(DAEJUNG)이 담겨 있는 틀 위에 부어준 후, 용액 위에 다시 NaCl 150 g을 부어준 후 상온에서 72시간 동안 침지시킨 후(6시간 간격으로 증류수를 교환) 동결건조기를 사용하여 완전히 건조시켜 지지체를 얻었다.

TiO₂ Nanoparticle 제조. DMF(dimethylformamide) 45 g과 polyvinyl acetate 5 g을 상온에서 12시간 동안 교반시켜 준 용액과 titaniume(IV) isopropoxide를 1:2 비율로 다시 혼합한 후, 80 °C oven에서 12시간 건조시켰다. 건조된 혼합물을 미세한 파우더 형태로 분쇄 후, electric muffle furance을 사용하여 700 °C로 한 시간 동안 가열하여 nanoparticle을 얻었다.

Scanning Electron Microscope(SEM). 제조된 지지체의 구조를 확인하기 위하여 FE-SEM(SUPRA55V VP-FESEM, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 관찰하였다. FE-SEM의 관찰은 기초과학연구원(춘천)에서 이루어졌다.

Energy Dispersive X-ray Spectrometer(EDS). 제조된 지지체의 성분을 분석하기 위해 에너지 분산형 X선 형광분

석기(XFlash Detector 5010, Bruker Nano)를 이용하여 분석하였다. 에너지 분산형 X선 형광분석기 사용은 기초과학연구원(춘천)에서 이루어졌다.

Fourier Transform Infrared Spectroscopy(FTIR). 제조된 지지체의 구조변화를 측정하기 위해 FTIR(FT-3000, BIO-RAD, USA)을 사용하였고, 4000-500 cm⁻¹ 파장범위에서 분석하였다.

지지체 물리적 특성. 수분흡수율: 제조된 지지체의 수분흡수율을 확인하기 위해 식 (1)과 같은 방법으로 측정하였다. 흡수된 지지체의 무게(W_s)와 건조된 지지체의 무게(W_d) 차를 흡수된 지지체의 무게(W_s)로 나누어 백분율로 나타냈다.

$$\text{Water uptake}(\%) = \frac{W_s - W_d}{W_s} \times 100 \quad (1)$$

공극률: 제조된 지지체 내에 공극으로 있는 부분이 전체 부피에서 차지하고 있는 비율을 확인하기 위해 식 (2)와 같은 방법으로 측정하였다. 처음 증류수의 부피(V_1)와 지지체 추가 후 증가한 증류수의 부피(V_2) 그리고 지지체를 뺀 후 줄어든 증류수의 부피(V_3)를 이용하여 백분율로 나타냈다.

$$\text{Porosity}(\%) = \frac{V_1 - V_3}{V_2 - V_3} \times 100 \quad (2)$$

팽윤도: 제조된 지지체가 일정 시간 동안 용액 속에 침지되었을 때의 용적변화율을 확인하기 위해 식 (3)과 같은 방법으로 측정하였다. 건조된 지지체의 무게(W_d)와 팽윤된 지지체의 무게(W_s) 차를 건조된 지지체의 무게(W_d)로 나누어 나타냈다.

$$\text{Swelling ratio}(\%) = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100 \quad (3)$$

압축강도. 제조된 지지체의 기계적 강도를 측정하기 위하여 범용 테스트 기계(QM100S, Qmesys, Korea)를 이용하여 측정하였다. 상온에서 dumb-bell 모양의 compressive tester를 이용하여 8 kgf의 힘으로 측정하였다.

Thermogravimetric Analysis(TGA). 제조된 지지체가 온도 변화에 따른 질량변화를 살펴보기 위하여 TGA(SDT Q600, TA instruments, USA)를 이용하여 질소 기류 하에서 10 °C/min의 승온 속도로 50~600 °C의 범위 내에서 열중량 분석을 행하였다.

