

세포 친화성 고분자 재료 개발

A Study on the Development of Cell-Adhesive
Polymeric Materials

연구기관
한국화학연구소

과학기술처

| | |
|------|----|
| 이 기번 | |
| 과 | 一九 |
| 학 | 九 |
| 기 | 年 |
| 술 | 八 |
| 처 | 月 |
| 특 | 九 |
| 수 | |

제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 "생체 의료용 재료 개발" 과제의 세부과제 "세포 친화성 고분자 재료 개발" 의 1차년도 연차보고서로 제출합니다.

1991. 7.

주관연구기관명 : 한국화학연구소

총괄연구책임자 : 이 해 방 (책임연구원)

세 부 과 제
연구책임자 : 이 진 호 (선임연구원)

연 구 원 : 박 종 우 (연구원)

김 현 기 (위탁연구원)

요 약 문

I. 제 목

"세포 친화성 고분자 재료 개발"

II. 연구개발의 목적 및 중요성

고분자를 이용한 인공장기 개발에 가장 큰 문제가 되는 것은 인공장기를 인체내에 이식시켰을때 혈액 및 조직 세포와의 적합성 문제이다. 즉 이물질이 인체내에 삽입되었을때, 이에 대한 생체 거부 반응으로 인해 주변 조직에 변질이 생기고 이로 인해 인체내에 부작용이 생기거나, 인공장기 표면에 인체내의 여러 혈액 구성분들이 흡착됨으로서 인공장기의 기능이 시간이 경과함에 따라 저하하게 된다. 특히 인공혈관의 경우, 인체내 이식시 주변 조직 세포와의 적합성이 좋아야 함은 물론이고 혈관벽을 통한 혈액 응고 현상을 유발시키지 않아야 한다.

인체내 혈관 내벽이 완벽한 항혈전성을 나타내는 이유는 혈관 내벽에 내피 세포라 불리는 얇은 다각형 세포들이 단일층으로 도포되어 있기 때문인데, 우리가 인위적으로 고분자 표면에 내피 세포를 균일하게 부착, 도포시켜 주면 인체내 혈관 내벽과 유사한 항혈전성을 나타낼 수 있다. 또한 인체내 조직 세포들과의 친화성을 갖도록 고분자 표면을 개질시켜 주면, 이들 고분자로 만들어진 인공장기들이 인체내에 이식되었을때 인체내에서 전혀 거부반응을 나타내지 않게 된다. 따라서 세포와 친화성을 갖는 고분자 재료 개발은 혈액적합성 및 조직 적합성을 띤 인공장기 개발에 있어서 반드시 해결되어야 할 과제라 할 수 있다.

이미 선진국에서는 인공신장, 인공심폐기, 인공혈관, 인공관절등이 보편화 되었을 뿐만 아니라 오묘한 인공심장까지도 실용화 단계에 와 있고, 인공장기의 세계 시장이 1980년 연간 50억불에서 2000년에 년 220억불로 급성장할 것이 예상

되고 있는 반면에 국내 실정은 인공장기에 대한 연구가 극히 미미한 상태이므로, 매년 급성장하는 인공장기의 수요를 전적으로 해외 수입에 의존하고 있다. 따라서 국내에서 생체적합성 의료용 고분자 재료의 개발 및 이를 응용한 인공장기 상품의 개발이 시급히 이루어져야 할 단계에 와 있다고 판단된다.

세포와 친화성이 있는 고분자 재료는 인공장기류에 응용할 수 있을 뿐만 아니라 고밀도 세포 배양을 통한, 세포들이 합성 분비해 내는 유용한 치료제들, 즉 인슐린, 인체 성장 호르몬, 인터페론, 인터루킨, 빈혈 치료제, 혈전 용해제, 진단 시약등을 생산해 내는데 직접 응용이 가능하다.

따라서 본 연구에서는 의료용 고분자 재료를 물리화학적 및 생물학적으로 처리하여 인체내 세포 또는 동물세포가 친화성을 갖도록 개질하여 실제 인공장기 및 biotechnology 분야에 응용하는 것을 그 주된 목적으로 하고 있다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

일반적으로 의료용 재료로 사용되는 고분자들은 세포와의 친화성이 좋지 않다. 인공혈관과 같은 인공장기의 항혈전성을 향상시키기 위해 도포되는 내피 세포나 기타 조직 세포들은 배양 조건이 까다롭고 고분자 표면과의 친화성이 좋지 않기 때문에 이들 세포들이 쉽사리 고분자 표면에 부착성장하지 못하므로, 이들 고분자 재료의 표면 성질을 개질하여 세포와 친화성을 갖는 재료를 개발하는 것은 인공장기 개발에 있어서 필연적인 단계이다.

고분자 재료의 세포 친화성을 향상시키는 방법은 크게 다음과 같은 3가지로 나눌 수 있다.

- i) 재료 표면의 친수성 증가
- ii) 재료 표면에 세포 부착 촉진 단백질 (cell attachment factor) 도포
- iii) 재료 표면에 기능성 관능기 도입

본 연구에서는 고분자 재료 표면의 친수성을 증가시키기 위해, 코로나 방전 처리 장치를 이용하여 polyethylene (PE) sheet 표면에 점진적으로 친수성을 증가시키고 친수화 정도에 따른 세포 부착 및 증식 경향을 연구하였다.

또한 세포 부착 촉진 단백질로서 fibronectin 을 사용해, PE sheet 표면과 코로나 방전 장치를 이용해 친수성을 증가시킨 PE sheet 표면에 fibronectin 을 흡착시켜, 재료 표면의 친수성 변화에 따른 fibronectin 의 흡착 정도를 고찰하고 fibronectin 이 흡착된 표면에서의 세포 부착 및 증식 경향을 연구하였다.

고분자 재료 표면에 세포 친화성 관능기인 수산기 (-OH 기)를 도입하기 위해, polyethylene (PE), polypropylene (PP), polystyrene (PS), polyester (PET), polymethyl methacrylate (PMMA) 등 여러가지 고분자 재료 표면에 수증기 플라즈마 방전 처리를 하고, 도입된 -OH 기의 양이 고분자 재료가 달라질때 어떻게 영향을 미치는지를 분석하고, -OH 기가 도입된 여러가지 고분자 재료 표면에서의 세포 부착 및 증식 경향을 연구하였다.

한편, 세포를 고밀도로 배양하여 biotechnology 분야에 응용하기 위해, 수용액 내에서 쉽게 가교되어 gel 을 형성할 수 있는 algin 을 matrix 로 하여, algin matrix 에 -OH 관능기를 지닌 polyvinyl alcohol (PVA), -COOH 관능기를 지닌 polyacrylic acid (PAA), -NH₂ 관능기를 지닌 polyacryl amide (PAAM) 등을 각각 혼합하여 세포가 내부에 고정화된 bead 들을 제조하여, 세포가 이들 반투막 bead 내에서 성장할때 각 기능성 관능기가 세포 증식에 미치는 영향을 고찰하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

(1) 고분자 재료 표면의 친수성 증가에 따른 세포 친화성 변화

고분자 재료 표면의 친수성 증가에 따른 세포의 부착 및 증식 경향을 체계적으로 연구하기 위하여 한 시료내에서 친수성이 점진적으로 변하는 표면, 이른바 "wettability gradient surface" 개념을 도입하였다. Wettability gradient surface 를 만들어 사용하면, 한 시료내에서 친수성이 점진적으로 변하기 때문에 친수성이 서로 다른 많은 시료를 각각 따로 준비해야 되는 번거로움을 덜고, 친수성이 다른 표면 시료를 따로따로 준비하는 과정중에 생길 수 있는 실험 오차도 훨씬 줄일 수가 있어 고분자 표면을 최적화 시키는 실험을 행함에 있어 효율적이고도 신속한 실험을 행할 수 있다는 장점이 있다.

본 연구에서는 대기중에서 wettability gradient surface 를 제조하기 위해 본 연구실에서 특수 제작한 corona 방전 장치를 이용하여 고분자 시료를 처리하였다. 즉 고분자 시료 표면에 corona 방전 출력을 점진적으로 증가시켜 표면 산화에 의한 wettability gradient surface 를 제조하였다. 제조된 gradient surface 는 물 접촉각 측정, ATR-IR, ESCA, SEM 등에 의해 분석되었다.

고분자 재료 표면의 친수성 증가에 따른 세포 친화성 변화를 관찰하기 위해, PE wettability gradient surface 위에 Chinese Hamster Ovary (CHO) 세포들을 배양하고, 이들 세포가 PE 표면에서 친수성 증가와 함께 부착증식하는 경향을 조사하였다. CHO 세포들을 37°C 5% CO₂ 개스 분위기를 유지하고 있는 세포 배양기 내에서 PE wettability gradient surface 에 배양하였을 때 세포들의 부착 및 증식성은 시료 표면의 친수성이 증가함에 따라 증가하다가 일정 영역 (물 접촉각 50° 부근)에 이르면 오히려 친수성 증가와 함께 감소함을 나타내었다. PE 표면 대신 PS 표면을 사용하였을 경우나 CHO 세포 대신 Baby Hamster Kidney (BHK) 세포를 사용하였을 경우에도 비슷한 양상을 나타내었다. 따라서 본 연구를 통해서, 세포 친화성을 향상시키기 위해서는 재료 표면의 물 접촉각이 50° 정도의 친수성을 띠도록 해주는 것이 효과적이라는 결론을 얻을 수 있었다.

(2) 세포 부착 촉진 단백질이 도포된 고분자 재료 표면의 세포 친화성

세포 부착을 촉진시켜 주는 역할을 하는 것으로 널리 알려진 단백질인 fibronectin을 PE 표면, 물 접촉각이 50° 정도가 되도록 코로나방전 처리한 PE 표면 각각에 흡착시키고, fibronectin 이 흡착된 이들 표면의 세포 친화성을 조사하였다. 즉 처리되지 않은 PE 표면, 물 접촉각이 50° 정도가 되도록 코로나 방전 처리한 표면, 또한 이들 각각에 fibronectin 을 흡착시킨 표면들에 CHO 세포를 배양한 후 이들 표면에서의 세포 친화성을 비교한 결과, 처리되지 않은 표면에서는 세포들이 거의 자라지 못했으며 fibronectin 이 도포된 표면들 보다는 물 접촉각이 50° 정도가 되도록 코로나 방전 처리한 표면의 세포 부착증식성이 더 우수한 것으로 나타났다.

(3) 기능성 관능기 (-OH 기) 가 도입된 고분자 재료 표면의 세포 친화성

고분자 재료 표면에 존재하는 여러가지 기능성 관능기들 중에서는 -OH 기가 세포 친화성을 향상시키는데 상당히 좋은 영향을 미친다는 것이 그동안 본 연구실에서 행해온 연구 결과에 의해 입증되었다. 따라서 고분자 표면에 -OH 기를 간편하고 효율적으로 도입하기 위해서 PE, PP, PS, PET, PMMA 등 여러가지 고분자 재료 표면에 water vapor plasma 방전 처리를 하여 -OH 기를 도입하고, -OH 기가 도입된 여러가지 고분자 재료 표면에서의 세포 친화성을 연구하였다.

일반적으로 널리 사용되고 있는 O₂ plasma 나 corona 방전시에 고분자 표면에 -OH, -C=O, -COOH 등 여러가지 관능기가 도입되는 것과는 달리 water vapor plasma 방전시에는 고분자 표면에 오직 -OH 기만 도입된다는 것이 ESCA 분석 결과에 의해 증명되었다. Water vapor plasma 방전 처리시 물 접촉각은, 사용한 고분자 재료들 중에서는 PS 이 가장 많이 감소하였고 도입된 -OH 기의 양은 PE 경우가 가장 많이 나타났다.

Water vapor plasma 방전 처리에 의해 -OH 기를 도입시킨 여러가지 고분자 재료 표면과 처리되지 않은 표면들간에 CHO 세포의 부착 및 증식 경향을 비교한 결과, 고분자 재료의 종류에 상관없이 water vapor plasma 방전 처리 했을때가 처리하지 않았을때 보다 훨씬 세포 친화성이 향상되었고, water vapor plasma 처리한 표면들 중에서는 PE 표면이 세포 부착성이 가장 좋게, 그리고 PS 표면이 세포 증식성이 가장 좋게 나타났다.

상기 결과는 서로 다른 고분자 재료 표면을 사용하였기 때문에 세포 친화성을 논의하는데 있어서 엄밀한 의미에서 -OH 기만의 효과를 나타내지는 못하고 있다. 따라서 한 재료 표면에서 -OH 기가 점진적으로 증가하는 표면, 즉 hydroxyl group gradient surface 를 만들어 세포 친화성을 연구한다면 -OH 기가 세포 친화성에 미치는 영향을 좀 더 명백히 규명할 수 있을 것으로 판단되었다. 따라서 본 연구실에서는 water vapor plasma 방전 장치를 이용해 -OH group gradient surface 를 제조하는 방법을 고안하였고, 이렇게 제조된 -OH group gradient surface 에 세포의 부착증식 경향을 조사한 결과 재료 표면의 -OH group 과 친수성이 세포 친화성이 복합적으로 영향을 미치는 것으로 판단되었다.

(4) 알긴-기능성 고분자 혼합 겔 비드내에 세포 고정화 및 배양

세포를 고밀도로 배양하여 biotechnology 분야에 응용하기 위한 시도로서, CHO 와 BHK 세포들을 algin 과 polyvinyl alcohol (PVA, -OH 기), algin 과 polyacrylic acid (PAA, -COOH 기), algin 과 polyacryl amide (PAAM, -NH₂ 기) 각각의 혼합 겔 비드 (직경 2~3 mm) 내에 고정화하여 이들 세포가 비드내에서 배양될때 사용된 각 관능기가 세포 성장에 미치는 영향을 고찰하였다.

Algin 은 다가 양이온을 함유한 수용액내에서 쉽게 가교되어 반투막 겔을 형성할 수 있으며 독성이 없으므로 세포 고정화를 위한 matrix 로서 널리 사용되고 있는 물질이다. 세포를 반투막 비드내에 고정화하여 배양하게 되면 배양액중에서 세포가 자라고 신진대사를 하기 위해 필요한 성분들인 분자량이 작은 자양

분, 산소등의 공급이 가능하고 분자량이 큰 박테리아와 같은 오염원이 되고 있는 물질들의 침투를 막아 주어 세균 감염 없이 장시간 세포를 배양할 수 있다는 장점이 있다. 여기서 CHO 세포와 BHK 세포를 사용한 이유는 이들 세포들이 각각 인터페론, 빈혈 치료제인 erythropoietin 을 생산 분비해 낼 수 있는 세포들이기 때문이다.

