

CaO-SiO₂-PEEK 생체복합체의 제조와 *in-vitro* 특성평가

김일용[†] · 조성백* · 김종욱 · 신종우 · 이성호** · 박중근*** · 김택남

배재대학교 대학원 재료공학과

* 한국지질자원연구원 자원활용 소재연구부

**대전보건대학교 치기공과

***한국과학기술원 재료공학과

Preparation of CaO-SiO₂-PEEK bio-composites and *in-vitro* Evaluation

Ill Yong Kim[†], Sung Baek Cho, Jong Ock Kim, Jong Woo Shin, Sung Ho Lee,
Joong Keun Park and Taik Nam Kim

Department of Materials Engineering, Graduate school of Paichai University, 439-6,
Doma2-dong, Seo-gu, Daejeon, 302-162, Korea

*Mineral & Materials Processing Division, Korea institute of Geoscience and Mineral Resources(KIGAM),
30, Kajung-dong, Yusong-gu, Daejeon, 305-350, Korea

**Department of Dental Laboratory, Daejeon Health Science College, 77-3, Gayang2-dong,
Dong-gu, Daejeon, 300-711, Korea

***Department of Materials Science & Engineering, KAIST, 373-1, Guseong-dong,
Yuseong-gu, Daejeon, 305-701, Korea

(2004년 3월 19일 받음, 2004년 4월 14일 최종수정본 받음)

Abstract A bio-composites were prepared by mechanical mixing with bioactive sol-gel derived CaO-SiO₂ and organic PEEK for bone repairing hybrid materials. The composites were characterized by *in-vitro* test. A bonelike apatite was formed on the surface of all bio-composites in SBF test. The cell morphology and adhesion on the surface of the composites having below 30% PEEK were clearly observed in L929 cell experiment.

Key words CaO-SiO₂, polyetheretherketone, organic-inorganic, hybrid, cell test

1. 서 론

Bioglass의 발견 이후로,¹⁾ 생체 경조직 대체용으로 제조되어진 많은 세라믹 재료들이 실제뼈와 결합을 잘 한다는 사실이 알려졌고, 의학용으로 널리 이용되어지고 있다.^{2,3)} 이러한 생체 경조직을 대신할 수 있는 이상적인 재료는 인체내에서 부식이 없어야하며, 독성을 가져 인체에 해를 가하는 일이 없어야 하고, 생물학적, 화학적으로 안정하여야한다. 또한 생체뼈와 대체되었을 때 이식한 재료와 실제뼈와 강하게 결합할 수 있어야 하며, 몸의 하중을 견딜 수 있는 충분한 기계적 강도를 가져야 한다.⁴⁾

그러나 현재 사용되어지고 있는 생체 경조직 대체용 세라믹들은 높은 하중이 실리는 부분에는 대체할 수 없고, 하중이 낮은 부분에서만 제한적으로 사용되어지고 있다.⁵⁾ 이러한 목적으로 금속재료들이 사용되어지고 있으나, 생체활성이 낮고 stress shielding으로 인해 뼈와의 분리가 일어난다.^{6,7)} 따라서 생체활성이 높고 실제뼈와 유사한 기계적 특성을 갖는 재료의 개발이 요구되어지고 있

다. 실제적으로 뼈는 무기물질인 아파타이트와 유기물질인 콜라겐의 나노복합체로 되어있다. 그러므로, 기계적 강도를 증가시킨 인공뼈의 개발을 위하여 유·무기 hybrid 재료들이 연구되어 왔다.⁸⁻¹⁰⁾

한편 본 연구에서 사용된 CaO-SiO₂는 CaO와 SiO₂의 함량을 변화시킴으로 표면 반응성을 조절하기가 쉽고, 졸-겔법으로 낮은 온도에서도 제조가 가능한 특징이 있다. 또한 유기물질로 사용된 polyetheretherketone(PEEK)는 열 가소성 수지로, 상온에서는 semi-crystalline으로 모든 고분자들 중 가장 높은 강도를 지닌 재료이다. 이 외에도 열적 안정성이 우수하고(Tm ≈ 343°C), 내화확성이 뛰어나 여러 분야에서 사용되어지고 있으며, 이미 의학용으로 쓰이고 있는 재료이다.¹¹⁻¹³⁾

따라서 본 실험에서 무기물로서 생체활성물질인 CaO-SiO₂와 유기물질인 PEEK를 이용하여 유·무기 hybrid 복합재료를 제조하였고, 그 복합재료의 PEEK함량의 변화에 따른 생체적합성(biocompatibility)을 평가하기 위하여, *in-vitro* test로서 생체유사용액(simulated body fluid, SBF)를 이용하여 표면반응성을 조사하였고, L929 cell을 이용하여 독성test를 실시하였다.

