전기방사로 제조된 다층 Poly Methyl Methacrylate (PMMA)/ Poly Vinyl Alcohol (PVA) Bone Plate의 생체적합성 평가

곽경아 · 김영희 · Van Viet Thai* · 이병택* · 송호연†

순천향대학교 의과대학 미생물학교실, *순천향대학교 의과대학 의공학교실

Biocompatibility of Multilayer Poly Methyl Methacrylate (PMMA)/ Poly Vinyl Alcohol (PVA) Bone Plate by Electrospinning Method

Kyung-A Kwak, Young Hee Kim, Van Viet Thai*, Byong-Taek Lee* and Ho-Yeon Song†

Department of Microbiology, School of Medicine, Soonchunhyang University

*Department of Biomedical Engineering, School of Medicine, Soonchunhyang University

(2010년 4월 18일 접수 : 2010년 5월 18일 최종수정 : 2010년 6월 7일 채택)

Abstract Multilayer Poly methyl methacrylate (PMMA)/ Poly vinyl alcohol (PVA) bone plates were fabricated using electrospinning and in vitro investigations were carried out for pre-clinical biocompatibility studies. The initial cellular cytotoxicity of the methacrylate (PMMA)/ Poly vinyl alcohol (PVA) bone plates was measured by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay using fibroblast-like L-929 cells. Cellular adhesion and differentiation studies were carried out using osteoblast-like MG-63 cells. As simulated body fluid (SBF) contains the same ionic concentration of body fluid and any bioactive material tends to deposit bone-like apatite on the samples surfaces into the SBF, in vitro bioactivity of the multilayer bone plates were investigated using SBF. We also studied the internal organization and tensile strength of the multilayer PMMA/PVA bone plates using micro-computed topography (μ -CT) and universal testing instrument (UTI, Korea) respectively. The cellular cytotoxicity study with MTT confirmed that the cellular viability was 78 to 90% which indicates good cyto-compatibility. Scanning electron microscopic findings revealed a good attachment and adhesion phenomenon of MG-63 cells onto the surfaces of the samples. Cellular differentiation studies also showed that osteogenic differentiation was switched on in a timely manner and affirmed along with that of the control group. Bone-like apatite formation on the surfaces was confirmed within 14 days of SBF incubation. Initial organizations of the multilayer PMMA/PVA bone plates were characterized as dense and uniform. The tensile strength of the post-pressing electrospun mat was higher than that of the pre-electrospun mat. These results suggest that a multilayer PMMA/PVA bone plate system is biocompatible, bioactive and a very good alternative bone plate system.

Key words electrospinning, bone plate, PMMA, PVA, biocompatibility

1. 서 론

골절된 뼈는 빠르고 안정된 치료를 위해 골절된 부위를 bone plate로 고정하여 치료하고 있다.¹⁾ 초기에는 금속 bone plate를 이용한 연구가 주를 이루어, 강도가 우수하며, 고정이 확실하고, 조직에 대한 반응이 적은 금속 bone plate가 개발되어 사용되고 있다.^{2,4)} 하지만 금속 bone plate는 골절 부위가 유합된 다음 천연골이 받아야 할 하중을 금속 bone plate가 받는 “stress shielding” 현상으로 인해 재골절을 일으키기도 하며 회복을 늦추기도 한다.^{5,6)} 따라서 2차 제거수술이 필수적이고, 금속 bone

plate의 부식 문제가 발견되기도 한다.

Bone plate의 다른 소재로서 세라믹 소재는 생체적합성이 우수하며 부식의 문제가 없고 강도도 좋다는 장점이 있다. 하지만 여러 가지 모양으로의 응용이 어려우며 유연하지 못해 bone plate로서 제한을 받고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 고분자 소재를 적용한 bone plate에 대한 연구가 진행되고 있으며 강도가 우수하면서도 2~3년 내에 생분해 될 수 있는 이상적인 bone plate의 개발이 필요하다.⁷⁻⁹⁾

전기방사는 주로 고분자를 용액에 용해시키거나 직접 녹여 수 마이크로미터에서 수 나노미터까지의 직경을 가지는 섬유를 만드는 방법이다. 균일하고 연속적이며, 조성에 따라 다양한 특성을 발휘할 수 있는 단일섬유, 이

†Corresponding author

E-Mail : songmic@sch.ac.kr(H. -Y. Song)

Fig. 1. Schematic diagram of electrospinning method.

