

플리카프로락틴 실리카 나노 복합체를 이용한 골이식대체재 개발에 관한 연구

정근식¹ · 임성빈¹ · 정진형¹ · 홍기석¹ · 김중여²

단국대학교 치과대학 치주과학교실¹
단국대학교 치과대학 구강조직학교실²

1. 서론

구강악안면 영역의 골조직의 손상은 치주 질환, 외상, 종양이나 외과 수술 등의 원인으로 일어날 수 있다. 골 조직의 손상을 수복하는 경우나 치과 치료 술식의 일환으로 골이식대체재에 대한 요구가 커지고 있다. 골이식재는 전통적으로 자가골 이식이나 이종골 이식등을 시행하여 왔으나 공급이 원활하게 이루어지지 않거나 처리 방법에 따른 결과의 신뢰성 부족 등으로 합성골 이식재를 개발하고자 노력해왔다³⁾.

가장 많이 그리고 오랫동안 개발되고 있는 생체활성 세라믹스는 크게 인산칼슘계 및 bioglass계로 대별되는데^{4,5)} 이들은 생체와의 자발적인 반응에 의해 강하게 뼈와의 결합이 가능하고 결합에 소요되는 시간도 짧지만 인간의 뼈에 비해 상대적으로 낮은 파괴인성과 비강도에 의해 실제 골이식재로 사용할 경우 그 신뢰성이 매우 부족하다. 또한 뼈에 비해 수십 배나 높은 탄성률에 의한 압력차폐(stress shielding)효과에 의해 골흡수(osteolysis)현상이 유발되므로 생체활성은 우수하지만 그 사용처에 많은 제약을 받고 있다.

현재까지 사용해온 골이식재들의 반응을 종합하여 볼 때 골이식재로서 가장 이상적인 요구조건은 생체활성이 있어 세포의 부착 및 증식이 용이하고, 새

로운 골조직이 형성될 때까지 이식 공간을 유지시키는 틀로서 기능을 할 수 있어야하며, 새로운 골조직이 만들어지는 동안 생체 내에서 분해되어 새로이 형성되는 골조직으로 대체되어 체내에 남아있지 않는 것이다^{2, 6)}.

현재 생분해성이 발현되는 물질은 대부분 고분자에 국한되고 있는데 이러한 고분자들은 체내에 존재하는 효소에 의해 분해되는 효소 분해성 고분자(생체 고분자)와 물의 수화작용에 의해 분해되는 비효소 분해성 고분자(합성고분자)의 두 가지로 대별된다⁹⁾. 효소 분해성 고분자는 콜라겐, 젤라틴 및 고분자량의 폴리아미노산, 폴리아스파틱산 등과 같은 폴리펩타이드류, 키틴, 키토산, 덱스트란, 셀로로스 등과 같은 다당체 및 박테리아에 의해 생성되는 폴리베타하이드록실알카노에이트(PHA) 등과 같은 폴리에스터류 그리고 DNA와 같은 뉴클레오타이드 등이 존재한다.

효소 분해성 고분자의 장점은 생체친화성이 높다는 점이나 이는 반면 단점으로도 작용하여 오히려 면역반응을 유발할 수 있고 비효소 분해성 고분자에 비해 생분해 속도 및 기계적 물성을 임의적으로 조절하기가 어렵다.

비효소 분해성 고분자의 장점은 체내에서 면역반응이 적고 기계적 물성의 제어가 용이하며 용도에

교신저자: 정진형, 충청남도 천안시 신부동 산 7-1 단국대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호 : 330-716

따라 구조의 변경이 비교적 간편하다는 점이다. 비효소 분해성 고분자로서는 폴리글리코릭산(PGA), 폴리락티산(PLA), 폴리락티코글리코릭산(PLGA), 폴리말레이산(PMA) 등과 같은 폴리에스테류, 폴리디옥사논 및 폴리락티산과 폴리에틸렌글리콜 혹은 폴리프로필렌글리콜을 공중합시킨 고분자류, 그리고 폴리카프로락톤 및 폴리메타하이드록시부틸레이트 등과 같은 폴리하이드록실산 등이 존재한다.

폴리카프로락톤은 비효소 분해성 합성고분자의 일종으로서 그 구조 중에 에스테르기를 포함하고 있어서 이것이 수용액 속에 침적되었을 때 수화의 발생에 의해 에스테르기가 끊어지면서 생분해성이 발현된다⁹⁾. 현재 이 재료는 대부분 봉합사의 물질로 사용되고 있으며 이외에도 골재생용 조직공학에 이용하려는 시도가 많이 이루어지고 있다¹⁰⁻¹⁴⁾. 분자량이 큰 폴리카프로락톤의 경우, 생분해 속도가 느리기 때문에 폴리락티코글리코릭산과 혼합하여 사용되는 경우가 많다⁵⁻¹⁶⁾. 본 연구에서는 분자량이 작은 폴리카프로락톤디올을 사용하여 생분해성 속도가 기존의 제품에 비해 빠르게 하였으며 또한 실리카 전구체와 결합을 나노 스케일에서 결합시킴으로써 생체활성의 발현뿐만 아니라 생분해 속도의 조절도 가능하게 하였다¹⁷⁻¹⁸⁾.

이식재가 체내에 삽입되었을 때 표면에서 이식재의 유리물에 의한 골 흡수현상을 억제하기 위하여 이식재가 뼈와 강하게 결합할 수 있는 표면성질을 갖게 하는 생체활성이 필요하게 된다.

생체활성은 주로 바이오 글라스나 바이오 글라스 세라믹스에서 발현되어지는데 그 발현 기구는 바이오 글라스류가 체내에 삽입되었을 때 실리온 이온의 용출에 의해 글라스 표면에 실라놀 그룹이 형성하게 되고 이는 다시 뼈와 화학적 조성이 유사한 것으로 알려진 저결정성 탄산 아파타이트의 핵 형성 자리로 작용하여 글라스류 표면에 저결정성 탄산 아파타이트가 형성되면 이 층을 통하여 뼈와 강하게 화학 결합되는 것으로 알려져 있다^{5, 19)}. 이 과정 중 글라스류와 저결정성 탄산 아파타이트와의 계면에 실리카 이온의 용출에 의해 형성된 silica layer가 형성되기도 하는데 이는 두꺼워 질수록 계면강도에 부정적인 영

향을 미치는 것으로 알려져 있다. 한편, 저결정성 탄산 아파타이트가 생성되는 것을 촉진하기 위하여 칼슘을 위시하여 인 성분 등을 인위적으로 첨가하기도 하여 여러 가지 조성의 바이오 글라스 혹은 바이오 글라스 세라믹스가 개발되어 있다²⁰⁾.

이러한 생체활성 글라스나 글라스 세라믹스의 단점은 앞서 기술한 바와 마찬가지로 기계적 강도 및 인성이 낮아서 제품으로서의 신뢰성이 매우 떨어진다는 점과 탄성률이 뼈에 비해 매우 높기 때문에 골 흡수 현상을 유발한다는 점 등을 들 수 있다²⁰⁻³⁰⁾.

생체재료로 사용하기 위해서는 그 각각 기능을 구현함과 동시에 식품의약품 안전청에서 요구하는 생물학적 안전성 검사를 시행하여 적합 판정을 받아야 하며 또한 효과적으로 골형성 기능을 수행할 수 있는지를 확인해야 한다³¹⁾.

현재 사용중인 재료가 갖고 있는 단점들을 극복할 수 있는 골이식재 즉, 체내에서 생체활성이 발현되어 뼈와 강한 화학적 결합이 발생하고, 이식재와 뼈와의 계면에서 미소운동에 의한 유출물이 발생하지 않아야 하며, 동시에 기계적 물성은 뼈와 유사하여 압력차폐 현상이 발생하지 않고 골 재생과 관련된 세포들이 잘 부착하여 분화 및 증식될 수 있는 표면을 갖는 이상적인 형태의 골이식재 개발을 위하여 세라믹스가 갖고 있는 생체활성 및 강도, 고분자가 갖고 있는 연성(ductility)을 조합하여 만든 재료를 가지고 생물학적 안전성 및 효능 실험을 시행하여 평가하고자 하였다.

본 연구는 고분자의 높은 인성과 생분해성, 세라믹스의 높은 강도와 생체활성을 조합하여 시너지 효과를 낼 수 있도록 생분해성 고분자 물질로 폴리카프로락톤을 사용하였고, 생체활성을 구현할 수 있는 세라믹 물질로는 bioglass의 구성요소인 실리카 전구체를 이용하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 생체활성 및 생분해성을 갖는 폴리카프로락톤/실리카 나노복합체

화학연구소에서 제작된 여러 비율의 폴리카프로

락톤과 실리카의 나노복합체를 사용하였다. 주로 사용된 것은 폴리카프로락톤과 실리카 전구체를 무게비 60:40으로 제작한 것이며 실험방법에 따라 각각 순수 폴리카프로락톤이나 다양한 비율로 제조된 나노복합체를 사용하였다. 의사체액내에서 저결정성 탄산 아파타이트 형성을 관찰함으로써 생체활성이 있음을 확인하였다. 각 재료는 판상으로 제조하여 300-500 μm 크기로 분쇄하여 사용하였다.