[†]E-Mail : db0905@hanmail.net

2. 실험 방법

2.1. 출발물질

본 연구에 사용된 CaO-SiO₂는 높은 생체활성(bioactive)을 갖는 무기물질로서 ₂₀CaO-₈₀SiO₂(CS)의 조성으로 제조하여 사용하였다. CS는 Tetraethoxysilane(TEOS, Si(OC₂H₅)₄, Wako, Japan)을 수용액 중에서 가수분해(hydrolysis)한 후, Ca(NO₃)₂·4H₂O와 중축합(polycondensation)시키는 졸-겔(Sol-Gel)법을 사용하여 합성하였다. 분자량 10,000의 폴리에틸렌 글리콜(Polyethylene glycol, PEG, Aldrich)을 증류수 속에 용해시킨 후, Ca(NO₃)₂·4H₂O를 첨가하였고, 이 용액을 교반시키면서 TEOS를 첨가하여 용액이 투명해질 때까지 교반시켰다. 가수분해 시 촉매로서는 질산(nitric acid, 62 wt%; Wako, Japan)을 사용하였다. 이 용액을 40°C의 오븐에 넣어 18시간 동안 aging시켰다. 숙성하여 얻어진 습윤겔을 1 mol/dm³ 질산용액으로 세척하여 겔 속의 수용성 PEG를 제거하였다. 세척한 습윤겔을 40°C 오븐에서 건조한 후, 전기로(Lindberg/Blue, 808-847, SPX Corporation, USA)를 이용하여 600°C에서 2시간동안 열처리하여 CS 분말을 제조하였다.

2.2. 복합재료의 제조

유·무기 복합재료를 제조하기 위해 PEEK/CS 분말을 planetary ball mill에서 분쇄 및 혼합하였으며, 혼합 후 레이저 입도분석기를 사용하여 입도 분석을 하였다. 분쇄 및 혼합된 각 조성의 복합체를 15000 lb의 일축가압하여 지름 15 mm × 두께 1.5 mm 사이즈의 시편을 제작하였다. 이때 PEEK/CS 분말의 질량비(_xP_{10-x}CS)는 0% (₁₀P₀CS)에서 100%(₁₀P₁₀CS)까지 10%단위의 조성으로 실시하였다. 한편 제조된 PEEK/CS의 시편을 100°C/h의 승온 속도로 300°C까지 올려 1시간동안 열처리 하였다. 이 시편을 SBF를 이용한 test와 L929세포를 이용한 독성 실험용으로 사용하였으며, 시험전 시료의 표면을 #1200의 SiC연마지로 연마한 후, ethanol로 세척하였고 120°C autoclave에서 멸균하여 사용하였다.

2.3. SBF의 제조

실험에서 사용된 SBF용액은 Table 1과 같이 사람의 혈장 무기이온 농도와 같은 농도를 갖게하였다.¹⁴⁾ 먼저 항온조(water bath)를 36.5°C로 유지한 후 증류수 800 ml를 1 l용기의 폴리에틸렌 비이커에 넣어 magnetic stirrer로 교반하였다. SBF의 제조에 NaCl, NaHCO₃, KCl, K₂HPO₄·3H₂O, MgCl₂·6H₂O, 1 mol/dm³ HCl, CaCl₂, Na₂SO₄의 시약 순서대로 상기 폴리에틸렌 비이커의 증

류수 속에 교반시키며 넣었다. 최종적으로 비이커 속 용액의 pH가 36.5°C에서 7.4가 되도록 tris-buffer solution (Tris(hydroxymethyl) aminomethane, (CH₂OH)₃CNH₂, ER, Nalacai, Japan)과 1N HCl용액을 사용하여 조절하였다.

2.4. SBF를 이용한 *in vitro* test

폴리스틸렌 병 속에 30 ml의 SBF를 넣은 후, 열처리한 PEEK/CS 시편들을 그 속에 침적시켰다. 인간의 체온과 유사한 36.5°C로 조절된 인큐베이터(incubator) 속에 폴리스틸렌 병을 넣어 1 day로부터 2 weeks까지 유지실험하였다. 이와 같이 SBF속에 일정 기간 침적한 후, 시료를 꺼내어 증류수로 잘 씻은 다음 대기 중 건조시켰다. 한편 각 시편 표면에 생성된 아파타이트를 X선 회절분석(Thin film X-ray diffraction), 주사전자 현미경(SEM, Tapcon ABT-32, Japan)을 사용하여 분석하였다.