중구조 등의 나노섬유를 쉽게 제조할 수 있다. 전기방사로 제조된 나노섬유는 마이크로 단위의 섬유보다 비표면적이 매우 크며, 작은 기공을 가지고 있을 뿐 아니라 기공의 크기를 자유롭게 조절할 수 있고, 강한 표면 흡착성, 물질에 대한 선택적 투과성을 지닌다. 또한 서로 다른 소재의 복합화가 가능하다는 많은 장점을 가진다.¹⁰⁻¹²⁾

본 연구에 사용된 고분자인 PMMA (Poly Methyl Methacrylate)는 대표적인 열가소성 플라스틱중의 하나이며 투과성, 내마모성, 내열성 및 표면강도 또한 우수하다.¹³⁾ 본 연구에 사용된 또 다른 고분자인 PVA (Poly (vinyl alcohol))는 합성 고분자로서 화학공업, 제약업, 섬유산업, 의약 및 식품산업 등에서 광범위 하게 사용되어 왔다.¹⁴⁻¹⁶⁾

여러 우수한 특성을 갖는 PMMA와 PVA를 전기방사하면 우수한 성질을 갖는 나노섬유를 얻을 수 있으며, 이를 압축하여 고강도 다층 PMMA/PVA bone plate를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서는 PMMA와 PVA의 나노섬유를 얻기 위해 전기방사 하였으며, 나노섬유를 사용하여 고정판을 얻기 위해 열압착을 하였다. 이러한 방법으로 제조된 다층 PMMA/PVA bone plate의 생체적합성에 대한 연구를 위하여 MG-63 세포와 L-929 세포를 이용하였으며, 세포에 대한 독성평가, 세포의 부착, 생분해에 관한 연구를 수행하였다.

Fig. 3. The image of multilayer PMMA/PVA bone plate.

2. 실험 방법

2.1 다층 PMMA/PVA bone plate 제작

본 연구에서는 전기방사를 위해 PMMA ($M_w > 110,000$ g/mol)을 LG Chemical Company에서 구입하였고, 용매로는 Nitromethane (CH_3NO_2 , Duksan Pure Chemical Co, Ltd)를 20 wt%로 혼합하여 사용하였다. PVA는 Sigma-Aldrich Company에서 구입하였고, 용매로는 증류수를 12 wt%로 혼합하여 사용하였다.

전기방사기기(EPS 200D, NanoNC, Korea)를 사용하여 PMMA와 PVA의 나노섬유 제작을 수행하였다(Fig. 1). PMMA 전기 방사를 위해 전압은 24 kV, 노즐 크기는 18 GA를 사용하였고, 노즐의 위치는 콜렉터로부터 10 cm 떨어진 곳에서 1.2 ml/h의 속도로 방출하였다. PVA 전기 방사를 위해 전압은 22 kV, 노즐 크기는 21 GA를 사용하였고, 노즐의 위치는 콜렉터로부터 12 cm 떨어진 곳에서 0.5 ml/h의 속도로 방출하였다. 전기방사로 제작된 나노섬유매트(Fig. 2.) 적층시켜 Multilayer 형태로 만들었다. 적층 된 PMMA 매트와 PVA 매트를 열압착($T, T_m > T > T_g$; T : temperature, T_m : PMMA의 녹는 점, T_g : PMMA의 유리전이온도) 하였고, 즉시 실온으로 냉각시켜 다층 PMMA/PVA bone plate를 제작하였다(Fig. 3).

2.2 세포배양

뼈모세포 유래인 MG-63 (KCLB 21427)세포는 DMEM (High glucose)배지, 세포 독성 평가에 흔히 사용되는 섬

Fig. 2. SEM image of (a) PMMA nanofibers, (b) PVA nanofibers and (c) Multilayer PMMA/PVA nanofibers.

Table 1. The chemical compositions of SBS (1 L).

Order	Reagent	Amount	Purity(%)	Formula weight
1	D.W.	700 ml	-	-
2	NaCl	8.035g	99.5	58.45
3	NaHCO ₃	0.355g	99.5	84.01
4	KCl	0.225g	99.5	74.56
5	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.231g	99.0	147.18
6	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.311g	98.0	95.22
7	1.0M-HCl	39 ml	-	-
8	CaCl ₂	0.292g	95.0	110.99
9	Na ₂ SO ₄	0.072g	99.0	142.04
10	Tris	6.118	99.0	121.14
11	1.0M-HCl	0-5 ml	-	-

유아세포인 L-929 세포는 RPMI1640 배지에 각 각 열불활성화를 시킨 10% 우혈청(FBS, #SH30088, Hyclone)과 항생제(antibiotic-antimycotic solution, #15240-062, Gibco) 1%를 포함시켜 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 증식시켜 사용하였다.