2. 폴리카프로락톤/실리카 나노복합체의 안전성 시험

식품의약품안전청에서 지시하는 대로 의료용구의 생물학적 안전성에 관한 규격에 합당한지를 검사하였다 검사방법으로는 독성시험, 배양세포 증식 저해 시험, 감각시험, 무균시험, 등을 시행하였다.

1) 독성시험

60폴리카프로락톤/40실리카(무게비) 나노복합체의 추출액을 마우스 꼬리의 정맥에 0.15 ml씩 주사한 후 시간 경과에 따른 치사율과 이상 행동 변화를 관찰하여 폴리카프로락톤/실리카 나노복합체의 급성 및 아급성 독성을 확인하였다.

60폴리카프로락톤/40실리카(무게비) 나노복합체 1 g 당 ml의 생리식염수를 추출용매로 하여 37°C 항온수조에서 72시간 동안 진탕함으로써 검액을 만들었다.

생리식염수를 vehicle로, 체중 약 30 g의 균일계 수컷 마우스 5 마리씩을 한 군으로 하여 생리식염수(대조군) 또는 검액을 체중 1 kg당 5 ml의 비율로, 즉 0.15 ml씩 마우스 꼬리 정맥을 통하여 주사한 후, 주사 직후, 주사 후 1시간, 3시간, 24시간(급성), 48시간, 72시간, 및 7일(아급성)후 관찰하였는데 그 내용은 각 시간별로 나타나는 치사율과 행동의 변화(자율운동성, 공격성, 비정형성 운동, 수면이상)와 같은 독성 작용이 나타나는지 대조군과 비교하였다. 이 실험 중 급성 독성실험은 ASTM F750, 아급성 독성실험은 OECD Guideline No. 409에 따라 마우스에 정맥 주사하였다.

2) 배양세포의 증식저해시험

60폴리카프로락톤/40실리카(무게비) 나노복합체의 추출액이 포함된 세포배양액으로 세포를 배양하여 시편의 추출용매가 세포증식 및 억제에 미치는 영향을 관찰하여 본 재료의 안정성을 검사하였다.

60폴리카프로락톤/40실리카(무게비) 나노복합체를 20 ml의 증류수를 추출용매로 하여 37°C 항온수조에서 72시간 동안 진탕함으로써 시편의 검액을 만들었다.

배양세포의 증식저해 시험을 위해 사용한 세포는 독성시험에 가장 적합한 마우스의 결합조직으로부터 분리된 섬유모세포주인 ATCC 분류 CCL 1인 L929 세포를 사용하였으며 10% fetal bovine serum이 첨가된 minimum essential medium(MEM)으로 세포 배양을 시행하였다. 세포는 75 cm² 배양 플라스크에서 배양하였으며 배양액은 일주일에 2 회 교환하고 세포가 단층을 이룬 후 1 : 10으로 계대 배양하였다. 배양 시 온도는 37°C, 습도는 95 %를 유지하였고 계속하여 5 % CO₂와 95 % 공기를 공급하였다.

Cell culture flask에 단층배양중인 세포를 trypsin-EDTA로 처리하여 세포를 수집 한 후 hemocytometer로 세포 수를 계측한 다음 배양액 ml당 10⁶개의 세포가 되도록 세포현탁액을 만들었다. 추출액과 2 배 농도의 배양액을 동량 혼합하여 추출액 처리 배양액으로 하였으며, 증류수와 2 배 농도의 배양액을 동량 혼합하여 대조배양액으로 하였다.

세포현탁액 0.2 ml(2 × 10⁵개 세포) 씩을 15 개의 시험관에 넣고 그 중 5 개(처리군)에는 추출액 처리 배양액을 2 ml 씩을 넣었으며 다른 10 개 (반응개시 시의 대조군 및 72시간 대조군)의 시험관에는 대조 배양액 2 ml씩을 넣었다. 대조배양액을 넣은 시험관 중 5 개를 원심분리하여 배양액을 제거한 후 세포를 pH 7.0의 인산완충 생리식염수로 재 현탁시켰다. 이 현탁액을 다시 두 번 원심 분리하여 세포를 씻은 다음 4°C에서 보존하여 반응개시 시의 대조군으로 하였다. 처리군 및 72 시간 대조군의 10 개 시험관내의 세포들을 24-well culture flask로 옮긴 후 5 % 탄산가스 배양장치를 써서 72 시간 동안 세포배양을 시행하였다. 배양 후 세포를 수집하였고 pH 7.0 인산완

$$\text{세포중식저해율(\%)} = \left[1 - \frac{(\text{72시간처리군의 평균흡광도}) - (\text{반응개시시의 대조군 평균흡광도})}{(\text{72시간대조군의 평균흡광도}) - (\text{반응개시시의 대조군 평균 흡광도})} \right] \times 100$$

총 생리식염수 2 ml로 세포를 세 번 씻어낸 다음 처리군 및 72 시간 대조군으로 하였다. 대조군 및 처리군의 세포를 파괴한 후 총 단백질 함량을 Lowry 방법으로 측정하였다. 각 군의 총 단백질 양을 측정하고 각 군의 평균 흡광도를 구한 후 세포 중식 저해율을 다음 식에 의하여 계산하였다.

3) 감각시험

60폴리카프로락톤/40실리카(무게비) 나노복합체의 추출액(검액)을 기니-피크(guinea pigs)의 진피 내에 주사하여 감각시킨 후 patch를 적용하여 피부 감각 반응이 유발될 수 있는지 실험함으로써 본 재료의 감각 유발 가능성을 확인하였다.

실험방법으로는 60폴리카프로락톤/40실리카(무게비) 나노복합체 g 당 ml의 생리식염수를 추출용매로 하여 37℃ 항온수조에서 72 시간 동안 진탕함으로써 검액을 만들었다.

실험에 사용된 동물은 몸무게 350~400 g의 건강 한 수컷 기니-피크를 사용하였으며, 실험에 사용하기 1주일 전 실험실의 동물장에서 적응시켰으며 실험 전날 검액을 처치할 부분(몸통 또는 옆구리) 부위의 털을 동물용 면도기(animal clipper)로 깨끗이 깎고 진

피 내에 주사(intradermal injection) 하는 경우, 각 부위마다 0.1 ml 씩 주사하였고 검액을 국소적용(topical application) 하는 경우, 여과지(filter paper)를 적당한 크기(2×4 cm)로 잘라 검액에 담가 완전히 적신 후 기니-피크 몸통(등 부위)의 면도한 부위에 붙이고 검액이 증발하지 않도록 그 위에 셀로판지를 덮고 접착테이프로 고정(occlusive dressing) 하였다. 실험군으로 10 마리의 기니-피크, 대조군으로 5 마리의 기니-피크를 사용하였다.

(가) Intradermal induction phase

그림 1과 같이 면도한 각각의 기니-피크의 양쪽 견갑골 사이에 위치한 주사부위 (a, b, c)에 다음 각각의 약물들을 0.1 ml 씩 진피 내에 주사하였다.

- ① Freund's complete adjuvant와 주사용 증류수를 50:50 (용적/용적)으로 섞은 용액들을 주사하였다.
- ② 실험군에는 10%의 검액만을 주사하고, 대조군에는 생리적 식염수만을 주사하였다.
- ③ 실험군에는 10%의 검액과 Freund's complete adjuvant를 50:50 (용적/용적)으로 섞은 용액들을 주사하고, 대조군에는 생리적 식염수와

Table 1. Classification system for skin reactions

Reaction	Numerical grading
Erythema and eschar formation	
No erythema	0
Slight erythema	1
Well-defined erythema	2
Moderate erythema	3
Severe erythema to slight eschar formation	4
Oedema formation	
No oedema	0
Slight oedema	1
Well-defined oedema	2
Moderate oedema	3
Severe oedema	4

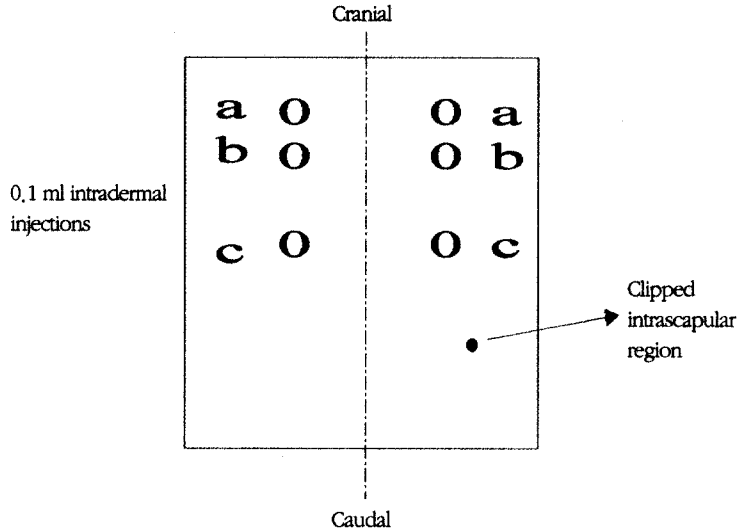


Figure 1. location of intradermal injection sites

Freund's complete adjuvant를 50:50 (용적/용적)으로 섞은 용액들을 주사하였다.