2.5. L929 세포를 이용한 독성 test

세포주 L929 cell은 tissue culture flasks(canted neck, 50 ml)의 RPMI medium 1640(GIBCO, USA)에 10% fetal bovine serum(FBS, KDR Biotech, USA)를 10ml 첨가한 배지에서, 37°C, 5% CO₂ incubator(JISICO, J-2000, Korea)조건으로 각각 배양하였다. 한편 유·무기 복합체의 세포실험은 먼저 PEEK/CS로 만들어진 각각의 유·무기복합체를 6 well plate에 넣은 후, 각각의 well plate에 10% FBS를 첨가한 RPMI medium 1640 2 ml를 부어넣었다. 그런 다음 L929 cell을 각각의 well plate에 1 ml(10⁵ cells/ml)씩 떨어뜨린 후, 37°C, 5% CO₂ incubator에 넣어 1day, 2day동안 배양하였고, 배양이 끝난 후 시편표면의 세포모양을 조사하기 위하여 배지를 제거하였다. 시편부착 세포 조사는 formalin 용액으로 세포를 fixing시킨 후, PBS 용액으로 3번 세척한 다음, 50~100% ethanol series로 탈수 처리하여 SEM으로 성장정도를 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 PEEK/CS 복합체의 분쇄 및 혼합 특성

생체활성 분말인 CaO-SiO₂와 PEEK 분말을 planetary ball mill에서 혼합, 분쇄한 후 분말입도분석 결과를 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1(A)의 결과로부터 분쇄시간 증가에 따른 입도의 감소는 보이지 않고, 오히려 PEEK 분말에서는 입도가 점점 커지는 것을 알 수 있다. 분쇄에 따른 PEEK분말의 형태변화를 관찰하기 위하여 분쇄 전

Table 1. Ion concentrations of human body fluid and simulated body fluid(SBF)

(Unit: mM)

	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Body Fluid	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	4.2	1.0	0.5
SBF	142.0	5.0	1.5	2.5	148.8	27.0	1.0	0.5

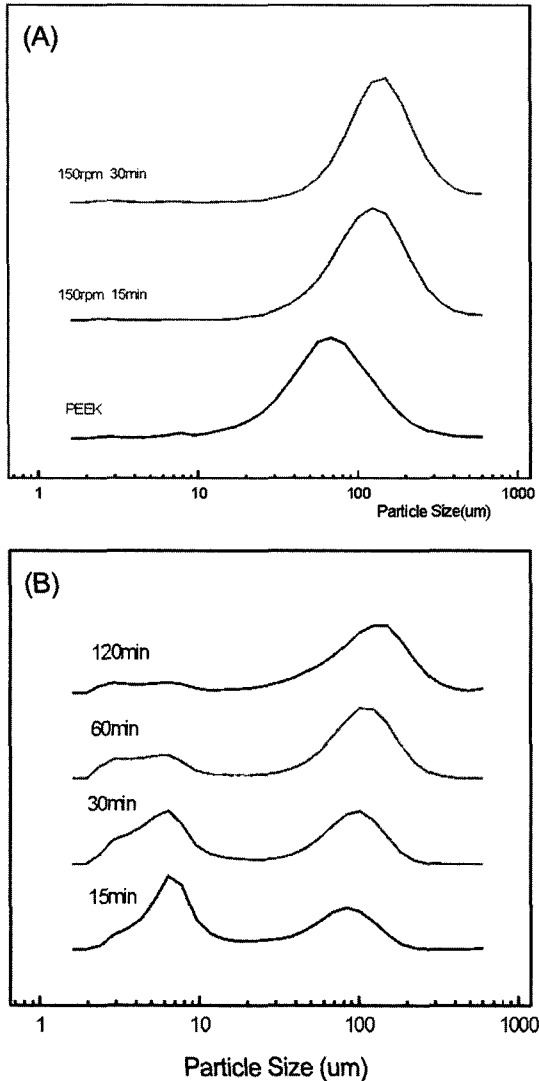


Fig. 1. Changes in particle size distribution of the (A) PEEK and (B) organic/inorganic composite powder with milling time.

및 PEEK/CS 복합체를 2시간동안 분쇄 후, 전자현미경으로 관찰한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2(A)의 사진을 살펴보면 분쇄하기 전에는 구형이었던 PEEK 분말이 CaO-SiO₂분말과 혼합하여 2시간 분쇄 후에는 완전한 판상으로 변해 있음을 알 수 있다(Fig. 2(B)). 육안 관찰에서도 분쇄 후 PEEK 분말은 상당히 많이 응집되어 있었다. 따라서 분쇄시간 증가에 따른 PEEK 입자의 크기 증가는 마찰에 의해 발생한 정전기에 의한 응집현상과 구상이 판상으로 변함에 따른 크기증가임을 알 수 있었다.