2.3 세포독성평가(MTT assay)

다층 PMMA/PVA bone plate의 용출액을 얻기 위해 (37±1)°C에서 72±2시간 용출하였으며, 용출 용매는 RPMI1640 배지를 사용하였다. 용출액은 새로운 배지를 사용하여 희석하였다. 섬유아세포 L-929 세포를 96-well 배양 용기에 1.0 × 10⁴ cells/well의 농도로 분주한 뒤 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를 PBS로 세척한 다음, 각 well마다 준비된 용출액을 넣고 다시 72시간 배양하였다. 이렇게 배양된 배양액에 100 µl의 MTT 용액(5 mg/ml)을 첨가하여 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 그 후 1 ml의 DMSO를 넣어 형성된 formazan crystal을 완전히 용해 시켰다. 용해된 formazan 용액을 ELISA reader로 595 nm에서 흡광도를 측정한 후 용출액의 농도(%)에 대한 relative cell viability(%)를 구하였다.

2.4 SEM에 의한 세포 부착 및 분화 관찰

Scanning electron microscope (SEM)에 의한 세포 부착을 관찰하기 위해 다층 PMMA/PVA bone plate에 30분, 60분, 90분 동안 기른 MG-63 세포를 0.5% glutaraldehyde로 15분 동안 고정 한 다음, 0.1M PB로 15분 동안 2회 수세한 후 50~100%의 에탄올로 탈수시켰다. 건조제로 hexamethyldisilazene (Sigma)를 사용하였고, 준비된 시편은 백금 코팅한 후 FE-SEM (JSM-7401F)으로 관찰하였다.

SEM에 의한 세포 분화를 관찰하기 위해 PMMA/PVA multilayer 고정판에 1.0 × 10⁴ cells/well의 농도로 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 부착 시킨 후,

Fig. 4. Micro-CT 2D images of multilayer PMMA/PVA bone plate. (a) Coronal image, (b) Transaxial image and (c) Sagittal image.

MG-63의 분화를 유도하기 위해 10 mM β-glycerophosphate와 50 µg/ml ascorbic acid를 첨가한 DMEM 배지로 교환해 주고 배양기에 2일, 7일, 14일 배양하였다. 배지는 2일마다 새 배지로 교환하면서 세포를 건강한 상태로 유지하였다. 준비된 시편은 백금 코팅한 후 FE-SEM (JSM-7401F)으로 관찰하였다.

2.5 유사체액(SBF, simulated body fluid)에서의 bone-like apatite 형성 관찰

유사체액을 Table 1과 같은 조성으로 제조 하였다.¹⁶⁾

$$V_s = S_a / 10 \quad (1)$$

(V_s = 유사체액의 부피, S_a = 시편의 표면적(mm²))

유사체액에 다층 PMMA/PVA bone plate를 넣어준 후 1일, 7일, 14일, 21일 28일 후에 FE-SEM에 의한 표면 관찰, EDS-SEM에 의한 bone-like apatite 형성 관찰, 유사체액의 pH 및 이온(Ca, P)의 변화를 ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer, ELAN 6000)를 통하여 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 전기방사에 의해 제작된 다층 PMMA/PVA bone plate

제작된 다층 PMMA/PVA bone plate는 micro-CT (Skyscan 1172) 촬영을 통해 2D 이미지를 얻은 뒤 bone plate 내부 조직의 균일성과 치밀도를 관찰 하였는데 전

Table 2. Comparison of tensile strength between electrospun mats and post-pressing electrospun mats.

Materials	Tensile Strengths [Mpa]
Electrospun mats	0.73
Post-pressing electrospun mats	3.05

Fig. 5. Comparison of tensile strength between electrospun mats and post-pressing electrospun mats.

방향에서 내부조직이 매우 균일하고 치밀하게 제작되었음을 확인하였다(Fig. 4). 또한 인장강도 시험에서도 다층 PMMA/PVA bone plate가 가장 높은 것으로 확인되었다(Table 2) (Fig. 5).

3.2 세포독성평가(MTT assay)

전기방사로 제조된 다층 PMMA/PVA bone plate의 세포독성 여부를 알아보기 위해 ISO 10993-5에 공시된 추출물 희석법(extract dilution method)에 의거하여 실험을

Fig. 6. Relative MTT activity, compared to multilayer PMMA/PVA bone plate, after 72hr of growth with extract of control, multilayer PMMA and PVA bone plate. (a) control, (b) multilayer PMMA/PVA bone plate, (c) multilayer PMMA bone plate and (d) multilayer PVA bone plate.