우선, 제조된 비드들의 단면과 표면을 SEM 에 의해 관찰해 본 결과, algin-polyvinyl alcohol 혼합 겔 비드의 내부 구조가 random open pore 구조를 지닌 algin 이나 algin-polyacrylic acid 혼합 겔 비드와는 달리 channel-type pore 구조를 하고 있음을 알 수 있었다. 또한 혼합 겔 비드내에 세포들을 고정화 하였을때, algin-polyvinyl alcohol 로 제조된 혼합 겔 비드의 경우가 algin 만으로 제조된 비드나 algin 과 기타 다른 기능기를 가진 고분자들의 혼합 겔 비드보다 배양시간에 따른 세포 증식성과 생존율이 좋게 나타났다. 이는 algin-polyvinyl alcohol 혼합 겔 비드의 경우 세포 친화성인 -OH 기와 비드 내부의 channel-type pore 구조가 세포 생존과 성장에 좋은 영향을 미치기 때문인 것으로 판단되었다. 본 연구를 결과를 토대로 algin-polyvinyl alcohol 혼합 겔 비드 내에 세포를 고밀도로 배양하여 세포들이 자체적으로 합성분비해 내는 유용한 치료제 및 진단 시약등을 생산하는데 응용하기 위해 현재 연구를 계속 하고 있다.

2. 활용에 대한 건의

세포 친화성 재료는 현재 인체내에서 혈전 및 거부 반응에 의해 문제시 되고 있는 인공혈관을 비롯한 인공장기류에 직접 활용이 가능하고, 고분자 재료 뿐만이 아니고 세포 친화성 ceramics, 금속류 이식 재료 개발의 초석이 될 수 있다.

또한 인체 이식 재료 뿐만이 아니라 세포 배양 용기의 고품질화 및 기타 의료용품에 직접 응용함으로써 국내 의료 공업의 전반적인 활성화를 기대할 수가 있다.

또한 고밀도 세포 배양을 통해 세포가 자체적으로 합성·분비해 내는 빈혈 치료제를 비롯한 특수 의약품 및 진단 시약 추출등 고도의 첨단 기술을 요하는 biotechnology 분야에도 활용이 가능하다.

SUMMARY

Recently a large number of research groups around the world have studied the interaction of biomedical materials with cultured cells because cell-compatible materials are thought to be very important in many biomedical applications. Some of them have focused on the interaction of cultured vascular endothelial cells and biomaterials to improve their blood compatibility when vascular grafts (artificial blood vessels) are implanted in the body. Others have studied the interaction of tissue cells with biomaterials to improve their tissue compatibility when the materials are implanted as substitutes for organs, skin, bone, etc.

Cell-compatible materials are also applied in the fields of biotechnology. Immobilization of cells by entrapment in the cell-compatible materials permits the production of biological molecules secreted by the natural or genetically engineered cells such as monoclonal antibodies, vaccines, interferons, interleukins, plasminogen activators, hormones like erythropoietin, proteins, etc.

In this study, we modified various polymer surfaces to improve cell compatibility. For surface modification of polymers, we used various surface treatment methods including corona discharge treatment, adsorption of fibronectin on corona-treated polymer surfaces, and water vapor plasma discharge treatment. For the corona discharge or water vapor plasma discharge treatment, we used "gradient surface" method where the surface property is gradually changed along the sample length. We developed a new method to prepare a wettability gradient on polymer surfaces. The wettability gradient was produced on polymer surfaces by treating the polymer sheets in air

atmosphere with corona through a knife-type electrode whose power gradually increases along the sample length. The wettability gradient surfaces prepared by the corona discharge treatment were characterized by the measurement of water contact angle, Fourier transform infrared spectroscopy in the attenuated total reflectance mode (FTIR-ATR), electron spectroscopy for chemical analysis (ESCA), and scanning electron microscopy (SEM). We also developed a method to prepared a hydroxyl group gradient on polymer surfaces by water vapor plasma discharge treatment. There is an evidence from our ESCA study that the water vapor plasma treatment is an effective way to produce the hydroxyl groups on the polymer surfaces. The polymer surface was continuously exposed to the water vapor plasma and produced a hydroxyl group gradient on the sample surface. The animal cells, Chinese Hamster Ovary (CHO) and Baby Hamster Kidney (BHK) cells, were cultured on the surface-modified polymer samples and the cell-compatibility of those surfaces was compared. It seems that the wettability (or hydrophilicity) and hydroxyl groups play important roles in cell adhesion and growth to the polymer surfaces.

CHO and BHK cells were also immobilized in the gel beads of the alginate and the mixtures of the alginate-polymer with different functional group (-OH, -COOH, and -NH₂). The morphology inside the gel beads prepared by the alginate-polyvinyl alcohol (-OH functional group) mixture was different from those of other gel beads. The gel beads of the alginate-polyvinyl alcohol mixture were more effective for the immobilization of both CHO and BHK cells compared to other beads in terms of the cell viability and density.

The study is on progress to use these research results for the development of a vascular graft or the production of biological species secreted by cells themselves.

CONTENTS

| | |
|---|----|
| CHAPTER 1. Introduction | 16 |
| Part 1. Cell-compatible Polymeric Materials and Their Applications | 16 |
| Part 2. Research Approaches | 20 |
| CHAPTER 2. Cell Adhesion and Growth on Wettability Gradient Surfaces | 24 |
| Part 1. Introduction | 24 |
| Part 2. Experiments | 25 |
| 1. Polymer materials and surface cleaning | 25 |
| 2. Preparation of wettability gradient surfaces | 26 |
| 3. Characterization of wettability gradient surfaces | 26 |
| 4. Cell culture | 28 |
| Part 3. Results and Discussion | 29 |
| 1. Characterization of wettability gradient surfaces | 29 |
| 2. Cell adhesion and growth on wettability gradient surfaces | 35 |
| CHAPTER 3. Cell Adhesion and Growth on Fibronectin-adsorbed Polymer Surfaces | 42 |
| Part 1. Introduction | 42 |
| Part 2. Experiments | 42 |
| 1. Polymer materials and surface cleaning | 42 |
| 2. Fibronectin adsorption and cell culture | 44 |
| Part 3. Results and Discussion | 44 |

| | |
|--|--------|
| CHAPTER 4. Cell Adhesion and Growth on Polymer Surfaces with Hydroxyl Groups | 48 |
| Part 1. Introduction | 48 |
| Part 2. Experiments | 48 |
| 1. Polymer materials and surface cleaning | 48 |
| 2. Water vapor plasma discharge treatment and cell culture | 49 |
| Part 3. Results and Discussion | 51 |
| 1. Characterization of water vapor plasma-treated polymer surfaces | 51 |
| 2. Cell adhesion and growth on water vapor plasma-treated polymer surfaces | 54 |
| CHAPTER 5. Cell Immobilization and Culture in Gel Beads of Algin-Functional Polymer Mixture | 62 |
| Part 1. Introduction | 62 |
| Part 2. Experiments | 63 |
| 1. Polymeric materials for cell immobilization | 63 |
| 2. Cell immobilization and culture | 64 |
| 3. Analyses of cultured cells and gel beads | 66 |
| Part 3. Results and Discussion | 66 |
| CHAPTER 6. Conclusions | 75 |
| REFERENCES | 75 |

목 차

| | | |
|-------|--|----|
| 제 1 장 | 서 론 | 16 |
| | 제 1 절 세포 친화성 고분자 재료와 그 응용 | 16 |
| | 제 2 절 연구방향 | 20 |
| 제 2 장 | 고분자 재료 표면의 친수성 증가에 따른 세포 친화성 변화 | 24 |
| | 제 1 절 서 론 | 24 |
| | 제 2 절 실험방법 | 25 |
| | 1. 고분자 시료 및 시료의 전처리 | 25 |
| | 2. Wettability gradient surface 의 제조 | 26 |
| | 3. Wettability gradient surface 의 물성 평가 | 26 |
| | 4. 세포 배양 | 28 |
| | 제 3 절 결과 및 고찰 | 29 |
| | 1. Wettability gradient surface 의 물성 평가 | 29 |
| | 2. Wettability gradient surface 에서의 세포 부착 및 증식 경향 | 35 |
| 제 3 장 | 세포 부착 촉진 단백질이 도포된 고분자 재료 표면의 세포 친화성 | 42 |
| | 제 1 절 서 론 | 42 |
| | 제 2 절 실험방법 | 42 |
| | 1. 고분자 시료 및 시료의 전처리 | 42 |
| | 2. Fibronectin 흡착 및 세포 배양 | 44 |
| | 제 3 절 결과 및 고찰 | 44 |

| | | |
|-------|---|----|
| 제 4 장 | 기능성 관능기 (-OH 기) 가 도입된 고분자 재료 표면의 | |
| | 세포 친화성 | 48 |
| 제 1 절 | 서론 | 48 |
| 제 2 절 | 실험방법 | 48 |
| | 1. 고분자 시료 및 시료의 전처리 | 48 |
| | 2. Water vapor plasma 방전 처리 및 세포 배양 | 49 |
| 제 3 절 | 결과 및 고찰 | 51 |
| | 1. Water vapor plasma 방전 처리된 표면의 물성 평가 | 51 |
| | 2. Water vapor plasma 방전 처리된 표면에서의 세포 부착 및 증식 경향 | 54 |
| 제 5 장 | 알긴-기능성 고분자 혼합 겔 비드내에 세포 고정화 및 배양 | 62 |
| 제 1 절 | 서론 | 62 |
| 제 2 절 | 실험방법 | 63 |
| | 1. 세포 고정화에 사용한 고분자 시료 | 63 |
| | 2. 세포 고정화 및 배양 | 64 |
| | 3. 배양된 세포 및 겔 비드 분석 | 66 |
| 제 3 절 | 결과 및 고찰 | 66 |
| 제 6 장 | 결론 | 75 |
| 참고문헌 | | 77 |

제 1 장 서 론

제 1 절 세포 친화성 고분자 재료와 그 응용

의약 및 과학, 문명의 발달에 따라서 수술이나 약리적 치료로 치유가 불가능한 인체 장기를 인공장기로 대체 이식하고자 하는 연구들이 세계적으로 널리 행해지고 있다. 특히 고분자 재료는 인공장기를 만드는데 중요한 소재로서 인공 심장, 인공신장, 인공혈관, 인공관절등의 개발에 널리 이용되고 있다. 그림 1-1은 첨단 소재를 이용한 인공 인체 대체 기구들의 대표적인 예를 보여주고 있다. 이들 인체 이식 재료들의 대부분이 고분자 물질을 사용하고 있다. 예를들면 귀, 턱, 코, 식도, 기관, 유방, 손가락, 힘줄등의 대체 재료로 실리콘이 사용되고 있으며, 치아, 뼈등의 대체 재료로 폴리메틸메타크릴레이트가, 심장 대체 재료로 폴리우레탄이, 혈관, 인대 대체 재료로 폴리에스터 등이 사용되고 있다.

이들 고분자 재료를 이용한 인공장기 개발에 가장 큰 문제가 되는 것은 인공장기를 인체내에 이식시켰을때 혈액 및 조직 세포와의 적합성 문제이다. 즉 이물질이 인체내에 삽입되었을때, 이에 대한 생체 거부 반응으로 인해 주변 조직 세포에 변질이 생기고 이로 인해 인체내에 부작용이 생기거나, 인공장기 표면에 인체내의 여러가지 단백질이나 혈액 구성분들이 흡착됨으로서 인공장기의 기능이 시간이 경과함에 따라 저하하게 된다. 특히 인공혈관의 경우, 인체내 이식시 주변 조직 세포와의 적합성이 좋아야 함은 물론이고 혈관벽을 통한 혈액 응고 현상을 유발시키지 않아야 한다.

인체내 혈관 내벽이 완벽한 항 혈전성을 나타내는 이유는 혈관 내벽에 내피 세포 (endothelial cell)라 불리는 얇은 다각형 세포들이 단일층으로 도포되어 있기 때문인데, 우리가 인위적으로 고분자 표면에 내피세포를 균일하게 부착, 도포 시켜 주면 인체내 혈관 내벽과 유사한 항 혈전성을 나타낼 수가 있을 것으로 기대한다. 또한 인체내 조직 세포들과의 친화성을 갖도록 고분자 표면을 개질시