세포 증식률 실험. 제조된 지지체에서의 세포 성장을 확인하기 CCK-8 assay를 사용하여 측정하였다. 실험에 사용된 세포는 NIH3T3 섬유아 세포를 사용하였고, 각 지지체에 5×10⁴ cell/mL로 퍼종하였다. 1, 3, 7일 각각에 CCK-8 용액을 배양액의 1/10씩 넣은 다음 2시간 동안 37 °C 인큐베이터에서 배양한 후 1.5 mL 튜브에 지지체와 용액을 옮긴 후 초음파 세척기로 5분 용해하였다. 용해된 용액을 96 well에

100 μL 씩 분주하고 ELISA 플레이트리더(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 부착 모풀로지 실험(SEM). NIH3T3 섬유아세포의 부착양상과 모풀로지의 변화를 확인하고자 세포를 배양한 지지체를 4% glutaraldehyde 용액에 고정한 다음 완충액(0.1 M cacodylate buffer pH 7.4)으로 세정하였다. 50, 60, 70, 80, 90% 에탄올 용액에서 탈수시켰으며, 100% 에탄올에서는 두 번 탈수시킨 다음 iso-amyl acetate 용액으로 치환하였다. 각각의 샘플을 금속판에 카본테이프를 이용하여 고정시킨 후 Au-PdRh 코팅 후 주사전자현미경(S-3500, Hitachi, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

결과 및 토론

FE-SEM. Salt-leaching에 의해 만들어진 각각의 지지체의 단면을 FE-SEM을 이용하여 확인하였다(Figure 1). 그 결과 만들어진 지지체에 NaCl 결정 형태로 300 μm 크기의 공극이 형성되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 하지만, TiO_2 nanoparticle의 농도에 의한 공극 변화는 관찰되지 않았다.

EDS. 제조된 지지체의 정성 및 정량분석을 하기 위해 EDS(energy dispersive spectroscopy)를 이용하여 확인하였다(Figure 2). 순수 PCL 지지체에서는 carbon, oxygen, 그리고 코팅성분인 palladium, gold만 검출되는 것에 반해 TiO_2 nanoparticle이 포함된 지지체에서는 TiO_2 nanoparticle의 농도가 증가함에 따라 검출되는 TiO_2 nanoparticle 농도의 양 또한 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

FTIR. 제조된 지지체의 구조적 변화를 확인하기 위해 FTIR을 사용하였고, FTIR의 spectra 범위는 4000-500 cm^{-1} 에서 나타내었다(Figure 3). 순수 PCL 지지체에서는 2945 cm^{-1} (asymmetric CH_2 stretching), 2866 cm^{-1} (symmetric CH_2 stretching), 1720 cm^{-1} (carbonyl stretching), 1293 cm^{-1} (C-O and C-C stretching in the crystalline phase), 그리고 1238 cm^{-1} (asymmetric COC stretching)에서 나타내었다. TiO_2 nanoparticle이 혼합된 지지체에서는 각각 1165, 731 cm^{-1} 에서 검출되었다. 이는 TiO_2 nanoparticle의 함량에는 영향을 받지 않고 지지체를 형성하고 있음을 나타낸다.

물리적 특성 확인. 제조된 지지체의 물리적 특성을 확인하-

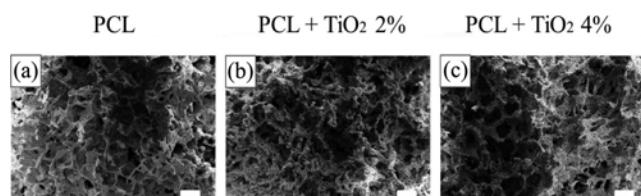
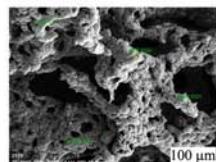
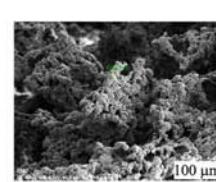
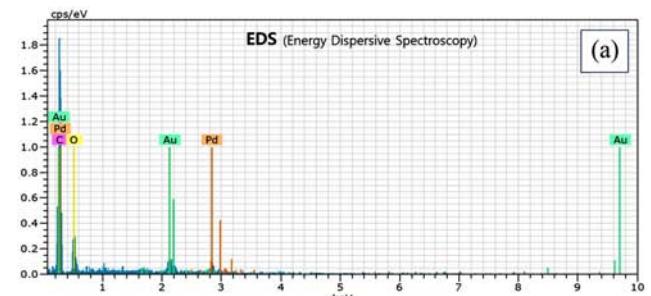


Figure 1. FE-SEM images of scaffolds (scale bars: 300 μm).