(나) Topical induction phase

위의 intradermal induction phase 반응 검사가 끝난 지 7 일 후, 각각의 동물의 견갑골에 진피 내 주사 부위가 모두 포함되도록 20 mm × 40 mm 크기의 filter paper에 10% 검액을 흠뻑 적신 다음 적용하고 증발하지 않도록 occlusive dressing을 한다. 48 ± 2 시간에 dressing과 patches를 제거하고 반응을 관찰한다. 대조군에서는 검액 대신 생리적 식염수만을 사용하며 다른 처치과정은 동일하다.

(다) Challenge phase

위의 topical induction phase 반응 검사가 끝난 지 14 일 후 실험에 사용한 모든 실험군과 대조군에 대하여 본 검사를 실시하였다. 10% 검액을 각각의 동물의 옆구리에 0.1 ml씩 주사한 후 10% 검액을 적신 patches를 붙이고 occlusive dressings을 시행하였다. 24 ± 2 시간 경과한 다음 dressings와 patches를 떼어내고 결과를 관찰하였다.

4) 무균시험

60폴리카프로락톤/40실리카(무게비) 나노복합체의 생물학적 안정성, 유효성 확인을 위한 시험으로 다음의 배양법으로 증식되는 미생물(세균, 진균)의 유무를 확인하기 위해 본 시험을 실시하였으며, 본 시험은 대한약전(제 6 개정) 일반 시험법의 무균 시험법에 따라 세균 및 진균 시험을 직전법으로 수행하였다.

본 시험에 사용한 배지 및 그 조성은 table 2와 같다. 세균을 검출하기 위한 무균 시험용 치오글리콜산 배지(Brewer Thioglycollate Medium®)는 물 200 ml에 beef, Infusion, sodium chloride, dipotassium phosphate, protease peptone, bacto dextrose, bacto agar, bacto methylene blue를 넣고 수욕상에서 가온하여 녹인 다음 sodium thioglycollate을 넣어 녹인 후 test tube(25×200mm)에 각각 40 ml 씩 나누어 넣고 고압증기멸균기를 써서 121℃에서 15 분간 가열하여 멸균한 다음 곧 상온에서 식힌 다음 본 시험에 사용하였다.

진균 검출을 위한 무균시험용 포도당·펩톤배지는 물 200 ml에 KH₂PO₄, MgSO₄, peptone, yeast extract 및 포도당을 넣고 수욕상에서 가온하여 녹인

Table 2. Chemical composition of medium

(Brewer Thioglycollate Medium [®])	
Beef, Infusion	500 g
Sodium Chloride,	5.0 g
Dipotassium Phosphate	2.0 g
Protease Peptone,	10 g
Bacto Dextrose	3.0 g
Bacto Agar	0.5 g
Bacto Methlene Blue	0.002 g
Sodium Thioglycollate	0.5 g
D,W	1 L
(Glucose · Peptone Medium [®])	
KH ₂ PO ₄	1.0 g
MgSO ₄	0.5 g
Peptone	5.0 g
Yeast extract	2.0 g
Glucose	20.0 g
D,W	1 L

Table 3. Volume of specimen

Bancterial test			Fungus test		
Per 1 test tube		Number of test tube	Per 1 test tube		Number of test tube
quantity of specimen	quantity of Medium		quantity of specimen	quantity of Medium	
1 ml	40 ml	3	1 ml	40 ml	3

후에 test tube(25×200mm)에 각각 40 ml 씩 나누어 넣고 고압증기멸균기를 써서 121℃에서 15 분간 가열하여 멸균한 다음 곧 상온에서 식힌 다음 본 시험에 사용하였다.

무균시험용 치오글리콜산배지(Brewer Thioglycollate Medium[®])는 30℃에서 5 일간, 무균시험용 포도당·펩톤배지는 25℃에서 6 일간 보존 한 뒤 혼탁, 침전물의 생성 또는 기타의 이상이 나타나지 않았음을 확인 후 사용하였고, 또 배지가 미생물의 발육에 만족할 만한 상태에 있는가를 시험하기 위하여 본 시험에 사용한 배지의 일부를 취하여 무균시험용 치오글리콜산배지(Brewer Thioglycollate Medium[®])에는 *E. coli* DH5 α 를 접종하여 뚜렷하게 발육하는 것을 확인하였고, 포도당·펩톤배지는 직접 공기 중에 방치하여 여러 곰팡이들이 발육하는 것을 확인하였다.

검액의 조작은 table 3과 같이 배지에 넣어 검액으로 사용하였다.(Table 3) 본 시험의 전 과정은 무균

조작으로 수행하였으며 검액은 배지와 잘 섞고 세균 시험은 30℃에서 6 일간, 진균시험은 25℃에서 6 일간 배양하였다. 그리고 진균시험에서 25 mm × 200 mm 시험관을 사용하였기 때문에 수평면에 대하여 각도 20 ~ 30°의 경사를 유지한 상태로 배양하였다.

3. 폴리카프로락톤/실리카 나노복합체의 곰모세포 활성화 시험

곰모세포 활성화 시험은 체내 이식되었을 때 재료에 곰모세포의 부착이나 증식 정도를 알아보기 위해서 시험관내에서 곰모세포를 이용하여 부착과 증식 정도를 알아보고 유전자 발현 양상을 관찰하였다. 곰모세포 부착시험은 시험관내에 곰모세포를 부착하고 2시간, 6시간 후에 미부착세포를 제거하고 부착세포의 단백질 양을 측정하여 비교하였다. 곰모세포 증식시험은 부착된 곰모세포가 재료 위에서 증식하

는 정도를 알아보기 위하여 배양 1일과 4일 후에 MTT assay 방법으로 측정하여 비교하였다. 세포분화 유전자 발현 시험은 골모세포에서 생성되는 alkaline phosphatase, osteocalcin, cbfa1 유전자 발현을 역전사 중합반응방법(RT-PCR)으로 연구하였다. 배양한 세포의 총 RNA를 분리하여 역전사 효소(Gibco, U.S.A.)를 첨가하여 일차 염기 cDNA(first strand cDNA)를 합성하였다. GAPDH 유전자는 대조군과 상대적인 비교 분석을 하기 위해서 참고 유전자로 사용하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 사용하여 PCR을 진행하고 증폭된 유전자는 EtBr 염색을 통해 확인하였다.

1) 세포부착

MC3T3-E1, MG63, ROSS osteoblast cell line을 60,000개/well (24 well dish)에 넣고 지정한 시간동안 10% FBS와 함께 DMEM에서 배양한다. 부착세포 수를 count 하기 위해 부착하지 않은 세포를 HBSS로 수세하여 제거하고 0.2 N NaOH로 세포를 용해시켜 총 단백질양을 측정하였다. 단백질 양은 세포 용해액에 Bio-Rad protein assay solution을 1:5 희석액으로 반응시킨 후 총 단백질 양을 595 nm에서 측정하였다.

2) 세포증식

세포 증식율은 노란색의 수용성 MTT가 살아있는 cell의 미토콘드리아에 흡수되면 불용성의 어두운 청색 formazan으로 변하는 원리를 이용하여 측정하였는데 우선 24 well plate에 한 well 당 1×10^4 cell을 cell을 seeding하고 positive control은 cell과 media를 negative control로는 media만을 사용하여 1, 4 일간 배양하였다. 각 시간 별로 배양이 완료된 시편은 50

μ /well의 양으로 MTT solution을 첨가하고 4 시간 동안 incubation을 행한 뒤, supernatant는 조심스럽게 제거한 후 150 μ 의 DMSO를 각 well당 첨가한 후 실온에서 10 분동안 shaking 하였다. 그 후 540 nm 에서 ELISA reader를 이용하여 값을 측정하였다.

3) 세포분화 유전자 발현

골모세포에서 생성되는 alkaline phosphatase, osteocalcin, cbfa1 유전자 발현을 역전사 중합반응방법(RT-PCR)으로 연구하였다. 배양한 세포의 총 RNA를 Easy Blue(INTRON, U.S.A.)TM를 사용하여 분리하였다. 총 RNA 3~5 μ g과 oligo(dT) primer 0.5 μ g을 혼합하여 70 $^{\circ}$ C에서 10 분간 반응시키고 얼음 위에서 5 분간 보관하였다. 40 mM DTT, 0.5 mM dNTP mix, 1X first buffer(50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂)와 200 unit의 역전사 효소(Gibco, U.S.A.)를 첨가하여 42 $^{\circ}$ C에서 50 분, 70 $^{\circ}$ C에서 15 분간 반응시켜 일차 염기 cDNA(first strand cDNA)를 합성하였다. 합성된 cDNA에 0.5 unit의 RNase를 첨가하여 20 분간 37 $^{\circ}$ C에서 반응시켜 RNA를 제거하였다. GAPDH 유전자는 대조군과 상대적인 비교 분석을 하기 위해서 참고 유전자로 사용하였다.