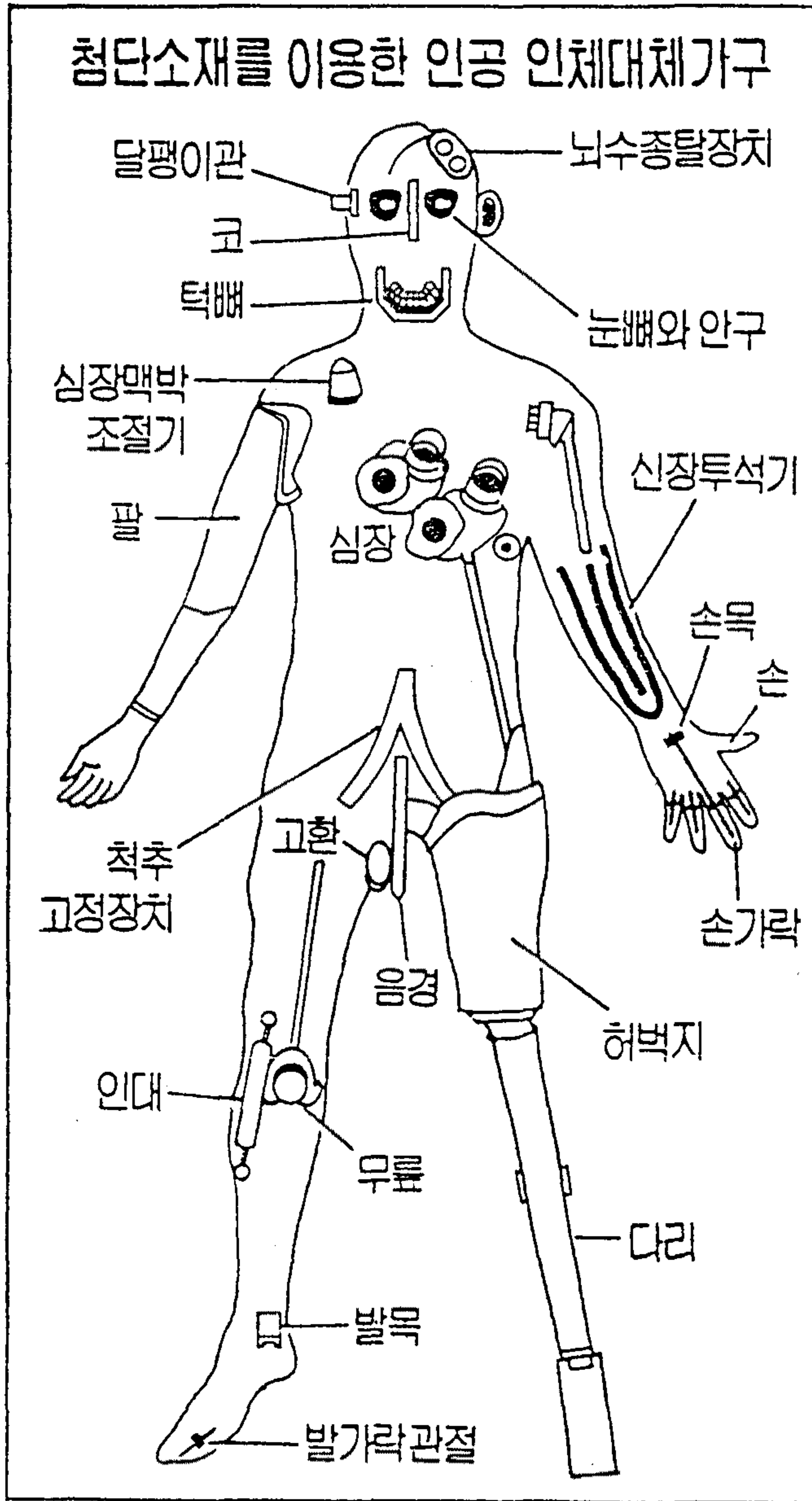


Figure 1-1. Example of artificial organs as human body substitutes

켜 주면, 이들 고분자로 만들어진 인공장기들이 인체내에 이식되었을때 인체내에서 전혀 거부 반응을 나타내지 않게 된다. 따라서 세포와 친화성을 갖는 고분자 재료의 개발은 혈액 적합성 및 조직 세포 적합성을 띤 인공장기 개발에 있어서 반드시 해결되어져야 할 과제이다.

일반적으로 생체 적합성 재료 (biocompatible materials) 는 크게 둘로 나뉘어 혈액 적합성 재료 (blood-compatible materials) 와 조직 적합성 재료 (tissue-compatible materials) 로 구분이 되는데 (그림 1-2), 혈액 적합성 재료는 인체내에서 혈전 형성을 최소화 할 수 있는 이른바 "bio-inert" surface 를 지닌 재료를 일컬으며, 조직 적합성 재료는 인체내에서 주변 조직과 친화성을 가지며 거부 반응을 나타내지 않는 이른바 "bio-adhesive" surface 를 지닌 재료를 의미한다. 세포 친화성 재료의 개발은 재료 표면에 내피세포를 부착·증식시켜 재료의 "blood compatibility" 를 향상시키거나 재료 표면이 조직세포와 친화력을 갖도록 하여 "tissue compatibility" 를 향상시켜 인공혈관을 비롯한 인공장기 개발에 직접 응용할 수가 있다.

국내에서의 생체 적합성 고분자 재료에 관한 연구는 미미한 상태로 국책연구 과제로 한국과학기술연구원의 김영하 박사팀이 "생체 적합성 고분자 재료에 관한 연구" (1984-1987) 를 수행하여 항 혈전성 polyurethane 재료를 개발하는 연구를 한 적이 있고, 본 연구실에서 국책과제로 "혈액 적합성 재료 개발" (1986-1988) 에 관한 연구를 수행하여 polyester 섬유로부터 인공혈관을 직조하는 기술과 소구경 인공혈관 개발의 기초가 되는 인공혈관 내벽의 표면 개질을 통한 세포 이식 기술을 축적한 바가 있다. 혈액적합성 재료 개발에 관한 연구는 상기의 연구 이외에도 몇몇 대학팀에서 연구가 수행되고 있으나 아직까지 세포 친화성 재료에 관한 연구는 본 연구과제 이외에는 국내에서 거의 연구가 수행되지 않고 있는 실정이다. 본 연구에서는 그동안 본 연구실에서 축적해온 고분자 표면 처리 기술과 세포 배양 기술을 토대로 하여 세포 친화성 재료를 개발하여 인공혈관을 비롯한 인공장기 개발에 활용코자 연구를 진행시키고 있다.

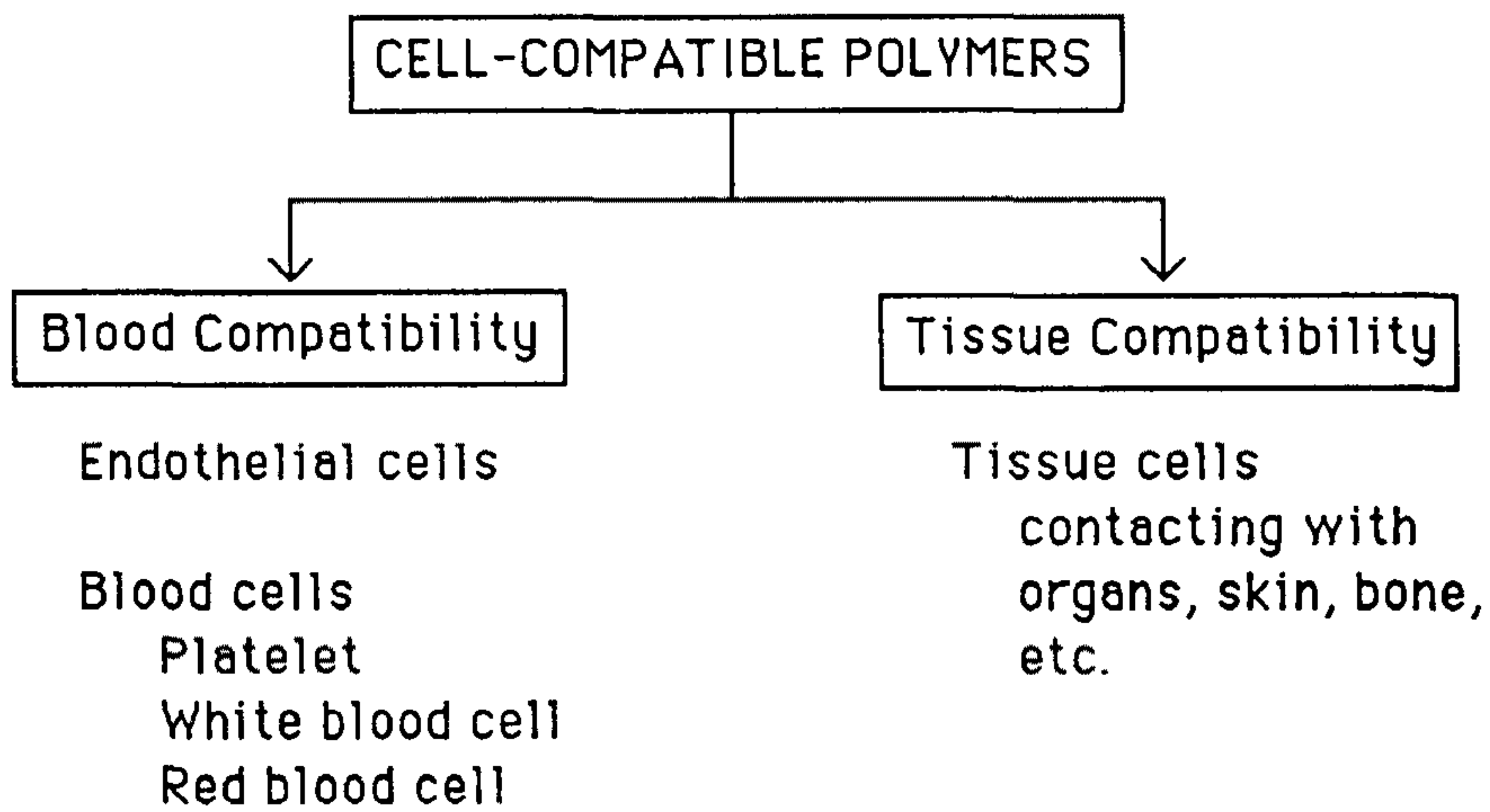
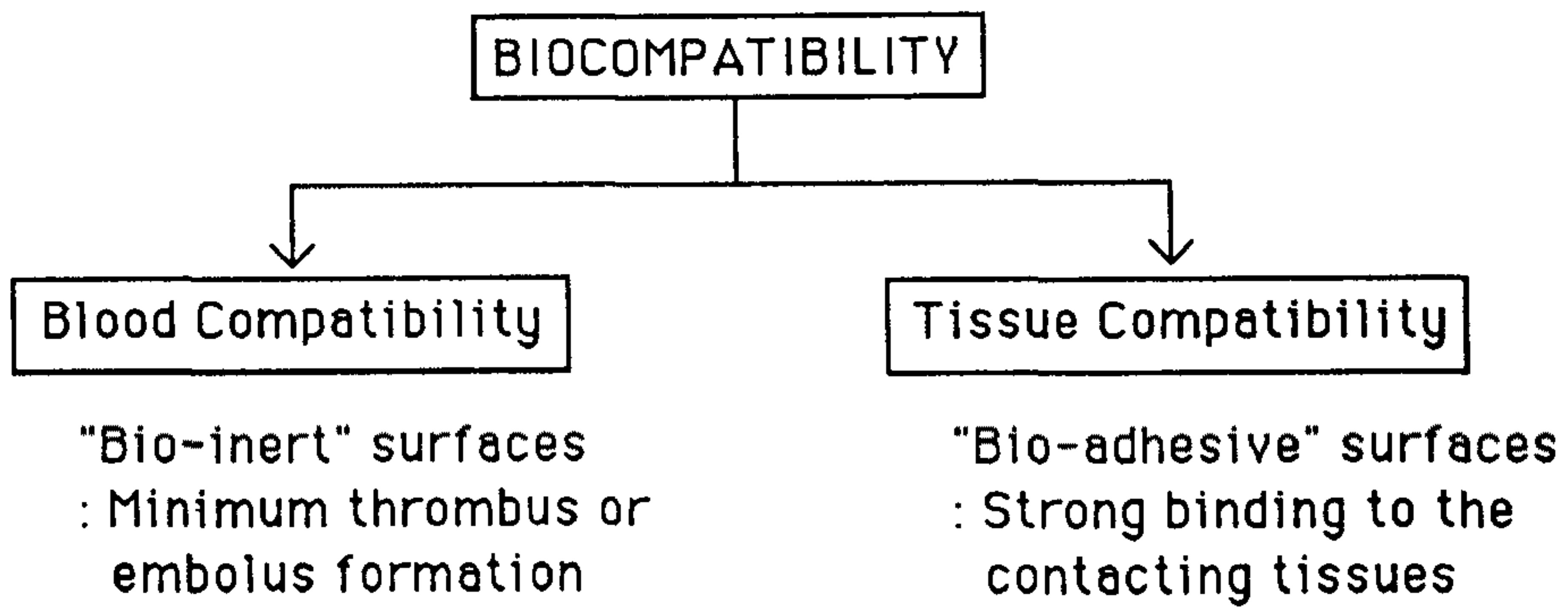


Figure 1-2. Diagrams showing the concept of biocompatibility and cell-compatible polymers

세포 친화성 고분자 재료는 인공장기 뿐만 아니라 고밀도 세포 배양을 통한, 세포들이 합성·분비해 내는 유용한 물질들을 생산해 내는데도 직접 응용이 가능하다. 세포를 고밀도로 장시간 배양하기 위해 고분자 재료내에 고정화하는 기술을 오래전부터 시도되어져 왔다. 그림 1-3 은 세포, 특히 동물세포들을 고밀도로 대량 배양하여 세포가 합성·분비해 내는 유익한 성분들을 추출하여 인체내 치료제로 사용될 수 있는 물질들과 그들의 인체내 역할을 나타내고 있다.

이러한 세포를 고정화시키는 공정은 유기 용매를 사용하거나 고온 또는 아주 낮거나 높은 pH 값 조건등 세포가 살아있기에 부적절한 조건에서는 행하여질 수 없으므로 세포 고정화에 사용되는 matrix 는 수용액 및 완충 용액 또는 배양액내에서 쉽게 겔을 형성할 수 있어야 하며 물질 자체가 독성을 띠지 않아야 한다. 또한 matrix 내에 고정화된 세포가 배양액내에서 성장하면서 유익한 성분을 분비해 내야 되기 때문에 matrix 자체가 배양액 내의 영양분이나 산소등이 matrix 내의 세포들에게 공급될 수 있도록 어느 정도 투과성을 지녀야 한다.

본 연구에서는 수용액내에서 쉽게 반투막 겔을 형성할 수 있는 세포 친화성 고분자를 이용하여 동물세포들을 고정화 하여 고밀도로 배양하기 위한 연구를 진행하고 있다.

제 2 절 연구방향

본 연구는 의료용 고분자 재료 표면을 물리화학적 및 생물학적으로 처리하여 인체내 세포와 친화성을 갖도록 개질하여 실제 인공장기에 응용하고 또한 세포 친화성 고분자 재료를 이용해 동물세포를 고정화하여 고밀도 배양을 통한 인체내 유용한 물질들을 생산해 내는 것을 그 주된 목적으로 하고 있다.