한편 CaO-SiO₂분말과 PEEK분말을 함께 넣고 분쇄한 후 얻어진 복합분말의 입도분석 결과를 Fig. 1(B)에 나타내었다. Fig. 1(B)의 입도분포를 살펴보면, 10 μ m 부근에 분포하는 분말들과 100 μ m 부근에 분포하는 두 종류의 분말이 존재하는 것을 알 수 있었다. 한편 Fig. 1(A)의 순수한 PEEK 분말의 입도분포와 비교하여 보면, 분쇄 15분 후에 10 μ m 부근에 분포하는 분말들은 CaO-

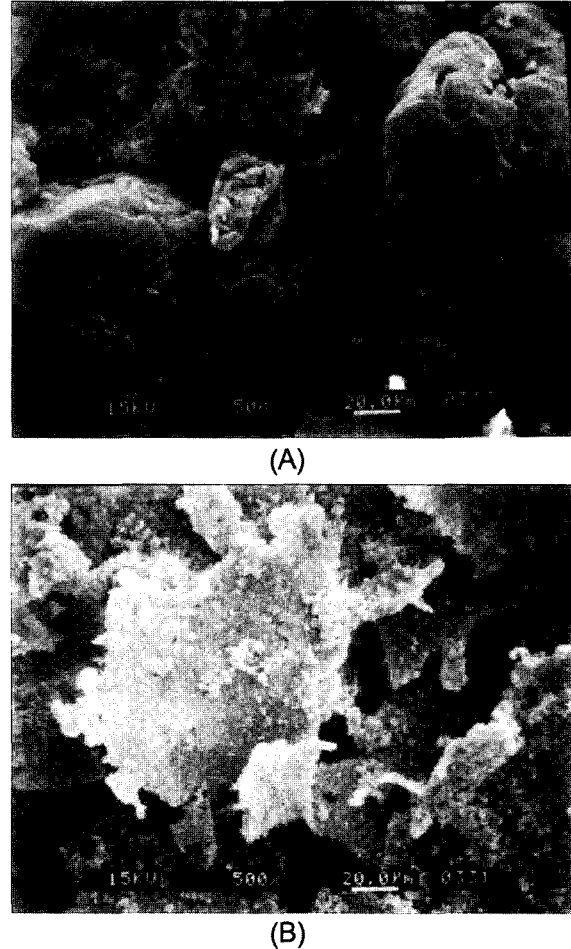


Fig. 2. SEM photographs of the bio-composite powder ((A) PEEK powder, (B) 90PEEK/10CS powder after 2hr ball milling).

SiO₂분말임을 알 수 있었다. 분쇄시간이 증가함에 따라 10 μ m 부근에 분포하는 분말들은 적어지고 100 μ m 부근에 분포하는 분말들은 입자크기가 점점 커지고 있음을 알 수 있었다. 따라서 Fig. 1(B) 및 Fig. 2(B)의 결과로부터 분쇄시간이 증가함에 따라 CaO-SiO₂분말들이 미립화되어, PEEK분말 표면에 달라붙고 있다고 생각할 수 있다.

3.2. SBF를 이용한 *in vitro* test

유기물인 PEEK와 무기물인 CS 분말의 질량비($xP_{10-x}CS$)를 0%($_{10}P_0CS$)에서 100%($_{10}P_{10}CS$)까지 10%단위(10P~5P, 2P~1P)로 변화시킨 PEEK/CS 복합체를 SBF 속에 1day로부터 2weeks동안 침적시킨 후, 침적시키기 전과 후의 시편표면을 X선 회절분석으로 조사하였다.

$_3P_7CS$ 시편을 일주일동안 SBF에 침적시킨 후, 표면의 XRD분석 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3에서와 같이 침적시키기 전과 침적 후의 XRD peak가 확연히 달라진 것을 확인할 수 있는데, 측정된 peak 분석결과 이는 침적 후 표면에 아파타이트가 생성된 결과임을 알 수 있었다.

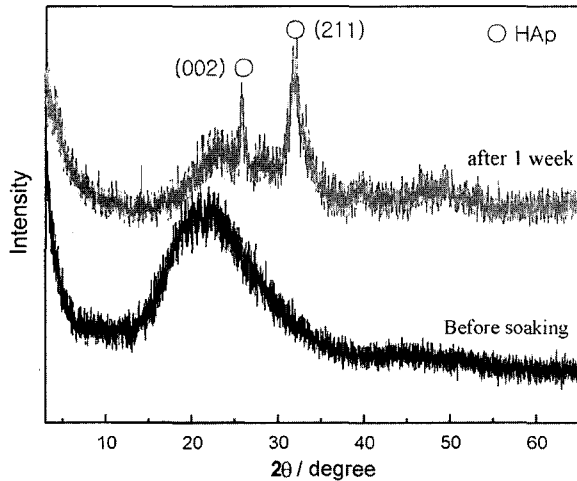


Fig. 3. XRD patterns of the ${}_3P_7CS$ bio-composite surface after soaking in SBF for 1 week.