합성된 cDNA를 주형으로 사용하여 1X PCR reaction buffer(20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP mix, primer(10 pmol/ μ) 1 μ 와 Taq polymerase(Gibco, U.S.A.) 5 unit을 혼합하여 PCR을 진행하였다. PCR은 최초 95 $^{\circ}$ C에서 5 분간 변성시킨 다음, 95 $^{\circ}$ C에서 30 초, 55 $^{\circ}$ C에서 30 초, 72 $^{\circ}$ C에서 1 분간의 반응을 32 ~ 35회 반복하였고, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 10 분간 반응시켰다. 증폭된 유전자는 1.5% 아가로즈 겔상에서 전기영동하여 EtBr 염색을 통해 확인하였다(Table 4).

Table 4. Base sequence of primer

	upstream	downstream
Osteocalcin	5-ATGAGAGCCCTCACACTC-3'	5' CTAGACCGGGCCGTAGAA-3'
GAPDH	5' -CAACTCCTCAAGATTGTGACG-3'	5' -GGGAGTTGCTGTTGAAGTCACA-3'
alkaline phosphatase	5' -GACTGGTACTCGGATAA-CGAGATGC-3'	5' -GACTGGTACTCGGATAA-CGAGATGC-3'
cbfa1	5' -GAGGGCACAAGTTCTATCTGGA-3'	5' -GGTGGTCCGGATGATCTC-3'

4. 폴리카프로락톤/실리카 나노복합체의 골형성 능 시험

실험에 사용한 동물은 몸무게 2.5kg 내외의 건강한 뉴질랜드산 토끼 12마리이다.

두개부 골 결손부를 형성하기 위하여 Ketamine (Ketara 100mg/kg) 과 2% Xylazine (Rompun 0.15ml/kg)로 전신마취 후 통법에 따라 제모 및 술전 무균처리(10% povidone-iodine scrub followed by a 70% alcohol wipe)를 시행한 후 수술도로 두개부 정중부를 절개하여 피부를 거상하였으며 다시 하방의 골막을 조심스럽게 절개를 가하여 두개골 표면에서 분리하였다. 지름 4mm의 trephine bur로 두개골 봉합선을 따라 4개의 결손부를 형성하였다. 골사제 시 열 발생을 방지하기 위해 식염수를 주사하면서 시행하였다. 대조군은 결손부를 형성하고 어떤 재료도 채워넣지 않고 그대로 봉합하였으며, 실험군은 #159(PCL-2000: PTS+TEOS, 60:40, Ca=0.3), #168(PCL-2000: ZPTS+TEOS-60:40, Ca=x),

#218(PCL-200: ZPTS+TEOS-40:60, Ca=0.15), #219(PCL-2000; ZPTS+TEOS-60:40, Ca=0.15)를 각각 충전한 후 골막과 피부를 층별 봉합하였다.

조직표본제작은 실험 개시 1, 4, 8주 후에 희생하여 골결손부를 포함하는 두개골을 채취하여 즉시 Bouin's Solution에 고정하고 5% Nitric acid로 탈회하였다. 충분히 탈회가 이루어진 뒤 통법에 따라 탈수 과정을 거쳐 파라핀에 포매하여 4 μ m의 박절표본을 제작 Hematoxylin-eosin 염색 또는 Gomori's trichrome 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

III. 연구결과

1. 폴리카프로락톤/실리카 나노복합체의 생체활성 시험

제조된 폴리카프로락톤/실리카 나노복합체의 생체활성 시험은 가장 나노복합화가 잘 이루어졌던 60 폴리카프로락톤/40실리카(무게비) 시편을 이용하였

Figure 2. Microstructure of pure polycaprolacton and 60polycaprolacton/40silica nanocomplex infiltrated for 1 week in artificial body fluid

Figure 3. Magnified microstructure of Figure 2

으며 지름 1 cm, 두께 약 2 mm의 원반형 시편을 가공하여서 1.0배 의사체액 속에 각 시간 별로 침적시킨 후 표면에 저결정성 탄산 아파타이트의 생성여부를 관찰하였다.

순수한 폴리카프로락톤의 경우는 표면에 저결정성 탄산 아파타이트가 전혀 발생하지 않았음을 확인할 수 있었다. 반면 60폴리카프로락톤/40실리카(무게비) 시편의 경우는, 거친 표면구조에서 반원형의 많은 작은 결정들이 발생한 것이 관찰되어지는데, 다른 생체활성 재료들이 의사체액 중에 침적 후 보여지는 미세구조와 같은 미세구조를 갖고 있는 것을 알 수 있었다(Figure 2, 3).

의사체액 중에 침적 후의 FT-IR 결과로서 PO₄ 이온의 asymmetrical stretching(ν_3)과 bending(ν_4) 모드가 1033, 603과 563 cm⁻¹에서 각각 관찰되어 지고

Figure 4. Result of 60polycaprolacton/ 40silica nanocomplex before and after soaked in artificial body fluid via FT-IR

PO₄ 이온의 symmetric stretching modes(ν_1 and ν_2) 역시 962 and 472 cm⁻¹ 부근에서 각각 관찰되어 졌다. CO₃ ion의 두 개의 stretching과 한 개의 out-of-plane modes는 각각 1458, 1420과 874 cm⁻¹에서 관찰되는 것으로 미루어 보아 복합체의 표면에 형성된 결정은 아파타이트의 구조 중 PO₄ 자리에 탄산이온이 치환된 저결정성 탄산 아파타이트인 것을 확인할 수 있었다(Figure 4).

2. 폴리카프로락톤/실리카 나노복합체의 안정성 시험

1) 독성시험

60폴리카프로락톤/40실리카(무게비) 나노복합체로부터 추출한 검액을 마우스의 꼬리 정맥에 주사하

Table 5. The result of injection for each animal (○ : live, X : die)

individuality	1	2	3	4	5
control group	○	○	○	○	○
after injection	○	○	○	○	○
1 hour after injection	○	○	○	○	○
3 hours after injection	○	○	○	○	○
24 hours after injection	○	○	○	○	○
48 hours after injection	○	○	○	○	○
72 hours after injection	○	○	○	○	○
7 days after injection	○	○	○	○	○

었고, 주사 직후와 주사 후 1, 3, 24, 48, 72시간 및 7일에 관찰한 결과 사망하거나 행동의 변화를 보인 마우스는 한 마리도 없는 것으로 관찰되었다(Table 5).

검액의 전신투여(systemic administration) 시 나타날 수 있는 급성(주사 후 24 시간 이내), 또는 아급성(주사 후 7 일 이내) 독성의 가능성을 판정하기 위하여 마우스 꼬리 정맥으로 정맥 주사하여 실험한 결과 검액은 전신적으로 투여하거나 국소적으로 처치 후 전신적으로 흡수되더라도 급성 및 아급성 독성을 나타낼 가능성은 거의 없었다.

2) 배양세포증식저해 실험

60폴리카프로락톤/40실리카(무게비) 나노복합체로부터 추출한 검액을 포함한 세포배양액으로 세포를 배양하여 시편의 추출용매가 세포증식 및 억제에 미치는 영향을 관찰하여 본 제품의 안정성을 검사하고자 시험을 시행하였다. 섬유아세포인 L929를 이용하여 실험한 대조군과 실험군의 비교 사진으로서 두 개체간의 차이가 발견되어지지 않는다(Figure 5). 대

조군 및 처리군의 세포를 파괴한 후 총 단백질 함량을 Lowry 방법으로 측정하였는데 각 군의 총 단백질 양을 측정하고 각 군의 평균흡광도를 구한 후 세포증식 저해율을 다음 식에 의하여 계산한 결과, 72시간처리군의평균흡광도=0.745, 72시간대조군의평균흡광도=0.675, 반응개시시의평균흡광도=0.301을 삽입한 결과, 세포증식 저해율=-18.7%로서, 이 시험결과를 볼 때 60폴리카프로락톤/40실리카(무게비) 나노복합체의 추출액은 L929 세포의 세포증식을 저해하지 않을 뿐만 아니라 오히려 약간의 세포증식 촉진 효과가 있었다.

3) 감각실험

(가) 예비실험

본 실험에 사용될 검액의 농도를 결정하기 위하여 예비실험을 수행하였으며 예비실험에서 10 %, 1 %, 및 0.1 %의 검액을 주사한 2 마리씩의 각 군과 국소 적용한 3 마리씩의 각 군의 적용부위에 아무런 변화가 나타나지 않았으므로 즉, 홍반(erythema) 및 부종

Figure 5. Result of cytotoxic test using test fluid of 60polycaprolacton/40silica nanocomplex(a) control group, (b) test group

(edema)을 Table 1에서와 같은 정도 판정방법에 따라 평가하였을 때 grade 0이었으므로 가장 높은 농도인 10% 검액을 본 실험에 이용하는 것으로 결정하였다.