일반적으로 의료용 재료로 사용되는 고분자들은 세포와의 친화성이 좋지 않다. 인공혈관과 같은 인공장기의 항혈전성을 향상시키기 위해 도포되는 내피 세포나 기타 조직 세포들은 배양 조건이 까다롭고 고분자 표면과의 친화성이 좋

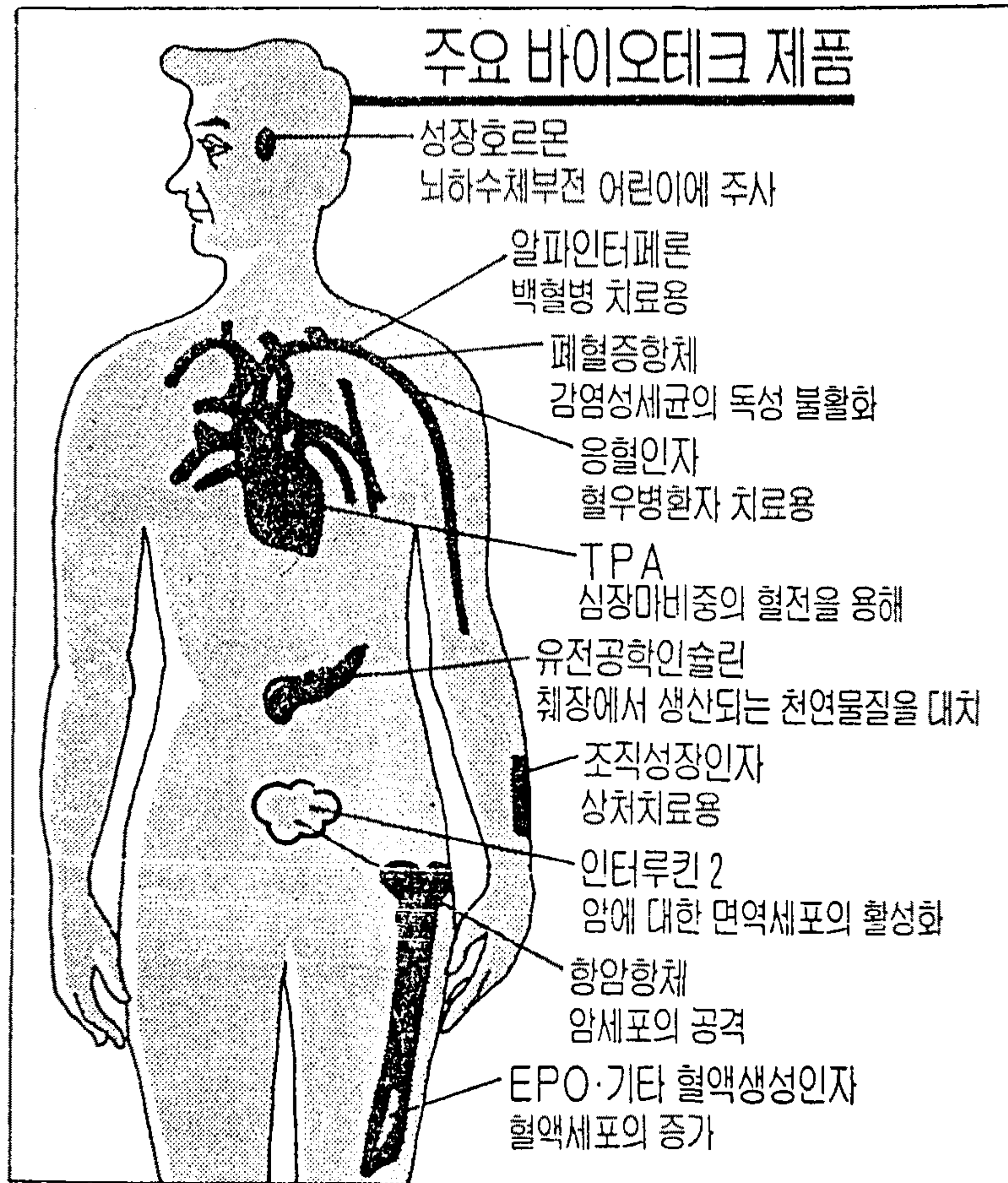


Figure 1-3. Main biotechnology products produced by the mass production of animal cells

지 않기 때문에 이들 세포들이 쉽사리 고분자 표면에 부착·성장하지 못하므로, 이들 고분자 재료의 표면 성질을 개질하여 세포와 친화성을 갖도록 해 주는 것이 인공장기 개발에 있어서 반드시 해결되어야 할 과제이다.

본 1차년도 연구에서는 고분자 재료의 세포 친화성을 향상시키기 위해서 다음과 같은 3가지 방법을 사용하였다.

- i) 재료 표면의 친수성 증가
- ii) 재료 표면에 세포 부착 촉진 단백질 (cell attachment factor) 도포
- iii) 재료 표면에 기능성 관능기 도입

특히 세포 친화성 향상을 위한 표면 개질 조건의 최적화를 위해 본 연구에서는 표면의 성질이 한 시료내에서 점진적으로 변하는 "gradient surface" 방법을 사용하여 신속하고 효율적 연구를 수행할 수 있었다.

우선 고분자 재료 표면의 친수성을 증가시키기 위해, 본 연구실에서 특수 제작한 코로나 방전 장치를 이용하여 polyethylene (PE) sheet 표면에 점진적으로 친수성이 증가하는 "wettability gradient surface" 를 제조하고 이를 이용해 친수화 정도에 따른 세포의 부착 및 증식 경향을 연구하였다.

또한 세포 부착 촉진 단백질로서 Fibronectin 을 사용해 PE sheet 표면과 코로나 방전 처리 장치를 이용해 친수성을 증가시킨 PE sheet 표면에 fibronectin 을 흡착시켜, fibronectin 이 흡착된 표면에서의 세포 부착 및 증식 경향을 연구하였다.

또한 고분자 재료 표면에 세포 친화성 관능기인 수산기 (-OH 기) 를 도입하기 위해 polyethylene (PE), polypropylene (PP), polystyrene (PS), polyester (PET), polymethyl methacrylate (PMMA) 등 여러가지 고분자 재료 표면에 수증기 플라즈마 방전 처리를 하고, 도입된 -OH 기의 양이 고분자 재료가 달라질때 어떻게 영향을 미치는지를 분석하고, -OH 기가 도입된 여러가지 고분자 재료 표면에서의 세포 부착 및 증식 경향을 연구하였다.

한편, 세포를 고밀도로 배양하여 biotechnology 분야에 응용하기 위해, 수용액내에서 쉽게 가교되어 겔을 형성할 수 있는 algin 을 matrix 로 하여 algin matrix

에 -OH 관능기를 지닌 polyvinyl alcohol (PVA), -COOH 관능기를 지닌 polyacrylic acid (PAA), -NH₂ 관능기를 지닌 polyacryl amide (PAAM) 등을 각각 혼합하여 세포가 내부에 고정화된 bead 들을 제조하여, 세포가 이들 반투막 bead 내에서 성장할 때 각 기능성 관능기들이 세포 증식에 미치는 영향을 고찰하였다.

1차년도의 연구결과를 토대로 하여 2차년도에는 인공혈관을 비롯한 인공장기와 고밀도 세포 배양을 통해 세포가 자체적으로 합성·분비해 내는 빈혈 치료제를 비롯한 특수 의약품 추출·생산등 biotechnology 분야에 세포 친화성 재료를 응용하기 위한 연구를 수행할 예정으로 있다.

제 2 장 고분자 재료 표면의 친수성 증가에 따른 세포 친화성 변화

제 1 절 서 론

본 장에서는 고분자 재료 표면의 친수성 증가에 따른 세포의 부착 및 증식 경향을 체계적으로 연구하기 위하여 한 시료내에서 친수성이 점진적으로 변하는 표면, 이른바 "wettability gradient surface" 개념을 도입하였다. 표면의 성질이 점진적으로 변하는 gradient surface 를 만들어 사용하면, 성질이 서로 다른 많은 시료를 각각 준비해야 하는 번거로움을 덜고, 성질이 서로 다른 표면 시료를 따로따로 준비하는 과정중에 생길 수 있는 실험 오차도 훨씬 줄일 수가 있다. 또한 수많은 서로 다른 일련의 성질을 가진 고분자 표면들이 한 시료 안에 존재함으로써 고분자 표면을 최적화시키는 실험을 행함에 있어 효율적이고도 신속한 실험을 행할 수 있다는 장점이 있다.

Wettability gradient (또는 hydrophilicity gradient) surface 에 관한 연구는 Elwing 등에 의해 최초로 시작되었다 (1). 그들은 xylene 용액내에서 silicon (SiO_2) 표면에 dimethyl dichloro silane 을 점차로 확산시켜 wettability gradient surface 를 제조하고 시료 표면의 친수성 변화에 따른 단백질 흡착 현상을 연구하였다 (1-6). Golander 등도 역시 Elwing 등이 사용한 것과 비슷한 방법으로 silica 표면에 wettability gradient 를 만들어 단백질 흡착 현상을 연구해 오고 있다 (7,8). 그들은 density gradient solution 을 이용해 wettability gradient surface 를 제조하는 연구도 역시 시도하고 있다 (9). 이상의 방법에 의해 제조된 wettability gradient surface 들은 기초 연구를 하기 위한 tool 로서 사용하기에는 상당히 유용하나 처리하고자 하는 시료들이 silicon, silica, quartz, glass 등과 같은 친수성 무기 재료에 국한된다는 한계성을 가지고 있다.

실제 의료용 재료로 쓰이는 고분자를 이용한 wettability gradient surface 제조에 관한 연구는 본 연구실에서 plasma 방전 장치를 이용해 처음으로 시작하였다

(10-13). 즉 고분자 시료에 plasma 노출시간을 점차 증가시켜 줌으로서 시료 표면의 산화정도가 점차로 달라져 wettability gradient 가 고분자 시료 표면에 형성되었다. Pitt 등도 비슷한 방법으로 plasma 방전 장치를 이용해 wettability gradient surface 를 제조하는 연구를 수행해 오고 있다 (14,15).

본 연구에서는 corona 방전 장치를 이용하여 고분자 시료에 wettability gradient surface 를 만드는 방법을 새로 고안하여 현재 특허 출원중에 있다 (16). 즉 고분자 시료 표면에 knife-type 전극을 통해 corona 출력을 점차적으로 증가시켜 주어 시료 표면의 산화 정도가 점차적으로 증가되게 하여 wettability gradient surface 를 제조하였다. Corona 방전 처리에 의해 wettability gradient surface 를 제조하는 방법은 plasma 방전 처리에 의한 방법보다 좀 더 간단하고 실제적이다. 왜냐하면 plasma 방전 처리 방법이 진공중에서 행해지는 반면에 corona 방전 처리 방법은 대기중에서 행해지기 때문이다. Corona 방전 처리에 의해 제조된 wettability gradient surface 들은 물 접촉각 측정, FTIR-ATR, ESCA, SEM 등에 의해 분석되었고 (17), 고분자 재료 표면의 친수성 증가에 따른 세포 친화성 향상의 최적 조건을 정립하기 위한 연구에 사용되었다.

제 2 절 실험방법

1. 고분자 시료 및 시료의 전처리

첨가제가 전혀 함유되어 있지 않은 저밀도 polyethylene (PE, 250-300 μm 두께, 한양화학) sheet 가 corona 방전 처리에 의해 wettability gradient surface 를 제조하기 위해 사용되었다. PE sheet 들은 5.0 cm x 7.0 cm 의 크기로 잘라 ethanol 에서 2회 각각 30 min 동안 초음파 세척기로 세척하고 다시 ethanol 로 여러번 헹구어 낸 다음 실온에서 진공 건조하였다. 이들 시료 표면은 electron spectroscopy for chemical analysis (ESCA) 로 분석 결과 clean 처리후 표면들이 아무 오염이 되지 않은 깨끗한 상태임이 확인되었다.

2. Wettability gradient surface 의 제조

Clean 처리된 PE sheet 들은 gradient surface 제조를 목적으로 본 실험실에서 자체 제작한 corona 방전 장치 (그림 2-1) 로 처리되었다. Corona 방전 장치는 gradient surface 를 제조하기 위한 두 key part, 즉 aluminum 재질의 knife-type electrode 와 silicone rubber 로 씌워진 iron sample bed 를 가지고 있다. Knife-type electrode 는 radio-frequency (RF) generator 에 연결되어 corona power 가 motor drive 에 의해 점차적으로 증가될 수 있도록 되어 있고, sample bed 는 일정한 속도로 횡축으로 움직일 수 있게 되어 있다.

Wettability gradient surface 를 제조하기 위하여, clean 처리된 PE sheet 를 sample bed 위에 올려 놓고 장치 내부에 dry air 를 20 l/min 의 속도로 흘려 보내 주었다. Sample bed 가 1.0 cm/sec 의 속도로 이동함과 동시에 시료 표면에서 1.0 mm 간격을 두고 떨어져 있는 knife-type electrode 으로부터 corona 가 방전되게 하여 연속적으로 corona 출력을 100 KHz 에서 10 watt 로부터 35 watt 까지 증가시켜 주었다. 시료는 5 sec 동안에 5 cm 길이가 처리되게끔 조절하였다. 이와같은 corona 방전 처리에 의해서 시료 표면은 연속적으로 증가하는 출력을 가진 corona 에 노출되어 점차적으로 산화되는 정도가 증가하여 wettability gradient 가 형성되었다. 시료들은 동일한 방법으로 9번까지 corona 방전 처리 되었다.

3. Wettability gradient surface 의 물성 평가

Corona 방전 처리된 PE 표면들은 물 접촉각 측정, Fourier transform infrared spectroscopy in the attenuated total reflectance mode (FTIR-ATR), electron spectroscopy for chemical analysis (ESCA), scanning electron microscopy (SEM) 등에 의해 분석되었다.

재료 표면의 친수성을 나타내는 척도로 사용되는 물 접촉각은 contact angle goniometer (model 100-0, Rame-Hart, Inc., U.S.A.) 를 이용해 실온에서 측정되었다.