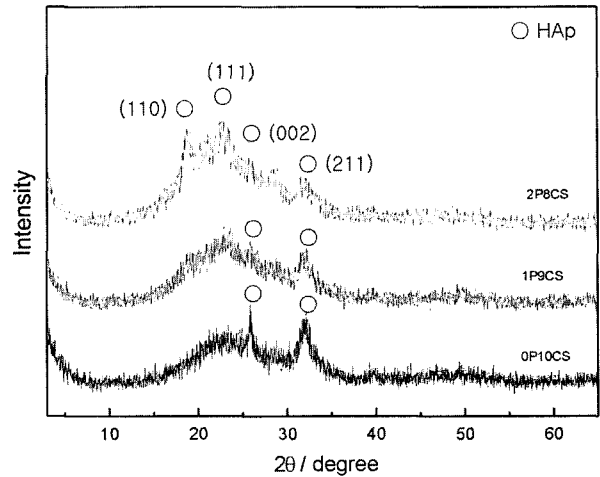


Fig. 4. XRD patterns of the surfaces of 0% to 20% PEEK containing PEEK/CS composites after soaking in SBF for 1 week.

한편 PEEK의 함량을 0~20%까지 변화 시킨 시편을 SBF에 침적시킨 후, 표면위에 생성된 아파타이트를 측정 한 XRD 패턴을 Fig. 4에 나타내었다. 아파타이트 peak의 강도로부터 CS의 함량이 많을수록 시편 표면위에 생성되는 결정형 아파타이트의 양이 많음을 알 수 있었다. 또한 20%에서 100% PEEK를 함유한 PEEK/CS 복합체 시편을 2주일 침적 후 표면의 SEM 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 순수한 PEEK(${}_{10}P_0CS$)에서는 2주일간의 침적에도 불구하고 표면에 아무런 변화도 일어나지 않았고, 아파타이트가 생성되지 않았음을 알 수 있었다. 이러한 결과로부터 PEEK가 생체활성을 갖지 않은 재료임을

알 수 있었다. 그러나 2주일동안 침적시킨 ${}_5P_5CS$ 와 ${}_{10}P_{10}CS$ 시편의 표면에서는 아파타이트가 생성되었음을 확인할 수 있었는데, CS함량이 많은 ${}_{10}P_{10}CS$ 의 시편에서는 아파타이트가 시편 전체에 걸쳐 생성된 것을 관찰할 수 있었으나, ${}_5P_5CS$ 시편의 표면에는 부분적으로 아파타이트가 생성되었음을 알 수 있었다. 이러한 현상으로부터 복합체 표면에 드러난 CS분말에서만 반응에 의해 아파타이트 핵이 형성되어 아파타이트가 생성되었다고 생각된다. 이는 CaO-SiO₂ glass에서 표면에 생성되는 아파타이트 핵 형성기구와 유사하다고 생각된다.⁹⁾ 또한 표면에 노출된 CS의 양이 많을수록, 다시 말해 CS의 양이 증