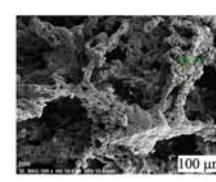
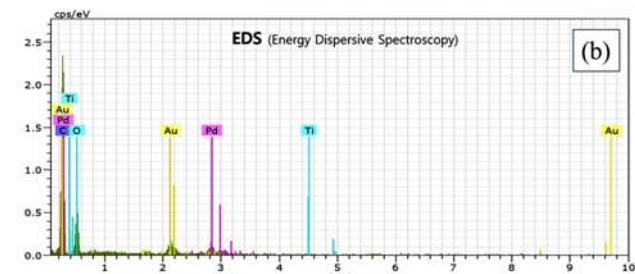
기 위하여, 공溽률, 수분흡수력 그리고 팽윤도를 측정하였다(Figure 4). 공溽률의 경우 제조된 지지체에서 모두 크게 차이 나지 않았지만 수분흡수력의 경우는 2% TiO_2 nanoparticle 농도에 비해 4% TiO_2 nanoparticle에서 줄어들었다. 하지만,



Element	Weight %	Atomic %
Carbon	53.19	78.40
Oxygen	16.08	17.60
Palladium	13.57	2.26
Gold	17.16	1.54
Totals	100.00	100.00



Element	Weight %	Atomic %
Carbon	44.41	72.57
Oxygen	17.09	21.96
Palladium	17.61	3.25
Gold	19.37	1.93
Titanium	0.70	0.29
Totals	100.00	100.00



Element	Weight %	Atomic %
Carbon	43.62	81.41
Oxygen	7.29	10.21
Palladium	22.09	4.65
Gold	25.17	2.86
Titanium	1.83	0.86
Totals	100.00	100.00

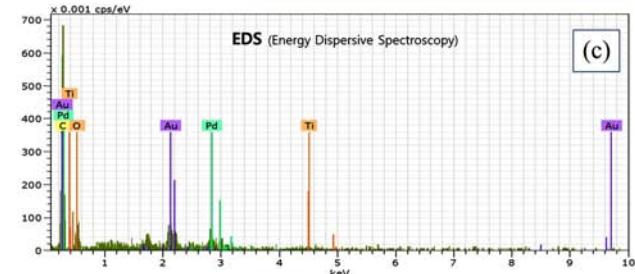


Figure 2. EDX patterns of PCL and TiO_2 nanoparticle.

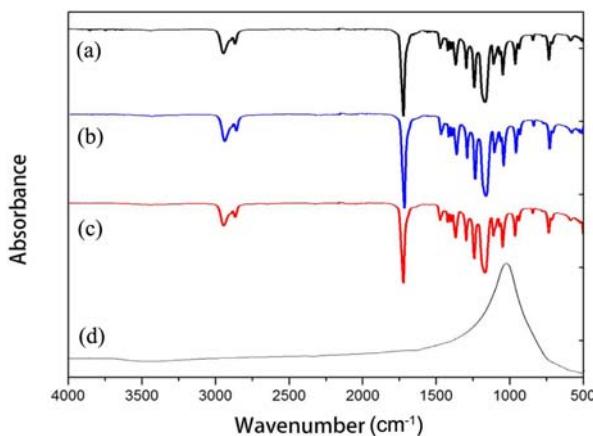


Figure 3. FTIR spectra of PCL and TiO₂ nanoparticles: (a) PCL; (b) PCL+TiO₂ 2%; (c) PCL+TiO₂ 4%; (d) TiO₂.