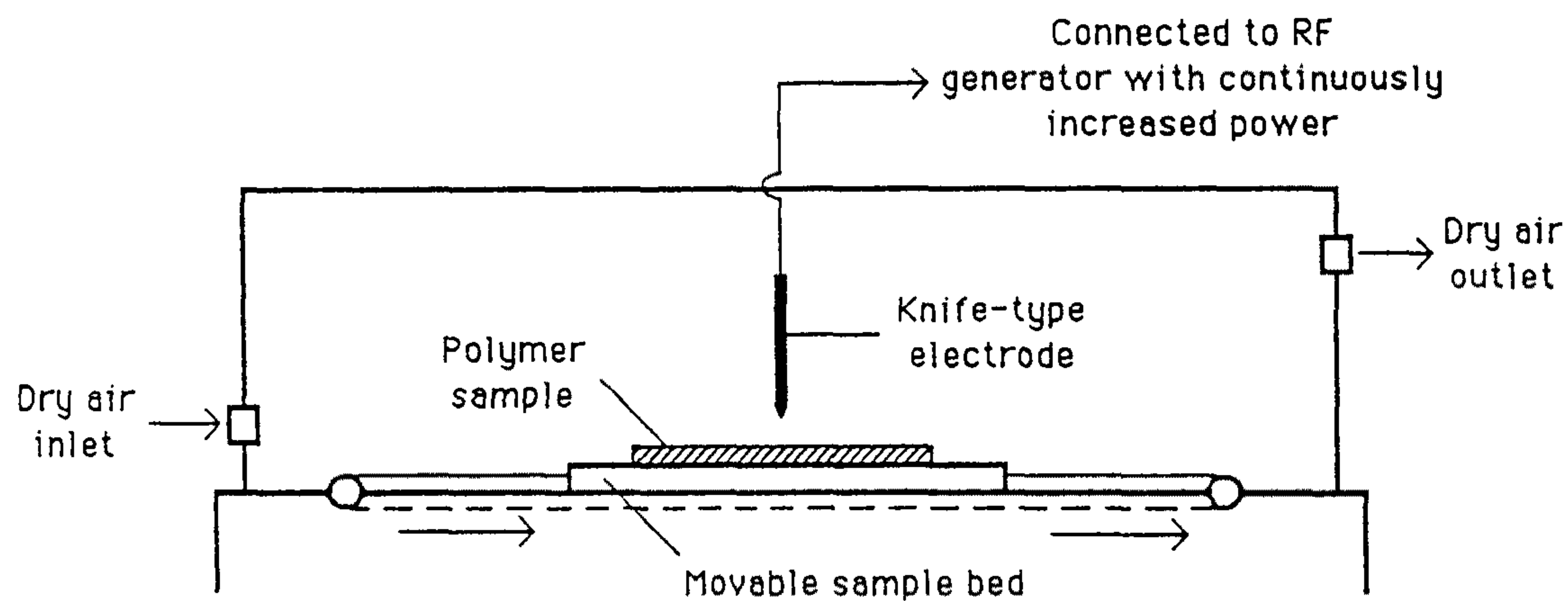


Figure 2-1. Schematic diagram showing corona discharge apparatus for the preparation of wettability gradient surfaces

Corona 처리된 PE wettability gradient surface 에 일정 간격으로 일정양 (3 μ l) 의 초순수를 떨어뜨리고 그때 표면과 물방울이 이루는 각도를 측정하였다. 각각의 시료에 대해 3번 이상씩 측정하고 평균값을 취하였다.

Gradient surface 의 화학적 구조는 FTIR-ATR 에 의해 분석되었다. FTIR-ATR spectrum 들은 KRS-5 reflection elements (incidence angle, 45°) 가 부착된 Digilab FTS 80 (Bio-Rad, U.S.A.) 을 이용하여 얻어졌다. Corona 처리된 PE sheet 들은 corona 출력이 증가한 방향을 따라 5등분으로 (1 cm x 5 cm) 절단하고 각각을 다시 반으로 잘라 (0.5 cm x 5 cm) reflection elements 에 처리된 부분이 마주 보게 부착시킨후 spectrum 들을 얻었다. Gradient surface 의 각 section 별도 $\sim 1730\text{ cm}^{-1}$ (carbonyl group) 에서의 흡수대가 서로 비교되었다.

Gradient surface 의 화학적 구조 변화는 ESCA (ESCALAB MK II, V. G. Scientific Co., U. K. ; Al K α at 1487 eV ; 300 watt at the anode) 에 의해 더 구체적으로 분석되었다. PE Gradient surface 의 각 section 별로 carbon 1S core level scan spectrum 들이 비교 분석되었다.

Gradient surface 의 morphology 는 SEM (JSM-840A, Jeol Co., U.S.A.) 에 의해 관찰되었다.

4. 세포배양

PE wettability gradient surface 에 세포 부착 및 증식 경향을 조사하기 위해서 세포 배양 실험에 사용된 세포는 Chinese Hamster Ovary (CHO, Oak Ridge National Laboratory, U.S.A.) cell 이었다. CHO cell 은 포유동물의 단층세포로서 비교적 안정되고, 채집분리, 배양 조건등이 까다롭지 않으며 영구 분열을 하기 때문에 소량만 채집 분리하면 계속해서 배양시켜가며 사용이 가능하기 때문에 세포친화성 연구를 위한 model system 으로 가장 널리 사용되는 세포이다.

CHO cell 들은 37°C, 5% CO₂ 가스 분위기를 유지하고 있는 incubator 에서 세포 배양용 polystyrene flask (녹십자의료공업(주)) 내에서 계속 배양 분주 하였다. 이때 사용된 배양액은 5% fetal calf serum, 100 unit/ml penicilin, 100 µg/ml streptomycin 을 함유하는 Ham's F-12 nutrient mixture (GIBCO Co., U.S.A.) 이었다.

Trypsin 처리에 의해 PS flask로 부터 떼어낸 CHO cell 들은 자체 제작한 gradient surface 용 배양용기에 4 x 10⁴/cm² 의 수로 분주되어 incubator 내에서 일정시간동안 배양되었다. 세포 배양후 PE gradient surface (corona 5회 처리) 에서 부착증식한 세포의 갯수는 각 section 별로 haemocytometer 와 위상차 현미경 (Nikon Inverted Microscope, Diaphot-TMD) 에 의해 분석되었다.

PE wettability gradient surface (corona 5회 처리) 에 부착한 세포들의 양상을 관찰하기 위해서 표면에 부착된 세포들을 10% formalin 용액에 20분간 담가 고정 시키고 물로 여러번 세척해준 다음 5% Giemsa 용액 (GIBCO Co.) 에 20분동안 담가 세포들을 염색한후 다시 물로 여러번 세척하고 45-50°C 의 온도를 유지하고 있는 oven 내에서 건조시킨후 위상차 현미경으로 세포의 모양을 관찰하였다. 구체적인 CHO cell 배양 과정은 참고문헌 (18,19) 에 잘 나타나 있다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. Wettability gradient surface 의 물성평가

Corona 처리된 PE 표면들은 눈으로 보기에는 처리되지 않은 표면들과 차이점을 발견할 수가 없었으나 물 접촉각 측정결과, corona 출력이 증가한 쪽으로 갈수록 물 접촉각이 점차적으로 감소하여 wettability gradient 가 잘 형성 되었음을 알 수가 있었다 (그림 2-2). 물 접촉각은 corona 처리 횟수 증가에 따라서도 역시 감소하였다. 물 접촉각은 재료 표면의 친수성을 나타내는 척도로 알려져 있다. Corona 처리한 표면을 따라서 물 접촉각이 감소 (따라서 친수성이 증가) 하는 것은 corona 처리에 의해 표면에 여러가지 산소를 포함하는 극성 관능기들이 도입 되기 때문인 것으로 판단된다.

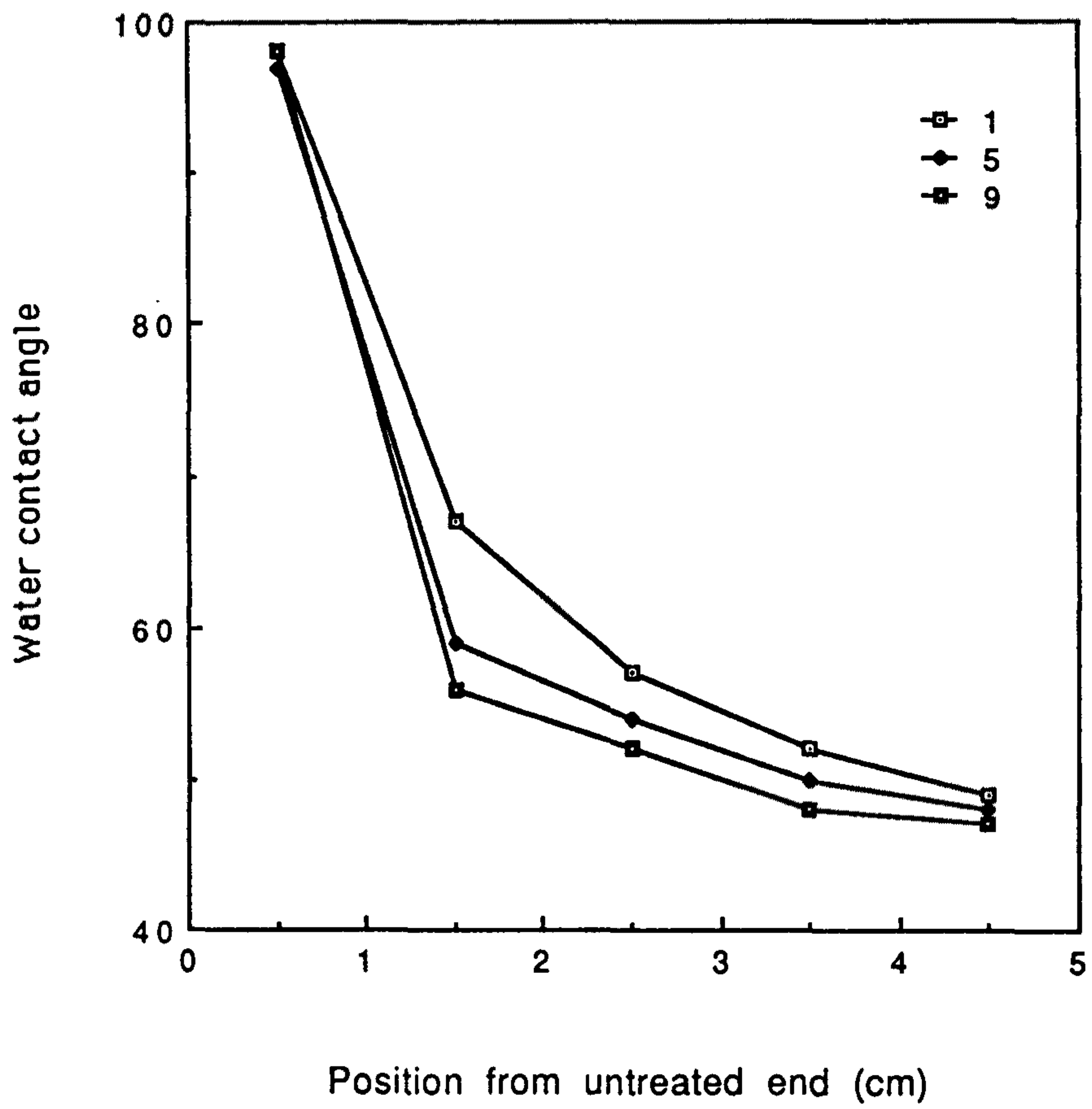


Figure 2-2. Changes in water contact angle of corona-treated PE surfaces with the different number of corona treatment (standard deviation $\leq \pm 2.0$ degree)

그림 2-3 은 corona 처리에 의해 PE 와 같은 고분자 시료에 표면 산화가 형성되는 mechanism 을 보여주고 있다. 고분자 표면에 corona 가 방전되면 hydrocarbon backbone 으로부터 carbon radical 들이 형성 되고, carbon radical 들은 공기중의 산소와 결합해 peroxide radical 들을 경유해 hydroperoxide 들을 형성시킨다. 표면에 형성된 peroxide 들은 불안정하기 때문에 산소-산소결합이 분해되면서 다시 공기중의 산소와 여러가지 형태로 결합해 산소를 함유하는 관능기들 (hydroxyl group, ether, ketone, aldehyde, carboxylic acid, carboxylic ester, etc) 을 표면에 형성시키게 된다. Corona 방전에 의해 초기에 형성된 carbon radical 들은 주변의 carbon radical 들과 결합해 여러가지 type 의 불포화 탄소 결합을 이루기도 하는 것으로 알려져 있다. PE 표면에 형성된 산소를 함유하는 관능기들은 corona 출력 증가와 함께 또는 corona 처리 횟수 증가와 함께 증가하게 되어 그림 2-2 에 나타난 것과 같은 wettability gradient 가 표면에 형성된다.

Corona 처리에 의해 제조된 PE wettability gradient surface 에서 산소를 함유하는 관능기들의 변화는 FTIR-ATR 에 의해 분석되었다. 그림 2-4 는 PE wettability gradient surface 들의 FTIR-ATR spectrum 들을 보여주고 있다. Spectrum 상에서 1730 cm^{-1} 근처에 나타난 흡수대는 C=O stretching band 에 해당하는데 ketone, aldehyde, carboxylic acid 나 ester 등과 같은 carbonyl group 들로부터 유래한다. 그림 2-4 에 나타난 spectrum 들로부터, corona 처리에 의해 PE 표면에 carbonyl group 들이 형성 되었으며 형성된 carbonyl group 들은 corona 출력이 증가한 쪽으로 갈수록 또는 corona 처리 횟수가 증가할수록 증가하였음을 볼 수 있다. C=O stretching band 에 걸쳐 있는 1645 cm^{-1} 근처에서 나타나는 흡수대는 corona 처리에 의해 형성된 여러가지 형태의 불포화 탄소들에 의한 것인데 역시 corona 출력 증가 또는 corona 처리 횟수 증가에 따라 증가하였다. PE gradient surface 의 spectrum 상에 나타나는 C-H bending band ($\sim 1465\text{ cm}^{-1}$, PE 자체의 methylene group 으로부터 유래) 와 C=O stretching band ($\sim 1730\text{ cm}^{-1}$, corona 처리에 의해 형성된 carbonyl group 으로부터 유래) 의 absorbance ratio 로부터 gradient surface 에 도입된 carbonyl group 의 상대적인 양들을 산출해 그림 2-5 에 나타내었다.