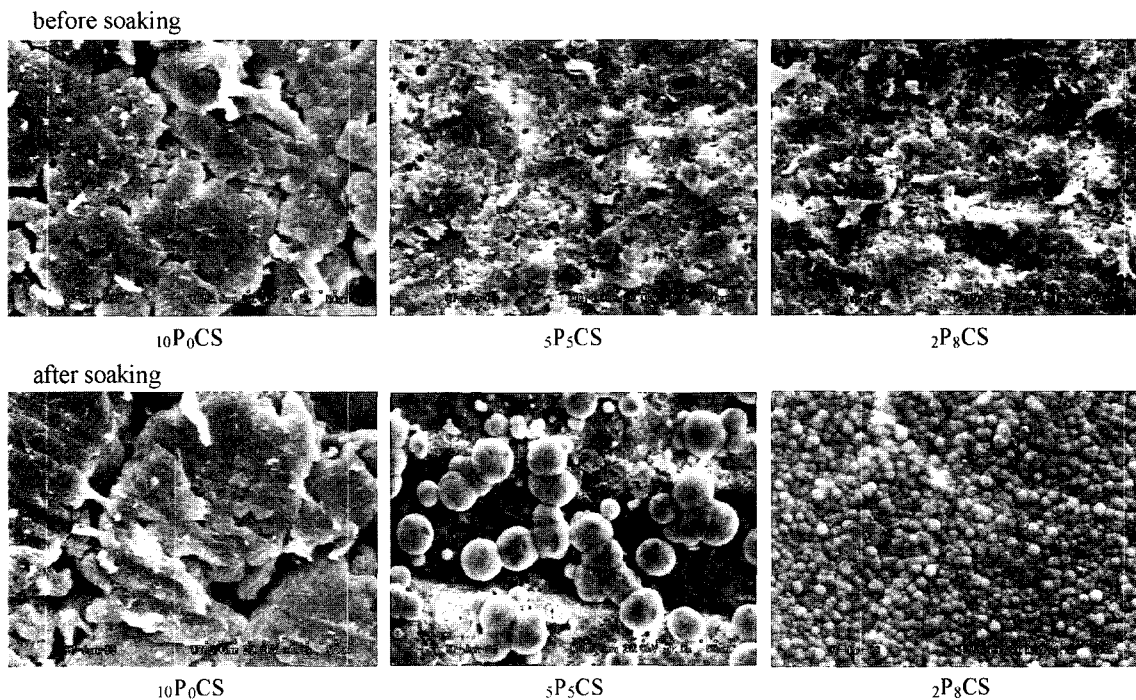


Fig. 5. SEM photographs of the surfaces of 20% to 100% PEEK containing PEEK/CS composites before and after soaking in SBF for 2 weeks.

가함에 따라 생성되는 아파타이트의 양도 증가함이 관찰되었다. 이러한 결과들로부터 생체활성을 나타내는 CS분말의 함량이 아파타이트 생성시간과 생성량에 크게 영향을 끼친다는 것을 알 수 있었다. 실제로 인체내부에 매식수복재료로 이식하여 사용하였을 때 적어도 2주일 안에 뼈와의 결합이 일어날 수 있다고 생각된다.

한편 적은 SBF 침적 시간에 생성되는 아파타이트를 관찰하기 위하여 $_2P_8CS$ 시편을 2일 동안 침적시킨 후 표면의 SEM 사진을 관찰하였고, 그 결과는 Fig. 6과 같다. 20%의 이하의 PEEK함량을 갖는 시편들에서는 침적 후 2일 만에 표면에 아파타이트가 생성되었는데, 이러한 관찰은 PEEK와 CS 함량 변화로 생성되는 아파타이트의 양 뿐만 아니라 뼈와의 결합시기도 조절이 가능하다는 것을 의미하는 것이라 생각된다.

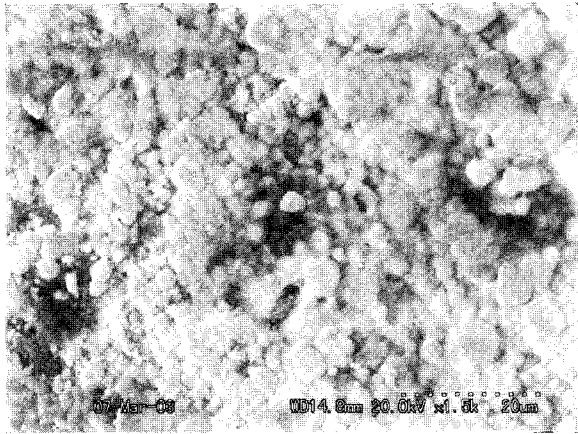


Fig. 6. SEM photograph of surface of the $_2P_8CS$ composite after soaking in SBF for 2 days.

3.3. L929 cell test

본 연구에서 제조한 유·무기 복합재료의 독성 여부를 test 하기 위하여 L929 cell을 사용하여 실시한 PEEK와 CS의 조성에 따른 세포 독성 실험 결과를 Fig. 7~8에 나타내었다. Fig. 7에는 L929 세포를 이용하여 각 조성의 시편 위에 1일 동안 배양한 후의 SEM 사진을 나타내었다. 순수한 CS 시편($_0P_{10}CS$)의 경우 L929 cell의 1일 배양에서 부착 형태와 세포모양이 매우 양호한 것을 발견 할 수 있었다. PEEK를 10~30%첨가한 시편들($_2P_3CS$, $_3P_7CS$)에서도 세포의 형태와 부착 상태가 양호한 것으로 나타났다. 그러나 30%를 초과한 40% 이상의 시편들에서는 세포의 형태가 구형으로 위축되어있으며 세포의 활동이 없는 것으로 관찰되었다. 이것은 세포가 시편에 부착하여 자랄 수 없음을 의미하는 것이라 생각된다. 실제로 인체내에 유·무기 복합재료를 이식했을 경우 이러한 시편들의 표면에는 세포들이 부착하지 않고, 뼈와 세포의 분리가 일어날 것으로 생각된다.