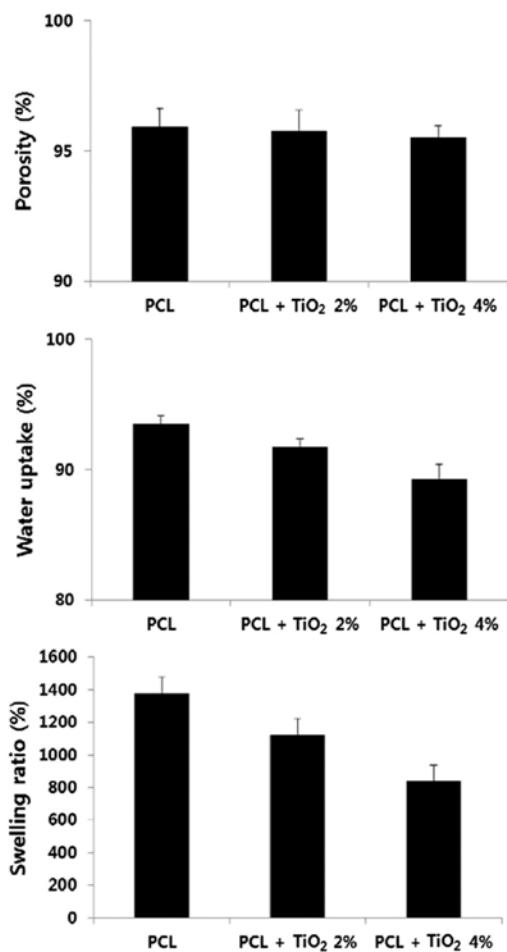


Figure 4. Physical properties of PCL/ TiO₂ nanoparticle scaffolds.

2% TiO₂ nanoparticle 지지체와 4% TiO₂ nanoparticle 지지체의 결과값은 각각 91.7와 89.0%로 높게 나타내었다. 팽윤도도 마찬가지로, TiO₂ nanoparticle의 농도가 높아질수록 줄어들었

Table 1. Effect of PCL Incorporation on the Porosity, Water Uptake and Swelling Property of TiO₂ Scaffold

Sample	Silk	Silk+TiO ₂ 2%	Silk+TiO ₂ 4%
Porosity (%)	95.9±0.6	95.7±0.8	95.5±0.4
Water uptake (%)	93.5±0.6	91.7±0.6	89.2±1.1
Swelling ratio (%)	1380±98	1120±97	840±95

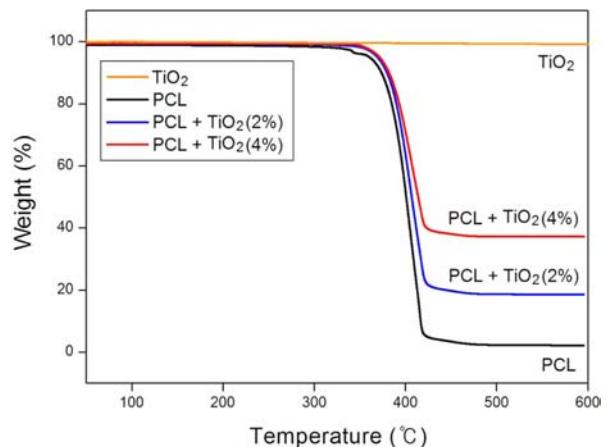


Figure 5. TGA patterns of PCL and TiO₂ nanoparticle.

다(Table 1). 이 같은 결과는 TiO₂ nanoparticle의 팽화력이 거의 없기 때문에 물을 흡수하지 못해 수분흡수력과 팽윤도가 낮은 것으로 보인다.

TGA. 온도에 따른 질량의 변화를 통해 제조된 지지체를 분석하였다(Figure 5). 그 결과, 제조된 지지체의 질량감소는 333 °C에서 시작되었으며, 427 °C에서 멈추었다. PCL 지지체의 경우 무게감소는 4.548 mg^o이고, 97.84%의 질량손실률을 나타내었다. PCL/TiO₂ nanoparticle 2%의 경우 무게감소는 5.628 mg^o이고 81.41%의 질량손실률을 나타내었다. PCL/TiO₂ nanoparticle 4%의 경우 무게감소는 4.375 mg^o이고 62.76%의 질량손실률을 나타내었다. PCL과 TiO₂ nanoparticle 모두 높은 온도에서 흡열피크가 나타났기 때문에 PCL/TiO₂ nanoparticle 지지체를 생체 내에 이식하여도 열적으로 안정할 것으로 생각된다.