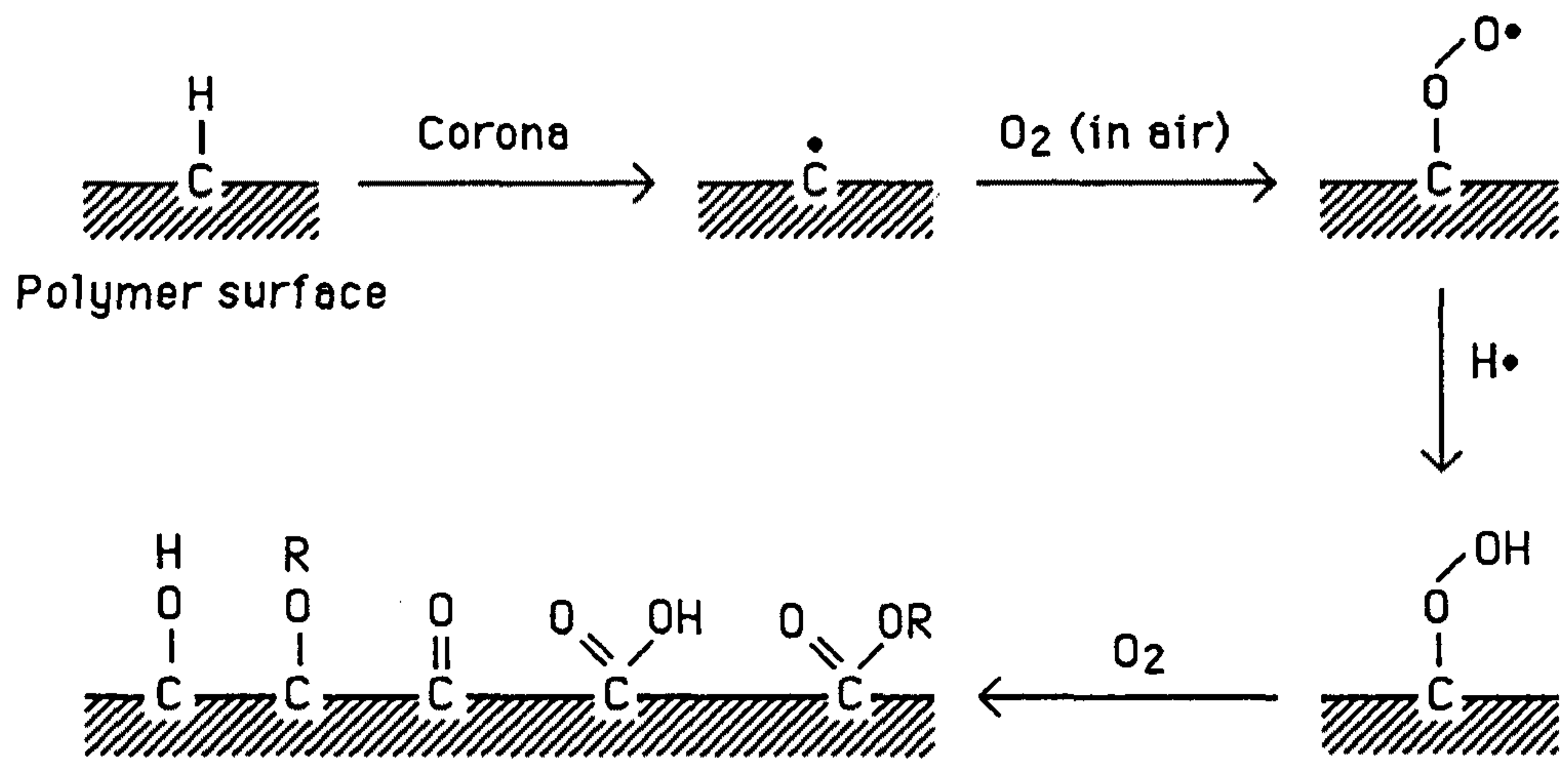


Figure 2-3. Possible mechanism showing the formation of oxygen-based functionalities on a polymer surface by corona discharge treatment

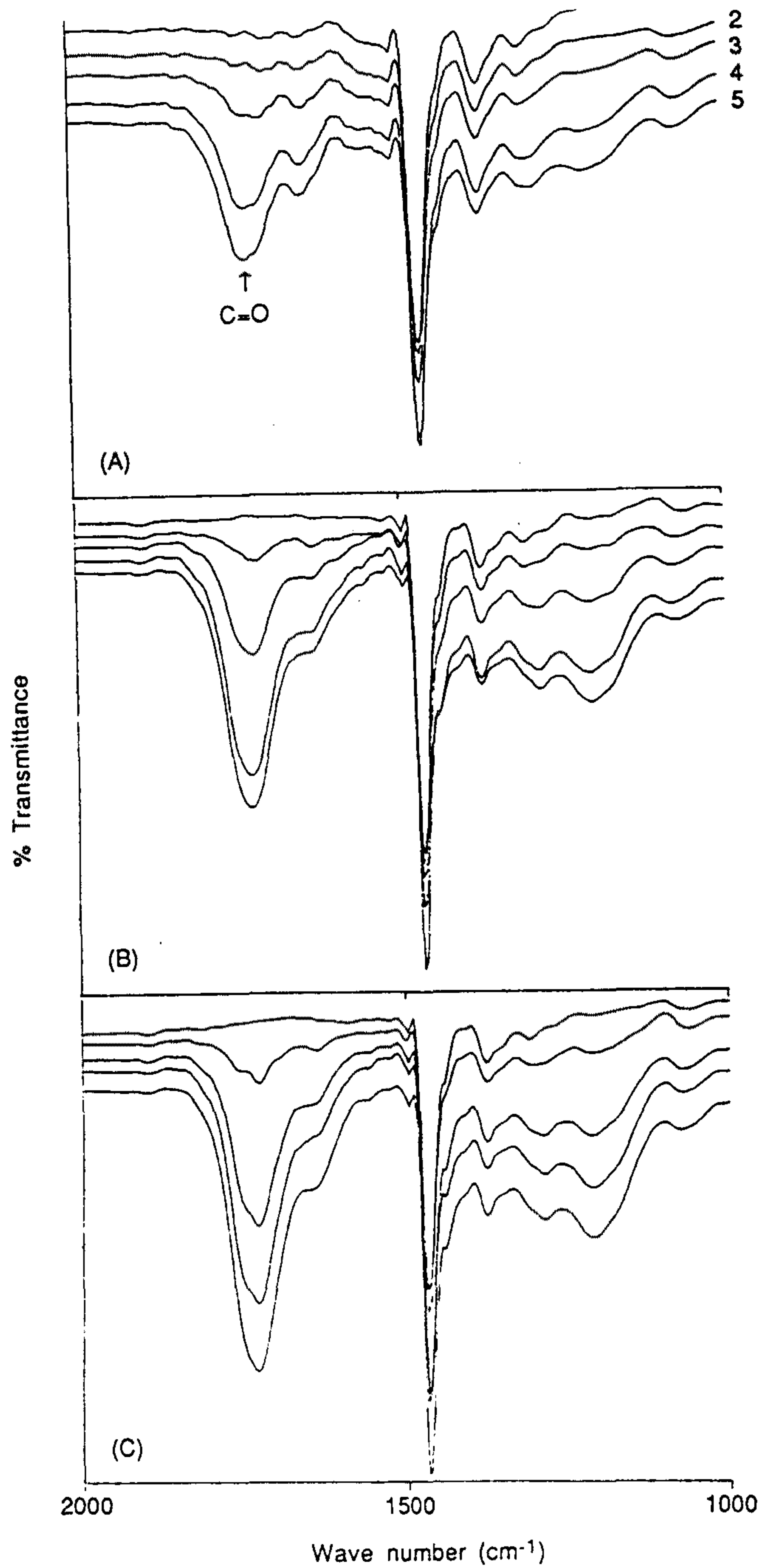


Figure 2-4. FTIR-ATR spectra of corona-treated PE surfaces along the gradient. Numbers labeled on the spectra (1 to 5) represent the sections from the untreated hydrophobic end of the gradient surface. Number of corona treatment, (A) 1, (b) 5, and (C) 9

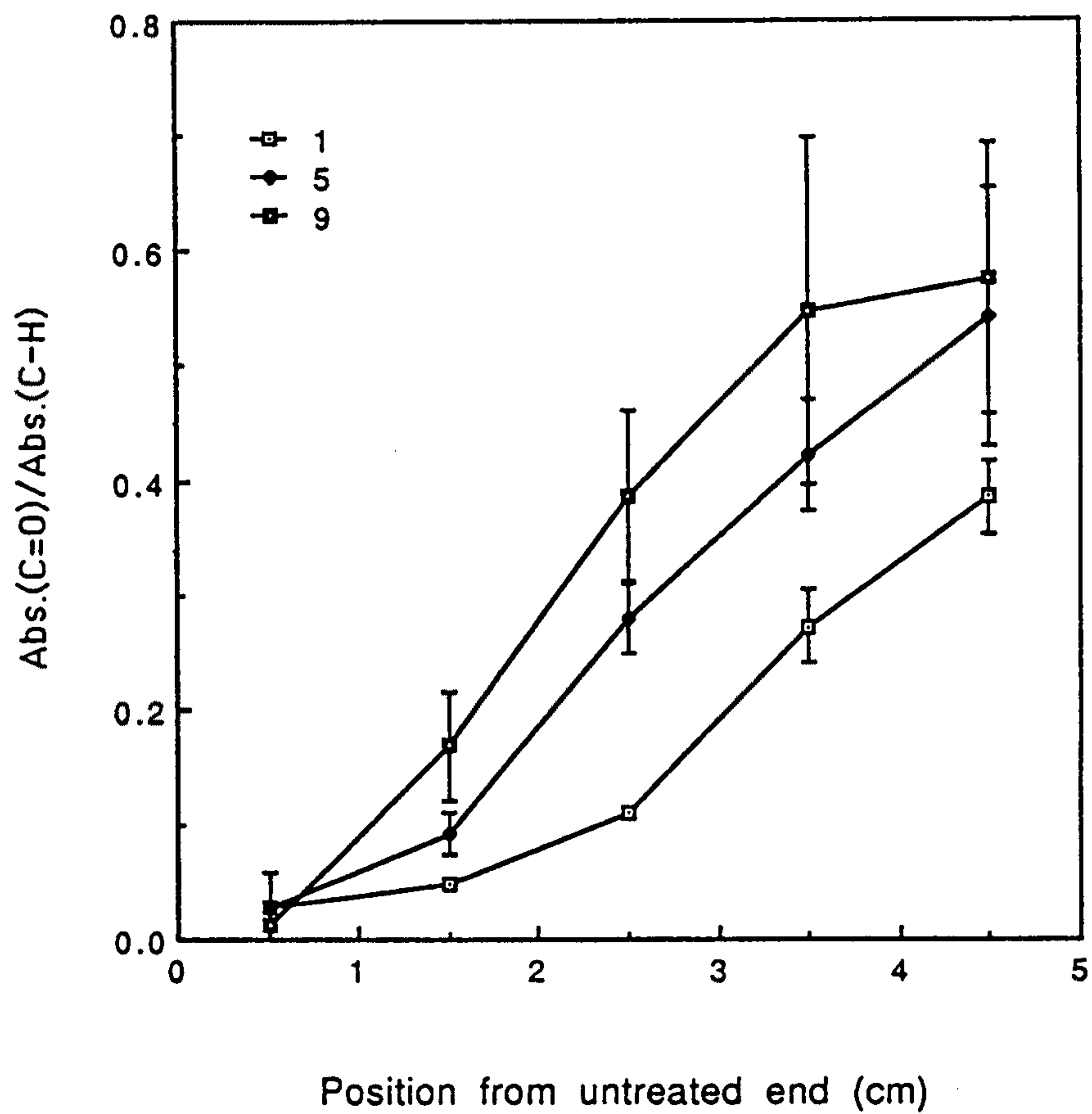


Figure 2-5. Absorbance ratios of C=O stretching to C-H bending bands from FTIR-ATR spectra of corona-treated PE gradient surfaces with the different number of corona treatment

Corona 처리된 PE wettability gradient 에 도입된 산소를 함유하는 관능기들은 ESCA 에 의해 좀 더 구체적으로 분석되었다. 그림 2-6 은 PE wettability gradient surface 들의 carbon 1S core level scan spectrum 들을 보여주고 있다. Gradient surface 의 소수성 부분 (section 1) 은 binding energy 285 eV 에서 alkyl carbon peak 만을 나타내고 있다. Corona 처리된 section 들은 binding energy 가 높은쪽에서 새로운 peak 들을 나타내고 있는데, 이는 탄소와 산소가 결합된 형태의 관능기가 표면에 존재함을 의미한다. 즉 binding energy 약 286.6 eV 에서 나타나는 peak 는 탄소와 산소의 단일 결합 (hydroxyl 또는 ether groups), binding energy 약 287.9 eV 에서 나타나는 peak 는 탄소와 산소의 이중결합 (ketone 또는 aldehyde groups), binding energy 약 289.1 eV 에서 나타나는 peak 는 탄소 1개와 산소 2개가 3중으로 결합한 형태 (carboxylic acid 또는 ester groups) 를 의미한다. 이와 같은 산소를 함유하는 관능기들은 gradient surface 의 corona 출력 증가와 함께 또는 corona 처리 횟수 증가와 함께 증가하고 있음을 볼 수 있다. 표 2-1 은 corona 처리된 PE wettability gradient surface 들의 ESCA 분석 결과를 보여주고 있다. PE gradient surface 에 도입된 산소의 양은 corona 로 1번, 5번, 9번 처리 되었을때 각각 19, 21, 24 atomic % 까지 증가하였다. 표면에 도입된 산소를 함유한 관능기들중에서는 탄소와 산소의 단일결합 형태, 즉 hydroxyl 또는 ether groups (ether group 보다는 거의 전부가 hydroxyl group 인 것으로 판단됨) 가 가장 많이 나타났음을 볼 수 있다.

Corona 처리된 PE gradient surface 들의 morphology 는 SEM 에 의해 관찰되었다. 그림 2-7 에서 보듯이, corona 처리에 의해 PE 표면들은 corona 출력 증가와 함께 또는 corona 처리 횟수 증가와 함께 약간 거칠어지는 것을 관찰할 수 있었다.

2. Wettability gradient surface 에서의 세포 부착 및 증식 경향

고분자 재료 표면의 친수성 증가에 따른 세포 친화성 변화를 관찰하기 위해 앞 항에서 corona 방전 처리 (5회) 한 PE wettability gradient surface 위에 CHO 세포들을 배양하고, 이들 세포가 PE 표면에서 부착증식하는 경향을 조사하였다.