진행하였다. L-929 섬유아세포에 제조된 고정판으로부터 제조된 다층 PMMA/PVA bone plate를 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 에서 72 ± 2 시간 용출시킨 용출액을 50, 25, 12.5% 첨가하여 세포독성을 측정하였다. 대조군의 흡광도를 100%로 하여 농도별 흡광도를 비례적으로 측정한 결과, 78~91%의 생존률을 보여(Fig. 6), 본 연구에서 사용된 PMMA와 PVA는 세포독성이 낮으며 이는 다층 PMMA/PVA bone plate가 생체 내 이식되었을 때 독성과 면역반응이 낮을 것으로 생각된다.^{17,18)}

3.3 SEM에 의한 세포 부착 및 분화 관찰

다층 PMMA/PVA bone plate의 표면 미세구조가 세포 부착에 어떤 영향을 미치는 지를 관찰하였다. 세포의 부

Fig. 7. SEM micrograph showing the MG-63 osteoblast adhesion to the surface of multilayer PMMA/PVA bone plate (a~c) and glass (d~f). (a, d) 30min, (b, e) 60 min, (c, f) 90 min.

Fig. 8. SEM micrograph showing the MG-63 osteoblast differentiation to the surface of multilayer PMMA/PVA bone plate (a~c) and glass (d~f). (a, d) 2 days, (b, e) 7 days, (c, f) 14 days.

Fig. 9. (a) SEM micrograph and (b) EDS spectrum of the surface of multilayer PMMA/PVA bone plate after immersion in SBF solution for 14 days.

착과 퍼짐을 비교 분석하기 위해 다층 PMMA/PVA bone plate와 세포의 부착 및 분화가 우수한 것으로 알려진 glass(대조군)에 MG-63세포를 배양한 후 시간에 따른 세포의 부착형태를 SEM으로 비교 관찰하였다.

시간 변화에 따른 부착 및 퍼짐 양상은 다소 차이를 보였다. 30분 기른 MG-63의 부착을 비교해 보면 다층 PMMA/PVA bone plate에서 기른 세포는 초기 부착에 관여하는 filopodia와 lamellapodia를 관찰할 수 없었으나, 대조군의 경우에는 약간의 filopodia와 lamellapodia를 관찰할 수 있었다.^{19,20)} 60분, 90분에는 세포가 넓게 펼쳐진 형태로 소재에 완전히 부착하였고, 특히 90분에는 본 연구에 사용된 소재가 세포의 초기 부착과 퍼짐 현상이 우

수한 소재로 확인 되었다(Fig. 7).

다층 PMMA/PVA bone plate의 표면 미세구조가 세포의 분화에 어떤 영향을 미치는지를 관찰하였다. 다층 PMMA/PVA bone plate에서 기른 세포의 증식 양상을 보면 2일째부터 세포가 넓게 펼쳐진 형태로 세포와 세포 사이에 결합이 잘 이루어진 것을 확인하였다. 7일, 14일 기른 세포는 세포와 세포 사이에 결합이 이루어지면서 모든 고정판의 표면에 부착하여 성장하는 양상을 보였으며, 다층 PMMA/PVA bone plate에서 기른 MG-63의 증식 및 분화가 대조군과 거의 차이가 없는 것을 확인하였다(Fig. 8).¹⁹⁾

Fig. 10. Time dependent changes of (a) Ca, (b) P concentrations and (c) pH in SBF soaked with Multilayer PMMA/PVA, PMMA bone plate and PVA bone plate.

Fig. 11. SEM micrographes of the surface of Multilayer PMMA/PVA bone plate after soaking in SBF. (a) 1 day, (b) 7 days, (c) 14 days and (d) 28 days.

3.3 유사체액(SBF, simulated body fluid)에서의 bone-like apatite 형성 관찰

다층 PMMA/PVA bone plate가 유사체액 내에서 어떤 변화가 있는지 관찰하였다. 유사체액에 담근 지 14일 부터 bone-like apatite의 생성이 확인되었다. SEM-EDS로 측정된 결과 Ca과 P가 관찰되었으며(Fig. 9), ICP-MS 측정 결과 Ca과 P 이온 농도가 14일 후부터 감소하는 것을 확인하였으며, pH의 변화는 거의 없는 것을 확인하였다(Fig. 10). 이는 Ca과 P 이온이 bone-like apatite 생성에 기여한 것으로 예측할 수 있고, 이런 결과는 본 소

재를 골절된 뼈에 이식하였을 때 부착면에서 뼈모세포의 부착, 증식 및 분화에 도움을 주어 골재생에 긍정적인 역할을 할 것으로 생각된다.²¹⁾ 유사체액에 담근 지 1일, 7일, 14일, 28일 후에 다층 PMMA/PVA bone plate의 표면을 SEM으로 관찰하였을 때 차이가 없었다(Fig. 11).