(나) 본 실험

① Intraderal induction phase

Figure 1과 같이 면도한 각각의 기니-피크의 견갑골 사이에 순서대로 (a, b, c)에 다음 각각의 약물들을 0.1 ml씩 양쪽에 대칭으로 진피내 주사하였다.

- ㉞ Freund's complete adjuvant와 주사용 증류수를 50:50 (용적/용적)으로 섞은 용액.
- ㉟ 실험군에는 10%의 검액만을 주사; 대조군에는 생리적 식염수만을 주사.
- ㊱ 실험군에는 10%의 검액과 Freund's complete adjuvant를 50:50 (용적/용적)으로 섞은 용액들을 주사; 대조군에는 생리적 식염수와 Freund's complete adjuvant를 50:50 (용적/용적)으로 섞은 용액들을 주사.

실험군의 경우, a에서는 20 부위 중 2, b에서는 부종이나 홍반을 보인 부위는 없었으며, c에서는 20 부위 중 2군데에서 grade 1의 홍반을 보였으며 부종을 보인 부위는 없었다. 대조군의 경우, a에서는 10 부위 중 2, b에서는 부종이나 홍반을 보인 부위는 없었으며, c에서는 10 부위 중 1군데에서 grade 1의 홍반을 보였으며 부종을 보인 부위는 없었다. 따라서 실험에 사용된 검액에 의하여 Intraderal induction phase에서는 아무런 감각반응이 일어나지 않음을 확인할 수 있었다.

② Topical induction phase

위의 intraderal induction phase 7 일 후, 각각의 동물의 견갑골에 진피 내 주사 부위가 모두 포함되도록 10% 검액으로 적신 filter paper로 patches와 occlusive dressing을 하고 48 시간 경과 후 dressing과 patches를 제거하고 반응을 관찰한 결과 a에서는 20 부위 중 2, b에서는 부종이나 홍반을 보인 부위는 없었으며, c에서는 20 부위 중 2군데에서 grade 1의 홍반을 보였으며 부종을 보인 부위는 없었다.

대조군에서는 검액 대신 생리적 식염수를 사용하였으며 dressing과 patches를 제거하고 반응을 관찰한 결과 a.에서는 10 부위 중 2, b에서는 부종이나 홍반을 보인 부위는 없었으며, c에서는 10 부위 중 1군데에서 grade 1의 홍반이 관찰되었으나 부종을 보인 부위는 없었다.

이러한 결과는 본 검체에 의하여 topical induction phase에서 감각반응이 유발되지 않았음을 의미한다.

③ Challenge phase

위의 topical induction phase 반응 검사 14일 후 실험에 사용한 모든 실험군과 대조군에 대하여 검액을 각각의 동물의 옆구리에 0.1 ml 씩 주사한 후 10% 검액을 적신 patches를 붙이고 occlusive dressings을 시행하고 24 시간이 경과한 다음 dressings과 patches를 떼어내고 결과를 관찰한 바 15마리의 동물 모두에서 어떠한 홍반이나 부종도 유도되지 않았다. 따라서 실험에 사용된 검액에 의하여 challenge phase에서도 아무런 감각반응이 일어나지 않음을 확인할 수 있었다.

이상의 결과로 볼 때, Intraderal induction phase와 topical induction phase에서 실험군 및 대조군 15 마리 중 일부에서 grade 1의 홍반을 보였으나 대조군들과 비교할 때 검액에 의한 감각 반응이라고 할 수 없다. Challenge phase에서도 15 마리의 동물 모두에서 어떠한 홍반이나 부종도 유도되지 않았다. 따라서 본 실험과 같은 maximization sensitization test에서도 사용된 검액에 의하여 intraderal induction phase, topical induction phase, 및 challenge phase에서 감각반응이 나타나지 않으므로 이 물질에 의한 감각반응의 유발 가능성은 거의 없다고 할 수 있다.

4) 무균실험

60폴리카프로락톤/40실리카(무게비) 나노복합체의 생물학적 안정성, 유효성 확인을 위한 시험으로 대한약전(제 6 개정) 일반 시험법의 무균 시험법에 따라 세균 및 진균 시험을 직전법으로 수행하였다.

검액을 배양한 후 배지성능시험용 시험관 (3 번, 6 번)을 제외한 모든 시험관에서 균이 발육되지 않았

Table 6, Result of test for sterility

Test tube number Result	Fungus test			Bacteria test		
	1	2	3	4	5	6
	X	X	O	X	X	O

Number 1 test tube: Only medium
 Number 1 test tube: polycaprolaton/silica complex medium
 Number 1 test tube: Only medium(air exposed)
 Number 1 test tube: polycaprolaton/silica complex medium
 Number 1 test tube: Only medium
 Number 1 test tube: Only medium(bacteria inoculation)

다(Table 6).

따라서 60폴리카프로락톤/40실리카(무게비) 나노복합체의 생물학적 안정성·유효성 확인을 위한 시험으로 미생물(세균, 진균)의 유·무의 확인을 위하여 수행한 결과 세균 및 진균이 발육되지 않았다.

3. 폴리카프로락톤/실리카 나노복합체의 골모세포 활성화 시험

1) 골모세포 부착시험

골세포 시험은 골모세포의 부착, 증식 및 부착분자 활성화의 데이터 베이스 구축으로 이루어졌으며 골세포의 부착 시험은 단백질 정량법으로 수행하였다.

60폴리카프로락톤/40실리카(무게비) 나노복합체 및 폴리카프로락톤 위에서 2 시간 동안 골모세포를 부착시킨 후 표면에 부착한 세포 수를 단백질 양으로 측정

로 측정한 결과로서 초기 2 시간 동안은 모두 세포배양접시에 비해 부착도가 낮았고 60폴리카프로락톤/40실리카 군이 폴리카프로락톤에 비해 부착도가 낮았다(Figure 6).

60폴리카프로락톤/40실리카(무게비) 나노복합체 및 폴리카프로락톤 위에서 6 시간 동안 골모세포를 부착시킨 후 표면에 부착한 세포 수를 단백질 양으로 측정한 결과로서 2 시간에 비해 세포 부착도가 증가하여 세포배양접시에 근접하거나 60폴리카프로락톤/40실리카 군의 경우는 부착도가 세포배양접시보다 오히려 약간 높았다(Figure 7).

MG63 cell line을 사용하여서 60폴리카프로락톤/40실리카(무게비) 나노복합체위에서 6 시간 동안 배양한 후 표면에 부착한 세포를 주사전자현미경으로 관찰한 결과로서 많은 수의 세포가 표면에 부착한 것이 관찰되었다(Figure 8). 확대해 보면 표면에

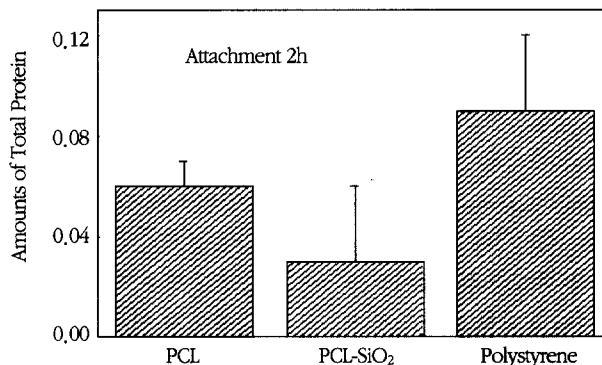


Figure 6, Result of the test for attaching osteoblast to the 60polycaprolacton/ 40silica(Wt) nanocomplex for 2 hours

Amounts of Total Protein

Figure 7. Result of the test for attaching osteoblast to the 60polycaprolacton/ 40silica(Wt) nanocomplex for 6 hours

Figure 8. Result of MG63 cell attached to surface after cultured for 6 hours on the 60polycaprolacton/40 silica(Wt) nanocomplex via SEM

Figure 9. High-magnificant picture of Figure 8

Optical Density

Polycaprolactone (in wt,%)

Figure 10. Result of the attachment test for high molecular weight polycaprolacton/silica complex through the change of silica content

Figure 11. Result of the test for MC3T3C-E1 cell cultured for 24hours on the 60polycaprolacton/40 silica(Wt) nanocomplex

Optical Density

60Polycaprolactone/40silica (in wt.%)

Figure 12. Proliferation test for osteoblast of 60polycaprolacton/40 silica (Wt) nanocomplex(1 day)

부착한 세포는 표면에 밀착하여 세포체가 잘 퍼져 (spreading)있는 것을 알 수 있었다(Figure 9).