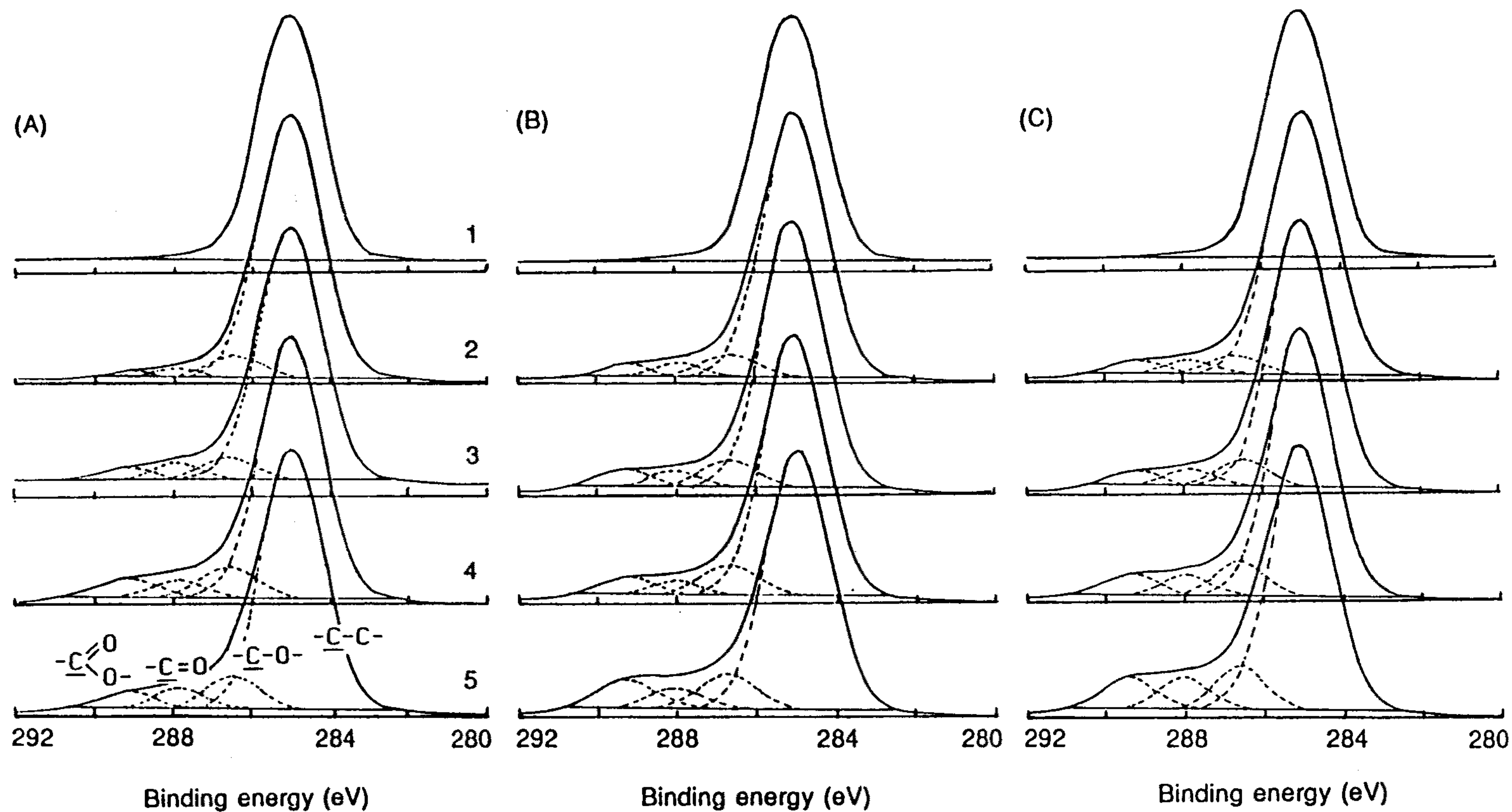


Figure 2-6. ESCA carbon 1S core level spectra of corona-treated PE surfaces along the gradient. Numbers labeled on the spectra (1 to 5) represent the sections from the untreated hydrophobic end of the gradient surface. Number of corona treatment, (A) 1, (B) 5, and (C) 9

Table 2-1

ESCA Analysis of Corona-treated PE Gradient Surfaces

| No. of Corona Treatment | Position from Untreated End (cm) | Atomic % | | | | O/C Ratio |
|-------------------------------|--|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-----------|
| | | -C-C- (~285.0) ^a | -C-O- (~286.6) ^a | -C=O (~287.9) ^a | -COO- (~289.1) ^a | |
| 1 | 0.5 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0.00 |
| | 1.5 | 90 | 6 | 2 | 1 | 0.10 |
| | 2.5 | 87 | 6 | 4 | 3 | 0.15 |
| | 3.5 | 82 | 9 | 4 | 5 | 0.22 |
| | 4.5 | 81 | 9 | 5 | 5 | 0.23 |
| 5 | 0.5 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0.00 |
| | 1.5 | 87 | 6 | 3 | 3 | 0.14 |
| | 2.5 | 84 | 8 | 4 | 4 | 0.19 |
| | 3.5 | 83 | 9 | 4 | 4 | 0.20 |
| | 4.5 | 79 | 9 | 5 | 7 | 0.27 |
| 9 | 0.5 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0.00 |
| | 1.5 | 89 | 5 | 3 | 3 | 0.12 |
| | 2.5 | 85 | 7 | 4 | 4 | 0.18 |
| | 3.5 | 81 | 9 | 5 | 6 | 0.25 |
| | 4.5 | 76 | 10 | 7 | 7 | 0.32 |

^aBinding energy, eV.

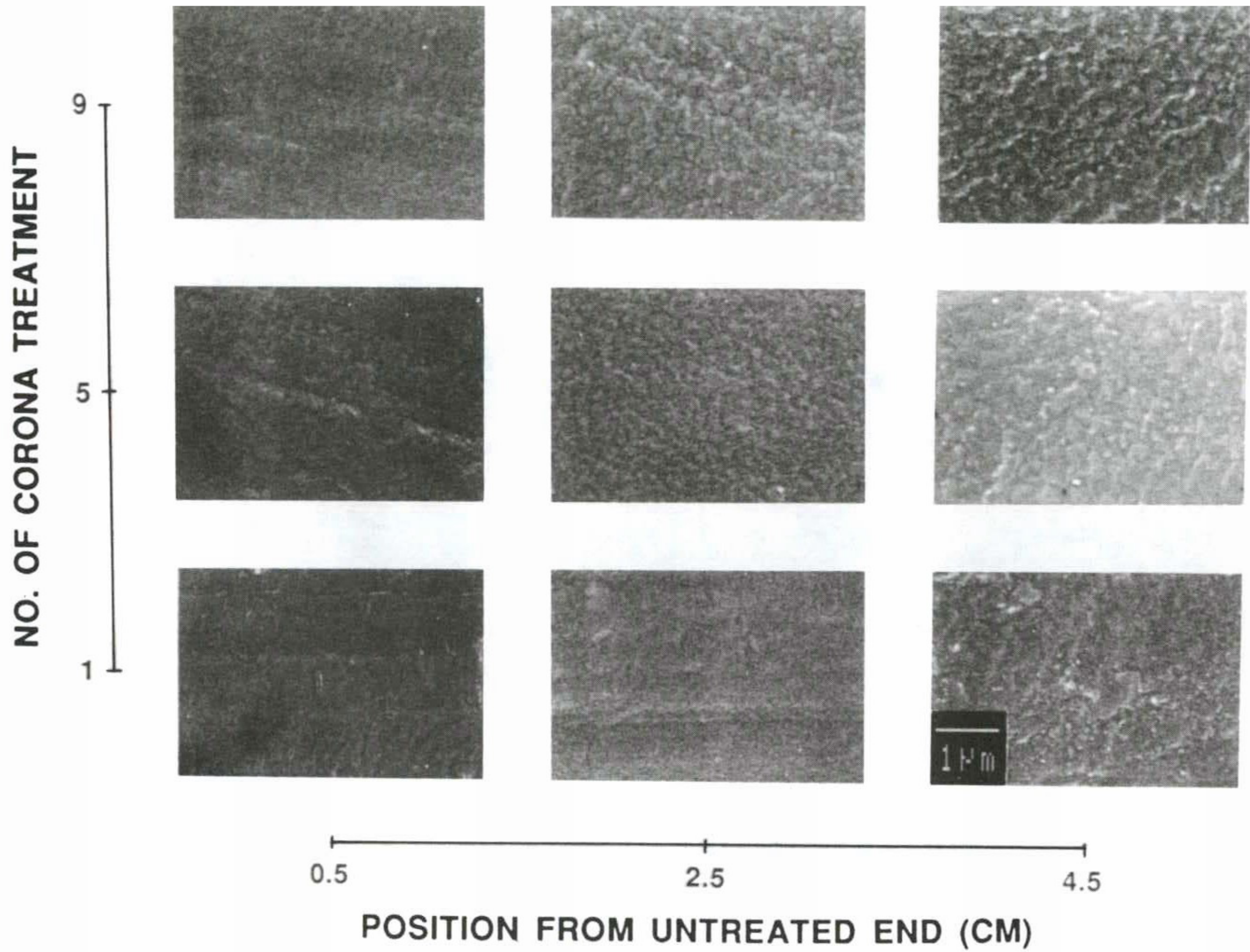


Figure 2-7. SEM photographs of corona-treated PE gradient surfaces (x10,000)

CHO 세포는 포유동물의 단층 세포로서 상당히 안정된 구조를 가지고 있으며 배양조건이 비교적 수월하기 때문에 세포 친화성 연구를 위한 model system 으로 가장 널리 사용되고 있는 세포이다. 세포들은 37°C, 5% CO₂ 개스 분위기를 유지하고 있는 incubator 내에서 PE wettability gradient surface 에 배양되었다.

그림 2-8 은 PE wettability gradient surface 위에서 2시간 배양된 CHO 세포들을 Giemsa 용액으로 염색한 후에 위상차 현미경으로 gradient surface 의 각 section 별로 100배 확대하여 찍은 사진들을 보여주고 있다. 그림에서 position 1 에서 position 5 로 갈수록 corona 출력이 증가하여 친수성이 증가한 쪽이다. PE wettability gradient surface 에 부착한 CHO 세포들은 표면의 친수성 증가와 함께 증가하다가 일정 영역 (position 4) 에 이르면 오히려 친수성 증가와 함께 감소함 (position 5) 을 보여주고 있다.

그림 2-9 는 PE wettability gradient surface 의 친수성 증가 (물 접촉각 감소) 에 따른 세포의 부착증식 경향을 조사하기 위해 CHO 세포들을 gradient surface 위에서 2시간, 24시간, 48시간 배양후 표면에 부착된 세포들의 횡수를 산출한 결과를 보여주고 있다. 세포들의 부착 및 증식성은 PE gradient surface 의 친수성 증가에 따라 증가하다가 일정영역, 즉 물 접촉각 50° 부근에 이르면 오히려 친수성 증가와 함께 감소함을 보여주고 있다. PE 표면 대신 PS 표면을 사용하였을 경우와 CHO 세포 대신 Bady Hamster Kidney (BHK) 세포를 사용하였을 경우에도 비슷한 양상을 나타내었다. 일반적으로 세포들은 소수성 표면 보다는 친수성을 띤 표면에, 친수성 표면들 중에서도 유리와 같은 친수성이 아주 큰 표면보다는 약간 친수성을 띤 표면에 더 잘 부착.성장한다는 것은 다른 문헌에서도 보고되고 있으나 그 원인에 대해서는 아직까지 논란이 많이 일고 있다. 본 장에서의 연구 결과를 통하여, 세포 친화성을 향상시키기 위해서는 재료 표면의 물 접촉각이 50° 정도의 친수성을 띠도록 해 주는 것이 효과적이라는 결론을 얻을 수 있었다.

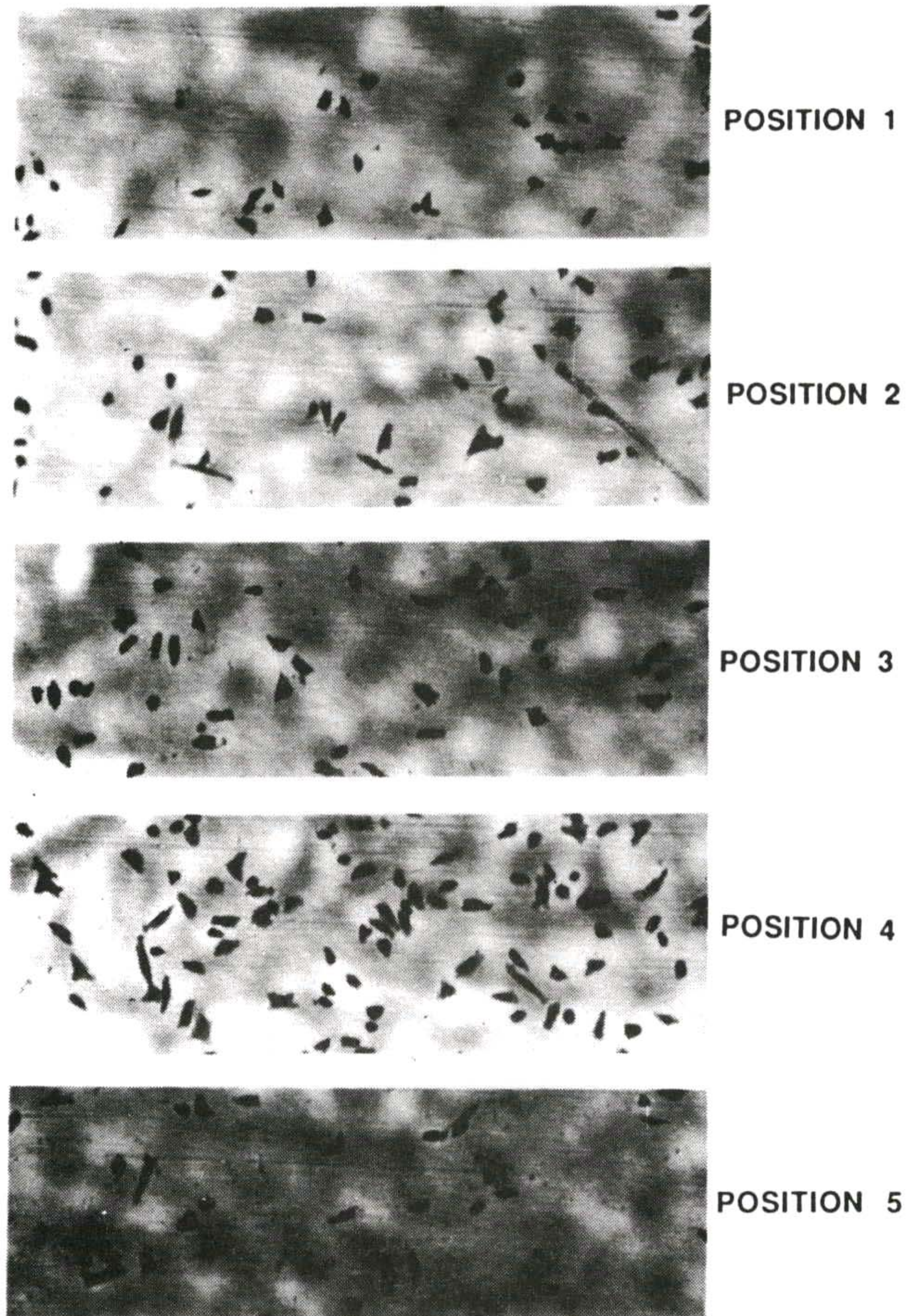


Figure 2-8. Appearance of CHO cells adhered on corona-treated (5 times) PE gradient surface after Giemsa staining (2 hr culture ; inverted microscope, x100). Positions represent sections from the untreated hydrophobic end.