압축강도. 제조된 지지체의 강도를 측정하기 위해 압축강도 측정기를 사용하여 확인하였다(Figure 6). 순수 PCL 지지체보다 TiO₂ nanoparticle^o 혼합된 지지체가 더 높은 강도를 나타내는 것을 확인하였다. TiO₂ nanoparticle 농도가 높을수록 강도 또한 높아졌다. 이는 밀도가 강한 TiO₂ nanoparticle이 3차원 공극구조 형성 시 공극구조를 더욱 단단하게 만들기 때문인 것으로 사료된다.

세포증식률. CCK-8 assay를 사용하여 세포증식률을 측정하였다(Figure 7). 그 결과 순수 PCL 지지체보다 TiO₂

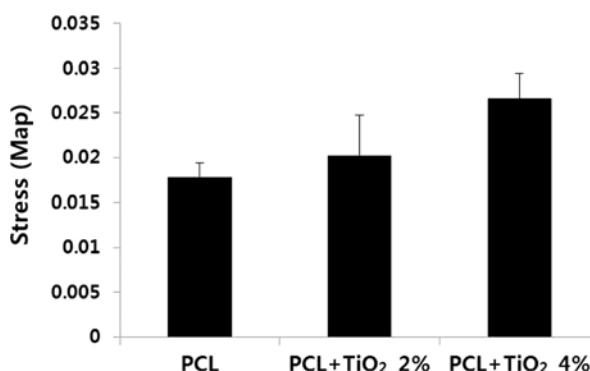


Figure 6. Compressive strength of PCL and TiO₂ nanoparticle (n=3).

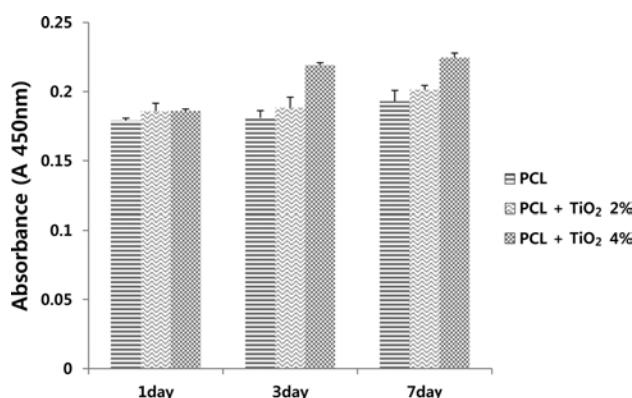


Figure 7. The proliferation situation of NIH3T3 on different scaffolds by CCK-8.

nanoparticle이 혼합된 지지체에서 세포증식률이 증가한 것을 확인하였고, 이러한 결과는 TiO₂ nanoparticle에 의한 세포에 대한 독성이 없는 것을 확인할 수 있다.

세포부착도. 3차원 다공성 지지체의 공극은 지지체 내부로 세포와 필요한 영양분을 이동시키는 역할을 하고 있다. 그렇기 때문에 지지체에 공극이 없거나 크기가 작을 경우 세포의 영양분과 세포자체를 이동시키기 어렵기 때문에 세포증식이 어려운 문제점을 가지고 있다.²⁰ PCL/ TiO₂ nanoparticle 3차원 다공성 지지체에서 NIH3T3 섬유아세포의 부착 및 증식 상태를 FE-SEM을 이용하여 확인해 보았다(Figure 8). 시간이 지날수록 모든 지지체의 세포 부착 및 증식이 증가한 것으로 보인다. 이러한 결과를 볼 때 PCL/ TiO₂ nanoparticle 3차원 다공성 지지체에서의 세포의 부착 및 증식률은 TiO₂ nanoparticle의 영향을 받지 않음을 알 수 있다.

결 론

본 연구에서는 polycaprolactone(PCL)을 사용하여 salt-leaching방법으로 3차원 다공성 지지체를 제작하였고,

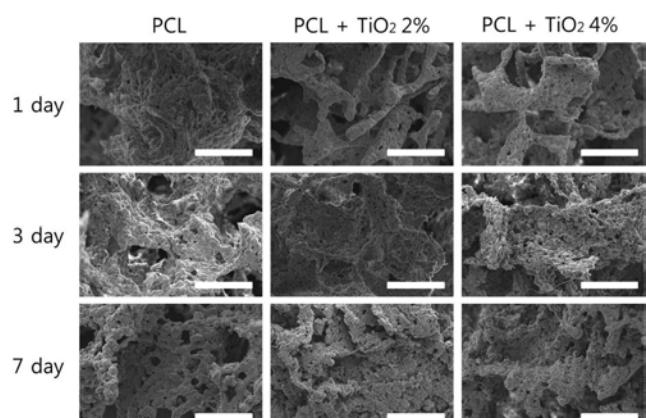


Figure 8. SEM images of cell adhesion on different scaffolds (scale bars: 200 μm).