한편 L929 세포를 2일 동안 배양시킨 시편에서의 세포부착을 관찰하였고, 이를 Fig. 8에 나타내었다. 2일간의 배양에서도 1일 배양과 마찬가지로 순수한 CS시편($_0P_{10}CS$)과 20% PEEK함량을 가지는 시편($_2P_8CS$)에서는 세포의 모양과 부착 상태가 양호하고, 1일시편과 비교하여 크게 달라진 모습은 찾아보기 힘들었다. 이러한 사실은 CaO-SiO₂ 무기재료와 세포와는 매우 좋은 생체 친화성이 있음을 의미한다고 판단된다. 하지만 $_3P_7CS$ 의 SEM사진에서 1일 배양한 후엔 세포의 모양과 상태가 양호하였으나, 2일 배양 후의 사진에서는 세포의 모양이 변형되었으며 어떠한 활동을 하지 않았음을 알 수 있었다. 이는 PEEK의 함량이 30% 이상으로 첨가하게 되면 초기에는 독성 발현이 없으나, 시간이 지남에 따라 독성

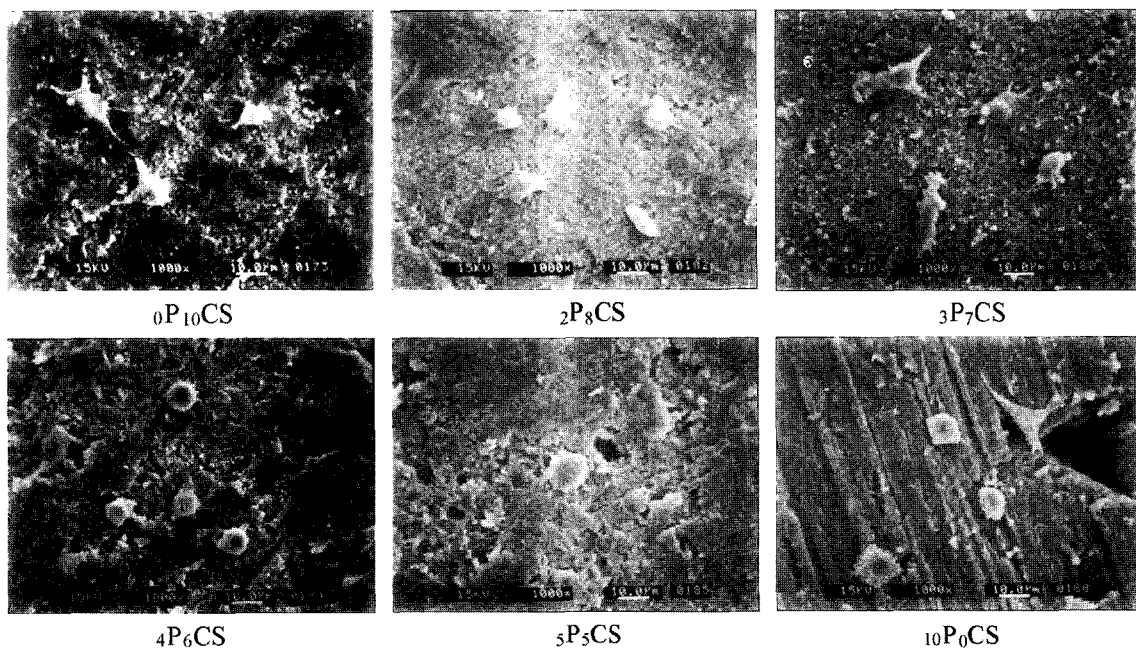


Fig. 7. SEM photographs of cell culture test using L929 of various bio-composites surfaces for 1day.