4. 결 론

본 연구에서는 전기방사를 이용하여 제작된 다층 PMMA/PVA bone plate의 생체적합성에 대해 알아보았다. 세포

독성은 없는 것으로 판단되었으며, 초기부착은 대조군보다 느렸지만, 분화시킨 경우에는 대조군과 비슷한 부착과 분화양상을 나타냈다. 유사체액에 담근 후 14일 만에 bone-like apatite가 형성되었으며 이는 생체 내 이식되었을 때 뼈모세포에 긍정적인 영향을 줄 것으로 기대된다. 또한 pH의 변화가 거의 없는 것으로 보아 생체 내 이식되었을 때 조직 손상 등의 영향을 주지 않을 것으로 생각된다. 따라서 추후 동물실험을 통해 다층 PMMA/PVA bone plate의 시간경과에 따른 강도변화 및 생분해에 대한 연구를 추가한다면 생분해성 고분자 bone plate를 제작할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단 중견연구자지원사업(2009-0092808)의 연구비 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. K. R. Krishan, I. Sridhar and D. N. Ghista, *J. Care Injured.*, **39**, 1421 (2008).
2. B. R. Plaga, R. M. Royster, A. M. Donigian, G. B. Wright and P. M. Caskey, *J. Bone Joint Surg.*, **74**, 292 (1992).
3. K. Viheonen, *Acta Orthop. Scand.*, **59**(3), 279 (1988).
4. S. Vainionpaa, K. Vihtonen, M. Mero, H. Patiala, P. Rokkanen, J. Kilpikari and P. Tormala, *Arth. Orthop. Trauma Surg.*, **106**, 1 (1986).
5. S. Gross and E. W. Abel, *J. Biomech.*, **34**, 995 (2001).
6. Y. Mutoh, A. Akhmad, Y. Miyashita and T. Sadasue, *Mat. Sci. Eng. A.*, **468**, 114 (2007).
7. M. L. Strycker, *J. Foot Ankle Surg.*, **34**, 82 (1995).
8. S. Vainionpaa, J. Kilpikari, J. Laiho, P. Rokkanen and P. Tormala, *Biomaterials*, **8**, 46 (1987).
9. K. Arakawa, T. Mada, S. D. Park and M. Todo, *Poly Test.*, **25**, 628 (2006).
10. J. H. Jang, O. Castano and H. W. Kim, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **61**, 1065 (2009).
11. D. H. Reneker and I. Chun, *Nanotechnology*, **7**, 216 (1996).
12. D. Liang, B. S. Hsian and B. Chu, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **59**, 1392 (2007).
13. J. P. Chen, K. H. Ho, Y. P. Chiang and K. W. Wu, *J. Membr. Sci.*, **340**, 9 (2009).
14. S. J. Zang and H. Q. Yu, *Water Res.*, **38**, 309 (2004).
15. G. S. Sailaja, K. Sreenivasan, Y. Yokogawa, T. V. Kumary and H. K. Varma, *Acta Biomater.*, **5**, 1647 (2009).
16. T. Kokubo and H. Takadama, *Biomaterials*, **27**, 2907 (2006).
17. C. C. Demerlis and D. R. Schoneker, *Food Chem. Toxicol.*, **41**, 319 (2003).
18. T. G. Tihan, M. D. Ionita, R. G. Poperscu and D. Iordachescu, *Mater. Chem. Phys.*, **118**, 265 (2009).
19. P. Sangsanoh, O. Suwantong, A. Neamnark, P. Cheepsunthorn, P. Pavasant and P. Supaphol, *Eur. Polym. J.*, **46**, 428 (2010).
20. I. S. Byun, S. K. Sarkar, H. S. Seo, B. T. Lee and H. Y. Song, *Kor. J. Mater. Res.*, **20**(3), 155 (2010) (in Korean).
21. G. K. Toworfe, S. Bhattacharyya, R. J. Composto, C. S. Adams, I. M. Shapiro and P. Ducheyne, *J. Tissue Eng. Regen. M.*, **3**, 26 (2009).