분자량 80,000의 폴리카프로락톤을 이용하여 첨가 되는 실리카의 무게비를 달리하여 폴리카프로락톤/ 실리카 복합체를 제조한 뒤 골모세포 부착실험을 한 결과이다. 순수한 폴리카프로락톤의 경우 control로 사용한 세포배양접시에 비해 오히려 조금 높은 값을 보였고 나머지 시편들은 서로 유사한 값들을 보였다. 세포배양접시가 세포의 부착을 이상적으로 잘되 게 처리하였다는 점을 고려할 때 본 연구에서 제조 된 시편들의 골모세포 부착률은 매우 양호하다는 것 을 알 수 있었다(Figure 10). MC3T3C-E1 세포를 60

폴리카프로락톤/40실리카(무게비) 복합체 위에 24 시간 동안 배양한 결과로서 spreading이 잘되어 있는 것이 관찰되어 진다(Figure 11).

2) 골모세포 증식시험

골모세포의 증식시험은 1일과 4일간 행한 후 MTT 방법으로 골모세포의 증식정도를 측정하였다. 실험 에는 60폴리카프로락톤/40실리카(무게비) 복합체를 염산, 암모니아수, 증류수 속에서 각각 후 처리한 시 편들을 사용하였다. 1 일간 골모세포의 증식실험을 한 결과로서 대조군으로 사용된 세포배양접시에 비 해 3 시편 모두 약 40 % 정도의 증식도를 보여 골모

Optical Density

60Polycaprolactone/40silica (in wt.%)

Figure 13. Proliferation test for osteoblast of 60polycaprolacton/40 silica(Wt) nanocomplex (4 day)

Figure 14. Result of differentiating gene expression test for osteoblast via RT-PCR

세포의 초기 증식이 세포배양접시에 비해 크게 좋지 않음을 알 수 있었다(Figure 12).

같은 시편들을 4 일간 증식 실험한 결과로서 1 일간 증식 실험하였던 Figure 12의 결과와는 달리 세포 배양접시에 비해 100 %이상 높은 증식도를 보였다. 따라서 이상의 결과로 볼 때 폴리카프로락톤/실리카 나노복합체의 경우 초기 부착 및 증식 효과는 크지 않지만 시간이 지날수록 골모세포의 부착 및 증식효과가 뛰어난 재료임을 알 수 있었다(Figure 13).

3) 세포분화유전자 발현

세포분화 관련 유전자인 cbfa1 및 초기분화표지인

자인 염기성인산분해효소(alkaline phosphatase)와 후기분화표지인자인 osteocalcin 및 참조유전자인 GAPDH에 대한 mRNA 분석을 배양접시표면에서 RT-PCR로 확인하였다(Figure 14).

4. 폴리카프로락톤/실리카 나노복합체의 골형성능 시험

1) 대조군

두개골에 골 결손부를 형성하고 아무것도 채워 넣지 않은 대조군에서는 1주에 전체적으로 기존 골조직과 신생골의 경계가 명확하게 구별이 되며 신생골

은 결손부 가장자리에서 교직골의 형태로 소량 형성 되었음을 관찰 할 수 있었으며 결손부의 중앙부위에는 결합조직으로 연결되어있었다. 결손부 초기 골 치유과정에 발현되는 신생 모세혈관의 분포가 미약하였다(Figure 15). 대조군 4주에서는 결손부 중앙부위를 향해서 자라 들어온 원추형의 신생골로 결손부의 크기가 줄어들었음을 관찰할 수 있었다. 그러나 신생골은 기존 두개골의 형태와는 다르게 중앙에 골수강이 있는 형태가 아니고 단일 골편으로 되어있었다(Figure 16). 대조군 8주에서는 골결손부의 아주 작은 부분만을 제외하곤 신생골의 형성으로 채워졌다. 그러나 아직 피질골의 형태는 갖춰지지 못하고 골수강이 많은 소주골의 형태를 띠고 있다(Figure 17).

2) 실험군 #159 : 60Poly(e-caprolactone)/40TEOS (wt. %), Mole ratio Ca/Si=0.3

결손부에 #159를 채워넣고 1주 후 소견에서는 골결손부내에 채워져있는 이식재를 관찰할 수 있었으며 이식재가 결손부에 밀착되어있는 경우 결손부의 경계는 명확하며 신생골의 형성이 적었으나 이식재가 골결손부에서 떨어져있는 경우 신생골의 형성이 결손부 내부로 진행되어있고 이식재를 둘러싸고 신생골이 형성되어있었다(Figure 18). 4주에서는 이식재가 비교적 한쪽으로 치우쳐있는 것을 볼 수 있었는데 이식재가 없는 부분에는 신생골 형성이 대조군과 유사한 양상으로 형성되어있었으며 이식재 주변으로 형성된 신생골이 많았으며 또한 이식재와 무관하게 독립적으로 신생골이 형성되는 것을 관찰할 수 있었다. 일부 이식재 주변으로 다핵거대세포가 둘러싸고 있는 것을 관찰 할 수 있었으며 이는 결손부의 중앙부위에서 더 많이 관찰할 수 있었으며 탈회되었거나 이식재가 떨어진 부위 사이로 거대세포가 관찰되는 것으로 보아 이식재 사이로 세포가 파고들면서 흡수가 일어나는 것이라고 추정되었다(Figure 19). 8주에서는 4주와 큰 차이가 없었으나 골결손부에서 골막이 있는 하방 부위에서는 거의 연결되어서 신생골 형성이 이루어졌고 이식재 주변으로 다핵거대세포가 둘러싸고 있으나 신생골 형성에는 지장을 받지 않았다(Figure 20).

3) 실험군 #168 : 60Poly(e-caprolactone)/40TEOS (wt. %), Mole ratio Ca/Si=0

1주에서 8주까지 이식재가 잘 보존되어있는 것을 관찰할 수 있었다. 시간이 경과함에 따라 골결손부의 변연부에서부터 중앙부를 향하여 신생골 형성이 진행되어있으나 이식재가 뻑뻑하게 밀집되어있어 신생골의 양은 그리 많지 않았다. 그러나 골결손부의 형태를 변형시키지 않으면서 공간을 채우고 있었다(Figure 21-23).

4) 실험군 #218 : 40Poly(e-caprolactone)/60TEOS (wt. %), Mole ratio Ca/Si=0.15

동물에 따라 반응이 다양하게 나타났다. 전 실험기간에 걸쳐 다핵세포와 염증세포가 심하게 침윤되어있는 개체도 있었으며 이식재가 녹았는지 아니면 빠져나갔는지 정확하게 추정할 수는 없지만 골형성이 많이 진행된 것도 있었다. 그러나 형성된 골조직은 이식재와 무관하게 생성된 것이며 이식재를 둘러싸고 있는 다핵 거대세포와 결합조직 섬유들로 결손부 내부가 채워져 있었다(Figure 24-26).

5) 실험군 #219 : 60Poly(e-caprolactone)/40TEOS (wt. %), Mole ratio Ca/Si=0.15

1주군에서도 다른 군에 비해 신생골의 양이 많았으며 4주, 8주군에서도 골형성은 활발히 진행되어 있다. 그러나 이식재 자체는 다핵세포에 둘러싸여있으며 신생골 조직안에 매립되어있는 이식재도 다핵세포에 의해 점거되어 직접 골조직과 접촉되어있지 않는 부분이 많았다. 이식재의 표면에 인접하여 신생혈관의 발달을 볼 수 있었다(Figure 27-29).

IV. 총괄 및 고찰

생분해성 고분자류는 체내에서 분해되지 않고 잔류되는 비분해성 고분자류에 비해 생체재료로 선호되어 봉합사를 위시하여 골 고정용 핀, 나사, 플레이트, 접착제, 서방형 약물 전달 시스템의 재료 및 조직공학용 스캐폴드 등 다양한 용도로 널리 사용되고 있다³²⁾. 그러나 이를 골대체재의 용도로 사용하고자

할 때의 단점은 비분해성 고분자와 마찬가지로 생체 활성이 전혀 없다는 점이다. 즉, 체내에서 뼈와의 자발적인 결합이 이루어지지 않을 뿐만 아니라 하중을 지탱하기에 적합하지 않은 기계적 물성을 보인다.

한편, 생체활성을 촉진하기 위하여 칼슘을 위시하여 인 성분 등을 인위적으로 첨가하기도 하여 여러 가지 조성의 바이오 글라스 혹은 바이오 글라스 세라믹스가 개발되어 있다²⁰⁾.

최근 이러한 생분해성 고분자를 이용하여 골이식 대체재를 개발하고자 시도하고 있다. 고분자의 강도 증강이나 골형성능을 유발시키기 위해 칼슘인회석을 혼합하여 제작하기도 하며 조직공학 기법을 이용하여 골모세포의 담체로 사용하기도 한다³³⁻³⁵⁾.