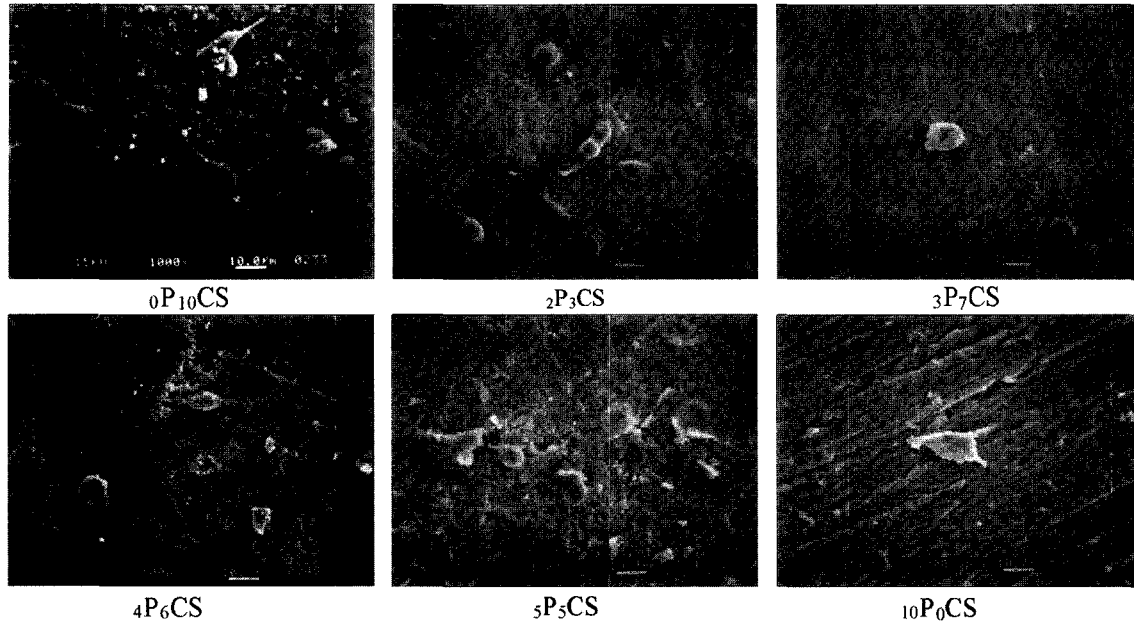


Fig. 8. SEM photographs of cell culture test using L929 of various bio-composites surfaces for 2days.

을 나타내어 세포가 자랄 수 없는 환경을 만드는 것이라 생각된다. 한편 PEEK의 양을 40% 이상으로 증가한 경우, 1일 배양과 마찬가지로, 2일 배양에서는 세포가 잘 부착 하지 않았고, 활동을 하지 않고 위축되어 있는 구형의 세포들이 주로 발견되었다.

4. 결 론

졸-겔법으로 제조한 무기물질인 CaO-SiO₂와 유기물질인 PEEK를 혼합하여 hybrid 유기기 복합체를 제조한 후 분말입도와 SBF에서의 아파타이트 생성여부 및 세포실험을 실시하였다. 분말 입도분석결과로부터 구형 PEEK는 판상형으로 변하고 PEEK 표면에 CS가 달라붙는 현상을 보였다.

한편 SBF에 유·무기복합체를 1주일 침적한 후, 순수한 PEEK를 제외한 모든 복합체 표면에서 아파타이트가 발견되었고, 10%와 20%의 PEEK 함량을 갖는 복합체에서는 2일만에 아파타이트가 생성되었다. 즉, PEEK 표면의 CS입자가 아파타이트 핵생성입자로 작용하고 있음을 알 수 있었다.

L929 cell을 이용한 실험에서는 30%이하의 PEEK 함량의 복합체에서는 세포의 부착상태와 세포의 모양에서 양호한 생체친화성이 나타남을 알 수 있었으나, 그 이상의 함량에서는 PEEK가 생체친화성을 감소시키는 것으로 관찰되었다.

이와 같은 결과로부터 CaO-SiO₂-PEEK 생체복합체 중 30%이하의 PEEK함량 복합체는 새로운 인공뼈 재료로 사용되어질 수 있는 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구의 일부는 한국과학재단의 목적기초연구 R01-2002-00256의 지원, 특정기초연구 R01-2002-000-00248-0의 지원과 배재대학교 Bio-med RRC 2003S-PT0002-20-0024의 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. L. L. Hench, R. J. Splinter, W. C. Allen and T. K. Greenlee, *J. Biomed. Res. Symp.*, **2**, 117-141 (1971).
2. L. L. Hench, *J. Am. Ceram. Soc.*, **74**, 1487-1510 (1991).
3. T. Kokubo, *Biomaterials*, **12**, 155-163 (1991).
4. S. K. Lee, K. M. Koo, M. H. Lee, H. D. Lee and B. K. Lee, *J. Kor. Ceram. Soc.*, **40**(6), 566-571 (2003).
5. T. Kokubo, *Acta mater.* **46**(7), 2519-2527 (1998).
6. A. Oyane, K. Nakanishi, H. M. Kim, F. Miyaji, T. Kokubo, N. Soga and T. Nakamura, *Biomaterials*, **20**, 79-84 (1999).
7. T. Kokubo, *Thermo. acta*, **280/281**, 479-490 (1996).
8. K. Zhang, Y. Wang, M. A. Hillmyer and L. F. Francis, *Biomaterials*, **25**(13), 2489-2500 (2004).
9. S. h. Rhee, *Biomaterials*, **25**, 1167-1175 (2004).
10. N. Miyata, K. Fuke, Qi Chen, M. Kawashita, T. Kokubo and T. Nakamura, *Biomaterials*, **23**, 3033-3040 (2002).
11. M. S. Abu Baker, P. Cheang and K. A. Khor, *J. Mater. Proce. Tech.*, **89-90**, 462-466 (1999).
12. S. W. Ha, R. Hauert, K. H. Ernst and E. Wintermantel, *Surf. & Coat. Tech.* **96**, 293-299 (1997).
13. K. H. Tan, C. K. Chua, K. F. Leong, C. M. Cheah, P. Cheang, M. S. Abu Baker. and S. W. Cha, *Biomaterials*, **24**, 3115-3123 (2003).
14. M. Kamitakahara, M. Kawashita, T. Kokubo and T. Nakamura, *Biomaterials*, **22**, 3191-3196 (2001).