polycaprolactone(PCL)의 세포적합성과 강도를 높이기 위해 TiO₂ nanoparticle을 사용하였다. 제조된 지지체는 물에 대한 흡수력과 압축강도 실험결과 TiO₂ nanoparticle의 농도가 증가할수록 값은 증가하였다. 세포증식률을 실험한 결과 세포에 대한 독성은 없는 것을 확인하였다. 이와 같이 본 연구에서 제작한 PCL/TiO₂ 지지체의 생체재료로서의 응용 가능성을 확인하였다.

감사의 글: 본 연구는 농촌진흥청의 차세대 바이오그린 21 사업(과제번호: PJ009051062014)과 한림대학교 교비연구비의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- B. P. Chan and K. W. Leong, *Eur. Spine J.*, **17**, S467 (2008).
- T. G. Kim, H. Shin, and D. W. Lim, *Adv. Funct. Mater.*, **22**, 2446 (2012).
- E. Sachlos and J. T. Czernuszka, *Eur. Cell Mater.*, **12**, 29 (2003).
- K. A. Blackwood, N. Bock, T. R. Dargaville and M. A. Woodruff, *Int. J. Polym. Sci.*, **25**, 1 (2012).
- S. Sahoo, L. T. Ang, J. C. H. Goh, and S. L. Toh, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **12**, 1539 (2009).
- J. Leor, Y. Amsalem, and S. Cohen, *Pharmacol. Therapeut.*, **13**, 151 (2005).
- S. C. Owen and M. S. Shoichet, *Wiley Intersci.*, **11**, 1321 (2010).
- B. Dhandayuthapani, Y. Yoshida, T. Maekawa, and D. S. Kumar, *Int. J. Polym. Sci.*, **19**, 1 (2011).
- S. H. Kim, S. H. Kim, and Y. H. Kim, *Polymer Sci. Tech.*, **16**, 468 (2005).
- G. Kumar, J. F. Bristow, P. J. Smith, and G. F. Payne, *Polymer*, **12**, 2157 (2000).
- S. A. Sell, P. S. Wolfe, K. Garg, J. M. McCool, I. A. Rodriguez, and G. L. Bowlin, *Polymers*, **2**, 522 (2010).

12. A. L. Egana and T. Scheibel, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **13**, 155 (2010).
13. A. D. Augst, H. J. Kong, and D. J. Mooney, *Macromol. Biosci.*, **6**, 623 (2006).
14. K. Rezwan, Q. Z. Chen, J. J. Blaker, and A. Ahluwalia, *Biomaterials*, **27**, 3413 (2006).
15. S. A. Goldstein, *J. Biomech.*, **20**, 1055 (1987).
16. M. Haghi, M. Hekmatafshar, M. B. Janipour, S. S. Gholizadeh, M. K. Faraz, F. Sayyadifar, and M. Ghaedi, *Intl. J. Adv. Biotechnol. Res.*, **3**, 621 (2012).
17. Z. Wen, S. Ci, S. Mao, S. Cui, G. Lu, K. Yu, S. Luo, Z. He, and J. Chen, *J. Power Sources*, **7**, 100 (2013).
18. T. Amna, M. S. Hassan, W. S. Shin, H. V. Ba, H. K. Lee, M. S. Khil, and I. H. Hwang, *Colloid Surface B*, **6**, 424 (2012).
19. H. Hu, W. Zhang, Y. Qiao, X. Jiang, X. Liu, and C. Ding, *Acta Biomater.*, **12**, 904 (2011).
20. M. S. Choi, H. D. Han, H. Seong, E. S. Park, S. C. Chi, and B. C. Shin, *J. Korean Chem. Soc.*, **50**, 3 (2006).