본 연구에 사용된 재료는 이 등¹¹⁻¹²⁾이 제조한 물질로서 저, 중, 고분자량의 폴리카프로락톤을 사용하여 생체활성 및 생분해성을 갖는 폴리카프로락톤/실리카 나노복합체를 성공적으로 제조하였다. 나노복합화에 대한 평가는 FE-SEM을 이용하여 실리카와 폴리카프로락톤이 실제로 나노스케일에서 잘 분산되어 하이브리드화가 이루어졌는가와 성형체의 투명도로 확인하였다. 또한 FT-IR, XPS, ²⁹Si-NMR, 및 접촉각 측정을 통하여 벌크 및 표면성질을 확인하였고, 그 결과 폴리카프로락톤/실리카 나노복합체는 표면에 실라놀 그룹이 많이 형성되어서 순수한 폴리카프로락톤에 비해 효과적으로 물에 대한 접촉각이 낮아짐을 확인하였다.

생체활성 시험은 의사체액을 이용하여 행하였으며, 그 결과 침적 9 시간 후부터 표면에 뼈와 화학적·결정학적 조성이 유사한 저결정성 탄산 아파타이트가 생성됨을 확인할 수 있었다. 또한 생체활성 시험 후 의사체액 중의 무기이온 농도와 pH의 변화를 측정함으로써 아파타이트에 대한 ionic activity product를 구할 수 있었으며 이 값은 기존의 생체활성 재료에 비해 매우 높은 값을 나타내어서 실제 생체내에서도 뼈와 효과적으로 결합이 이루어질 것이라고 예상하였다.

본 연구에서는 이러한 재료들의 안전성 시험을 위하여 독성, 배양세포증식저해성, 감각, 무균시험을 행하였으며 모든 안전성 시험에서 우수한 성적으로

통과하여 생체재료로서의 안전성을 확보하였다. 또한 골모세포를 이용하여 부착 및 증식 시험결과, 초기 부착 성적은 대조군으로 사용한 세포배양접시에 비해 약간 저조하였으나 시간이 경과함에 따라 매우 우수한 부착 및 증식시험 결과를 보여주었다.

이상의 결과로부터 폴리카프로락톤/실리카 나노복합체에 대한 골모세포 부착정도는 초기에는 순수한 폴리카프로락톤에 비해 그 부착 정도가 낮으나 시간이 경과함에 따라 순수한 폴리카프로락톤이나 대조군으로 사용한 polystyrene dish에 비해 그 부착의 정도가 높아지는 것을 알 수 있었다. 부착된 세포는 세포부착기구가 잘 발달되어 있는 것이 관찰되었으나 세포가 차지하는 면적은 폴리카프로락톤에 대한 실리카 함량이 증가할수록 감소하였다. 한편 주사전자현미경 방법으로 부착한 세포를 계수한 실험 결과는 실리카 양이 증가할수록 세포수가 감소하였는데 이는 전자현미경적 방법으로 세포를 관찰하기 위해 시료를 처리할 때 발생하는 세포탈락력에 의해 부착력이 약한 실리카복합체표면에서 세포가 탈락하였기 때문으로 여겨진다. 폴리카프로락톤/실리카 복합체에 대한 골모세포 증식률은 세포배양접시에 비해 약 2 배 가량 증가하였다. 폴리카프로락톤/실리카 복합체는 골모세포의 증식에 효과적인 것으로 믿어진다. 골모세포 유전자 발현 시험에서 보는 바와 같이 골모세포가 복합체상에서 분화되어 골형성을 시작하는 데 기본적인 조건이 갖추어질 수 있음이 증명되었다.

가도를 이용한 골조직형성 능력을 평가한 결과 재료의 대부분은 일반적으로 시간이 경과함에 따라 신생골 형성이 증가되었으며 모든 이식재가 골형성을 방해하지 않았다. 그러나 이식재 사이로 신생 혈관이나 신생골조직이 자라 들어갈 만한 공간이 없어서 이식재가 좀 덜 뿔뿔하게 채워지면 훨씬 더 많은 신생골을 형성할 수 있으리라고 사료되며 다음번 연구에서는 이를 고려하여 이식재의 외형과 매식 방법을 개선하여야할 것이다. 이는 해면골과 유사하게 다공성을 부여한 3차원적인 스캐폴더를 제작하여 신생혈관의 유입이 용이하도록 제작함으로써 신생골형성능을 개선시킬 수 있다. 또한 특별한 염증반응없이

이식재 주변을 다핵 거대세포가 둘러싸므로써 골 세포가 형성하는 신생골이 이식재와 직접 접촉할 수 없었다. 이물질로 간주되지않도록 표면을 조절할 필요가 있었다. 이는 피하조직 매식시²⁷⁾ 에도 나타나는 현상과 유사하였으며 실제 임상에 사용할 때에는 골 이식재와 함께 차폐막을 사용하므로써 다른 세포의 유입을 제한하는 것으로 방지할 수도 있으리라고 생각되지만 제작된 판상의 재료를 적절한 크기로 분쇄하고 이를 연마하는 과정이 필요하며 필요에 따라서는 처음부터 과립상으로 제작해야할 필요를 느꼈다. 차후 이들 개선점을 보완하여 복합체를 제작한다면 생체활성을 가진 생분해성 골이식재의 개발이 완성 될 수 있으리라 사료된다.

V. 결론

생분해성 고분자인 폴리카프로락톤과 생체활성을 나타내는 실리카를 이용하여 제작된 폴리카프로락톤/실리카 나노복합체의 생물학적 안전성과 골모세포 활성화, 골형성 능력을 확인하였다.

생물학적 안전성 시험 결과 급성, 아급성 독성이 나타나지 않았으며 intradermal induction phase와 topical induction phase 및 challenge phase에서 감각반응이 나타나지 않았다. 배양세포 증식 저해시험으로 세포증식을 저해하지 않을 뿐만 아니라 오히려 약간의 세포증식 촉진 효과가 있는 것으로 추정되었다. 무균시험 결과는 검액을 배양한 후 배지성능시험용 시험관을 제외한 모든 시험관에서 균이 발육되지 않았으므로 재료는 무균적으로 처리되었음을 알 수 있었다. 따라서 재료의 생물학적 안전성이 확인되었다.

골모세포 활성화시험으로 골모세포 부착시험과 증식 시험 결과 시간이 지날수록 골모세포의 부착 및 증식효과가 나타났다. 세포분화 유전자 발현 시험을 시행한 결과 세포분화 관련 유전자인 cbfa1 및 초기 분화표지인자인 염기성인산분해효소(alkaline phosphatase)와 후기분화표지인자인 osteocalcin에 대한 mRNA 분석을 배양접시표면에서 RT-PCR로 확인하였다. 따라서 골모세포가 이 재료에 인접하여 또는

재료상에서 분화하여 골조직을 형성하는데 유리한 조건을 갖는 활성이 있음을 알 수 있었다.

폴리카프로락톤/실리카 나노복합체의 골형성능 시험결과 재료의 조성비에 따라서 골형성 양상이 상이하였으나 일부를 제외하고는 염증반응을 보이지 않으면서 신생골 형성이 잘 이루어졌다. 또한 일부 재료는 8주 소견에서 흡수되는 양상을 관찰할 수 있었다. 따라서 이 재료는 골형성을 방해하지않으면서 생분해되어 자가 골 조직으로 대체될 수 있음을 확인하였다.

이상과 같은 연구 결과들을 종합하여 폴리카프로락톤과 실리카 나노복합체를 이용하여 새로운 골이식대체재 개발이 가능한 것으로 사료되었다.

VI. 참고문헌

1. Bonassar LJ, Vacanti CA : Tissue engineering : the first decade and beyond. J Cell Biochem. Suppl 1998;30-31:297-303.
2. Crane G, Ishuang S, Mikos A. : Bone Tissue Engineering : Nat Med. 1 : 1995;1322-1324.
3. Elahiff CM, Blackwell AS, Hollis JM, Feldman DS. : Analysis of a biodegradable composite for bone healing. J Biomed Mater Res. 1996;32(3):419-24.
4. Cho SB, MivaJi F, Kokubo T, Nakamura T. : Induction of bioactivity of a non-bioactive glass-ceramic by a chemical treatment. Biomaterials. 1997;18(22):1479-1485.
5. Radin S, Falaize S, Lee MH, Duchevne P. : In vitro bioactivity and degradation behavior of silica xerogels intended as controlled release materials. Biomaterials. 2002;23(15):3113-22.
6. Dietmar Huttmacher, MS/Markus B. Hurzeler, Henning Schliephake : A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. Int J of Oral&Maxillofacial Implants.

- 1996;11:667-678.
7. Gottlow J.: Guided tissue regeneration using bioresorbable and non-resorbable devices ; Initial healing and long-term results. *J Periodontol*, 1993(supplement);64:1157-1167.
 8. Greenstein G, Caton JG. : Biodegradable barriers and guided tissue regeneration, *Periodontology* 2000, 1993;1:36-45.
 9. Chen J, Ma A, Lai Y, Chen Y, Cui M. : The mechanism of degradation for the absorbable biomaterials poly(epsilon-caprolactone) in vitro and in vivo. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 1997;14(4):334-7,
 10. Goodwin CJ, Braden M, Downes S, Marshall NJ. : Release of bioactive human growth hormone from a biodegradable material: poly(epsilon-caprolactone). *J Biomed Mater Res*, 1998;40(2):204-13.
 11. Lang M, Bei J, Wang S. : Synthesis and characterization of polycaprolactone /poly(ethylene oxide)/polylactide tri-componet copolymers. *J Biomater Sci Polym Ed*, 1999;10(4):501-12.
 12. Ahola M, Rich J, Korteso P, Kiesvaara J, Seppala J, Yli-Urpo A. : In vitro evaluation of biodegradable varepsilon-caprolactone-co-D, L-lactide/silica xerogel composites containing toremifene citrate. *Int J Pharm*, 1999;30;181(2):181-91.
 13. Iooss P, Le Ray AM, Grimandi G, Daculsi G, Merle C. : A new injectable bone substitute combining poly(epsilon-caprolactone) microparticles with biphasic calcium phosphate granules, *Biomaterials*, 2001;22(20):2785-94.
 14. Kweon H, Yoo MK, Park IK, Kim TH, Lee HC, Lee HS, Oh JS, Aka. : A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering, *Biomaterials*, 2003;24(5):801-8.
 15. Ural E, Kesenci K, Fambri L, Migliaresi C, Piskin E. : Poly (D,L- lactide /epsilon-caprolactone) /hydroxyapatite composites, *Biomaterials*, 2000;21(21):2147-54.
 16. Lin WJ, Flanagan DR, Linhardt RJ. : Accelerated degradation of poly (epsilon -caprolactone) by organic amines, *Pharm Res*, 1994;11(7):1030-4.
 17. Rhee SH, Choi JY, Kim HM. : Preparation of a bioactive and degradable poly (epsilon - caprolactone)/silica hybrid through a sol-gel method, *Biomaterials*, 2002;Dec;23(24):4915-21.
 18. Rhee SH : Effect of molecular weight of poly(varepsilon -caprolactone) on interpenetrating network structure, apatite-forming ability, and degradability of poly(varepsilon -caprolactone)/silica nano-hybrid materials, *Biomaterials*, 2003;24(10):1721-7.
 19. Rich J, Jaakkola T, Tirri T, Narhi T, Yli-Urpo A, Seppala J. : In vitro evaluation of poly(epsilon-caprolactone-co-DL-lactide)/ bioactive glass composites, *Biomaterials*, 2002;23(10):2143-50.
 20. Li P, Ohtsuki C, Kokubo T, Nakanishi K, Soga N, Nakamura T, Yan : Effects of ions in aqueous media on hydroxyapatite induction by silica gel and its relevance to bioactivity of bioactive glasses and glass-ceramics, *J Appl Biomater*, 1993;4(3):221-9.
 21. den Dunnen WF, Robinson PH, van Wessel R, Pennings AJ, van Lee : Long-term evaluation of degradation and foreign-body reaction of subcutaneously implanted poly (DL-lactide-epsilon-caprolactone). *J Biomed Mater Res*, 1997;5;36(3):337-46.
 22. de Bruijn JD, van Bitterswijk CA, Davis JE, Initial bone matrix formation at the hydroxyapatite interface in vitro. *J Biomed Mater Res* 1995;29(1):89-99.
 23. Jarcho M, Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics, *Clin Orthop* 1981;157:259-278.
 24. Jarcho M, Retrospective analysis of hydroxyapatite development for oral implant applications.

- Dent Clin North Am 1992;36(1):19-26.
25. Okumura M, Ohgushi H, Dohi Y, Katuda T, Tamai S, Koerten HK, Tabata S. Osteoblastic phenotype expression on the surface of hydroxyapatite ceramics. *J Biomed Mater Res* 1997;37:122-129.
 26. Damien CJ, Parson JR. Bone graft and bone bone graft substitutes: A review of current technology and applications. *J Appl Biomater* 2: 1991;187-201,
 27. Habal MB, Reddi AH: Different Forms of Bone Grafts. In Habal MB, Reddi AH(eds). *Bone Graft and Bone Substitues*. Philadelphia, WB Saunders 1992;6-8,
 28. Oonishi H: Orthopaedic applications of hydroxyapatite. *Biomaterials* 12: 1991;171-178,
 29. Urist MR, O'Connor BT, Burwell RG: *Bone Grafts Derivatives and Substitues*. Oxford, Butterworth-Heinemann 1994.
 30. Hollinger, J.O., Battistone, G.C. : Biodegradable bone repair materials. *Synthetic polymers and ceramics*. *Clin. Orthop.* 1986;207:290-305.
 31. 의료용구의 생물학적 안전에 관한 공통기준규격, 식품의약품안전청 고시 2000;제 2000-13호.
 32. Kazuo I and Toshie T : Enhancing effect of poly(L-lactide) on the differentiation of mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells *Biomaterials*. Aug;2003;24(19):3303-3309.
 33. 우경미, Peter XM : 생체분해성 폴리머/칼슘포스페이트결정 폼포지트 인공기질내로의 세포이주에 관한 연구. 2000;대한구강해부학회지 27(1) :75-81.
 34. Ignatius AA, Betz O, Augat P, Claes LE. : In vivo investigations on composites made of resorbable ceramics and poly(lactide) used as bone graft substitutes. *J Biomed Mater Res*. 2001;58(6):701-9.
 35. Schantz JT, Hutmacher DW, Ng KW, Khor HL, Lim MT, Teoh SH.: Evaluation of a tissue-engineered membrane-cell construct for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002;17(2):161-74.

사진부도 설명

- Figure 15. Histologic findings of calvarial defect in control group. 1 week, Gomori's trichrome stain, X20
- Figure 16. Histologic findings of calvarial defect in control group. 4 week, Gomori's trichrome stain, X20
- Figure 17. Histologic findings of calvarial defect in control group. 8 week, Gomori's trichrome stain, X20
- Figure 18. Histologic findings of calvarial defect with #159 implanted group. 1 week, Gomori's trichrome stain, X20
- Figure 19. Histologic findings of calvarial defect with #159 implanted group. 4 week, Gomori's trichrome stain, X20
- Figure 20. Histologic findings of calvarial defect with #159 implanted group. 8 week, H-E stain, X20
- Figure 21. Histologic findings of calvarial defect with #168 implanted group. 1 week, Gomori's trichrome stain, X20
- Figure 22. Histologic findings of calvarial defect with #168 implanted group. 4 week, Gomori's trichrome stain, X20
- Figure 23. Histologic findings of calvarial defect with #168 implanted group. 8 week, Gomori's trichrome stain, X20
- Figure 24. Histologic findings of calvarial defect with #218 implanted group. 1 week, Gomori's trichrome stain, X20
- Figure 25. Histologic findings of calvarial defect with #218 implanted group. 4 week, Gomori's trichrome stain, X20
- Figure 26. Histologic findings of calvarial defect with #218 implanted group. 8 week, H-E stain, X20
- Figure 27. Histologic findings of calvarial defect with #219 implanted group. 1 week, Gomori's trichrome stain, X20
- Figure 28. Histologic findings of calvarial defect with #219 implanted group. 4 week, H-E stain, X20
- Figure 29. Histologic findings of calvarial defect with #219 implanted group. 8 week, H-E stain, X20

사진부도 (1)

사진부도(II)

Study on the development of polycaprolacton silica nanohybrid for bone substitutes

Keu-sik Jung¹, Sung-Bin Lim¹, Chin-Hyung Chung¹, Ki-Seok hong¹, Jong-Yeo Kim²

Department of Periodontology, College of Dentistry, Dan-Kook University¹

Department of Oral Histology, College of Dentistry, Dan-Kook University²

A bioactive and degradable poly(epsilon -caprolactone)/silica nanohybrid(PSH) was synthesized for the application as a bone substitute.

PSH was manufactured by using silica and polycaprolacton. PSH was manufactured in some composition after low crystalline apatite had been formed in simulated body fluid and, was used this study.

The safety of the PSH was established by test of acute, and subacute toxicity, sensitization cytotoxicity and sterility. In order to assess activity of osteoblast, the test for attaching osteoblast, proliferation test for osteoblast, differentiating gene expression test are performed in vitro. And bone substitutes were grafted in rabbit's calvarium, during 8 weeks for testing efficacy of bone substitutes. Degree of osteogenesis and absorption of substitutes were evaluated in microscopic level. In result, it was not appeared that acute and subacute toxicity, sensitization in intradermal induction phase, topical induction phase and challenge phase.

It was shown that the test can not inhibit cell proliferation, adversely, it had some ability to accelerate cell proliferation. The result of sterility test described bacterial growth was not detected in most test tube.

The attaching and proliferation test of osteoblast had good results. In the result of differentiating gene expression test for osteoblast, cbfa1 and, alkaline phosphatase, osteocalcin and GAPDH were detected with mRNA analysis.

In the PSH bone formation test, osteoblastic activity would be different as material constitution but it had good new bone formation ability except group #218. futhermore, some material had been absorbed within 8 weeks.

Above studies, PSH had bio-compatibility with human body, new bone formation ability and accelerate osteoblastic activity. So it would be the efficient bone substitute material with bio-active and biodegradable.