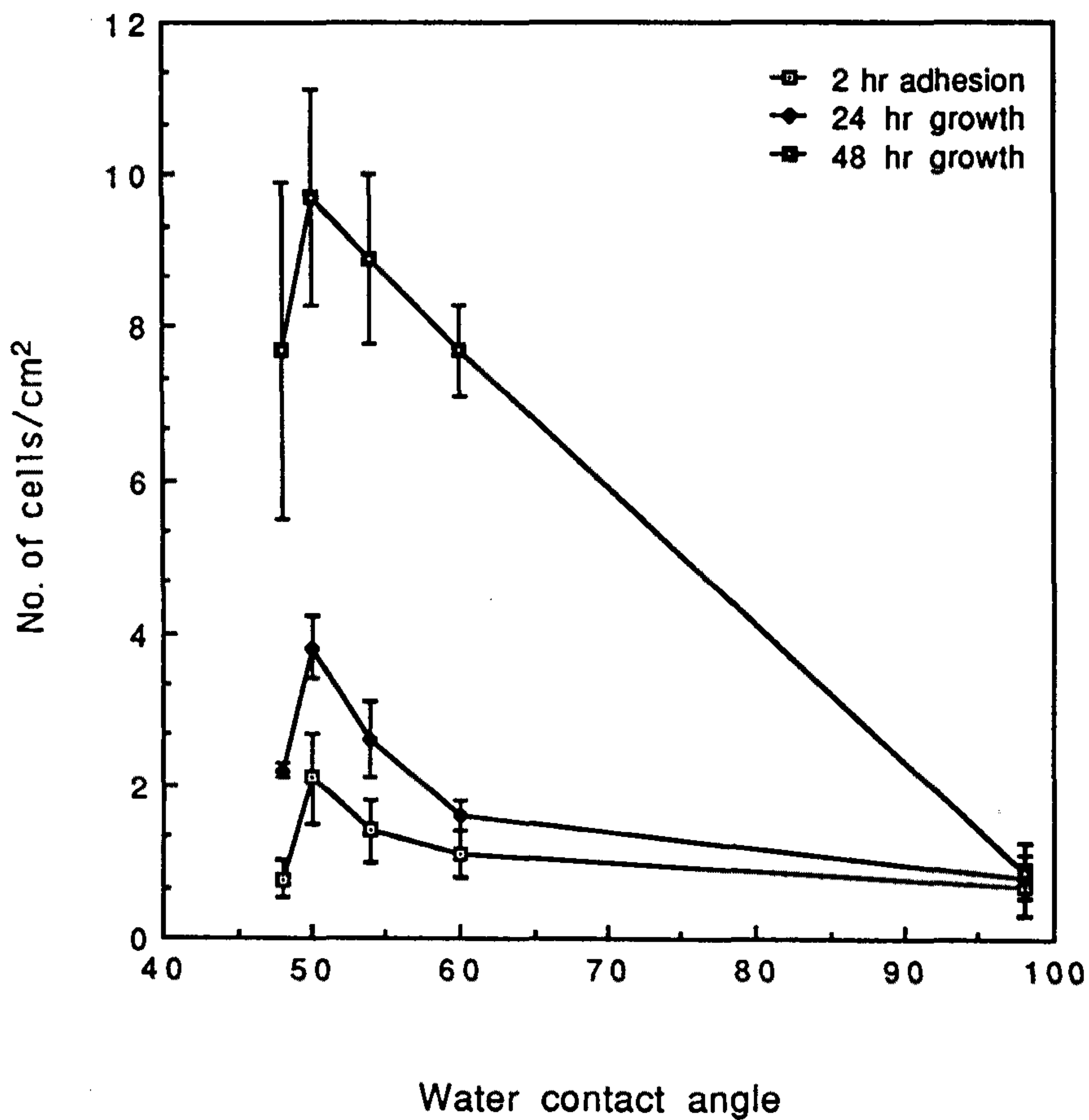


Figure 2-9. Amount of CHO cells adhered and grown on corona-treated (5 times) PE gradient surface (Number of seeded cells, $4 \times 10^4/\text{cm}^2$)

제 3 장 세포 부착 촉진 단백질이 도포된 고분자 재료 표면의 세포 친화성

제 1 절 서 론

일반적으로 의료용 재료로 사용되는 고분자들은 소수성을 띠므로 세포와의 친화성이 좋지 않다는 것은 이미 앞서도 언급하였다. 따라서 세포 친화성을 향상시켜 주기 위한 시도로서 앞장에서는 재료 표면의 친수성을 증가시키는 방안 에 대해 논의하였는데, 본장에서는 고분자 재료의 세포 친화성을 향상시켜 주기 위한 시도로서 세포 부착을 촉진시켜 주는 역할을 하는 것으로 알려진 단백질들 (표 3-1 참조) 중에서 가장 널리 사용되고 있는 fibronectin 을 고분자 재료 표면에 미리 흡착시켜 주고 fibronectin 이 도포된 표면의 세포 친화성을 조사하였다.

제 2 절 실험방법

1. 고분자 시료 및 시료의 전처리

Fibronectin 흡착 및 세포 친화성 조사를 위해 사용한 고분자 시료는 첨가제가 전혀 함유되어 있지 않은 저밀도 polyethylene (PE, 250-300 μm 두께, 한양화학) sheet 였다. PE sheet 들은 제 2장 제 2절 1항에서와 동일한 방법으로 clean 처리 되었다. 물 접촉각이 50° 정도가 되도록 corona 방전 처리된 PE sheet 역시 fibronectin 이 흡착된 PE sheet 와의 세포 친화성 비교를 위해 사용되었다.

Table 3-1. Cell Attachment Factors

Collagen (type 1)

Fibronectin

Gelatin

Laminin

Poly-D-Lysin

Poly-L-Lysin

2. Fibronectin 흡착 및 세포 배양

Bovine plasma 로부터 추출한 fibronectin (lyophilized powder, Sigma, U.S.A.) 을 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2-7.3) 용액에 용해시켜 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 만들었다. Clean 처리된 PE sheet 또는 물 접촉각이 50° 정도가 되도록 corona 방전 처리된 PE sheet 들을 실온에서 fibronectin 용액에 1 hr 담그어 fibronectin 을 고분자 표면에 흡착시켰다.

Fibronectin 이 흡착된 PE sheet 들은 PBS 용액으로 여러번 조심스럽게 세척한 후 곧바로 제 2장 제 2절 4항에서와 동일한 방법으로 세포 배양 실험에 사용하였다. 세포배양에 사용한 세포는 CHO cell 이었다. Fibronectin 이 흡착된 PE sheet 들의 일부는 다시 초순수로 조심스럽게 세척한후 진공 oven 에서 건조하여 FTIR-ATR 로 표면에 흡착된 fibronectin 의 양을 분석하기 위해 사용되었다.

제 3 절 결과 및 고찰

세포 부착을 촉진시켜 주는 역할을 하는 것으로 널리 알려진 단백질인 fibronectin 을 PE 표면과 물 접촉각이 50° 정도가 되도록 corona 방전 처리한 PE 표면 각각에 흡착시키고, 이들 표면에 흡착된 fibronectin 의 양을 비교하기 위해 FTIR-ATR 로 분석하였다.

그림 3-1 은 clean 처리만 된 PE 표면, clean 처리된 PE 에 fibronectin 이 흡착된 표면, 물 접촉각이 50° 정도가 되도록 corona 처리된 PE 에 fibronectin 이 흡착된 표면 각각의 FTIR-ATR spectrum 들을 보여주고 있다. 그림 3-1 (B) 와 (C) spectrum 상의 1645 cm^{-1} 부근에 나타나는 band 가 PE 표면에 fibronectin 이 흡착됨으로서 나타나는 흡수대이다. 이들 흡수대의 크기가 거의 동일하게 나타나는 것으로 보아 clean 처리만 된 PE 이나 corona 처리된 PE 에 흡착된 fibronectin 의 양이 거의 비슷한 것으로 판단할 수 있다.

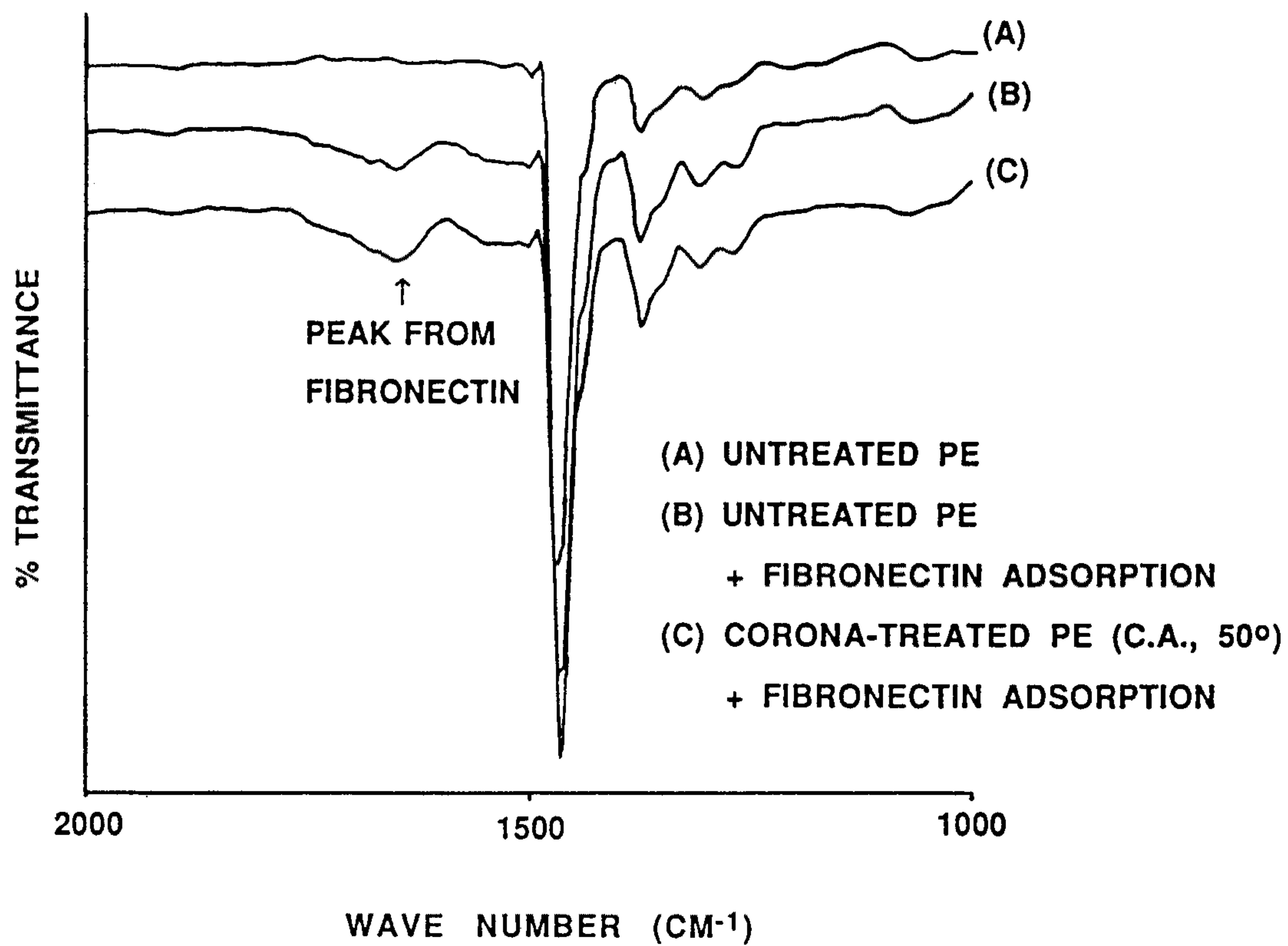


Figure 3-1. FTIR-ATR spectra of untreated and fibronectin-adsorbed PE surfaces, (A) Untreated PE, (B) Fibronectin adsorption on untreated PE, and (C) Fibronectin adsorption on corona-treated (contact angle, 50°) PE

그림 3-2 는 clean 처리만 된 PE 표면과 물 접촉각이 50° 정도가 되도록 corona 방전 처리한 PE 표면, 또한 이들 각각에 fibronectin 을 흡착시킨 표면들에 CHO 세포들을 배양한 후, 이들 표면의 세포 친화성을 비교한 것이다. Clean 처리만 된 PE 표면에서는 세포들이 거의 부착증식을 못하고 있음을 볼 수가 있고, fibronectin 이 도포된 표면들은 배양 시간에 따라 부착된 세포들이 양호하게 자라고 있음을 볼 수가 있다. Clean 처리만 된 표면이나 corona 처리한 표면에 fibronectin 을 흡착시켰을때, 흡착된 fibronectin 의 양들이 FTIR-ATR 분석 결과에서 나타났듯이 거의 동일하여 세포 부착 및 증식 경향이 비슷하게 나타나고 있다. 이들 fibronectin 이 흡착된 표면들과 물 접촉각이 50° 정도가 되도록 corona 방전 처리한 표면의 세포 부착 및 증식성을 비교해 보면 물 접촉각이 50° 정도가 되도록 corona 방전 처리한 표면의 세포 친화성이 더 좋은 것으로 나타나고 있다. 따라서 재료 표면의 세포 친화성을 향상시키기 위해서는 세포 부착 촉진 단백질인 fibronectin 을 도포하는 것도 하나의 방법이 될 수 있지만 이보다도 재료 표면의 친수성을 최적 조건으로 (물 접촉각 약 50° 정도) 해 주는 것이 더 바람직한 것으로 판단되어진다.

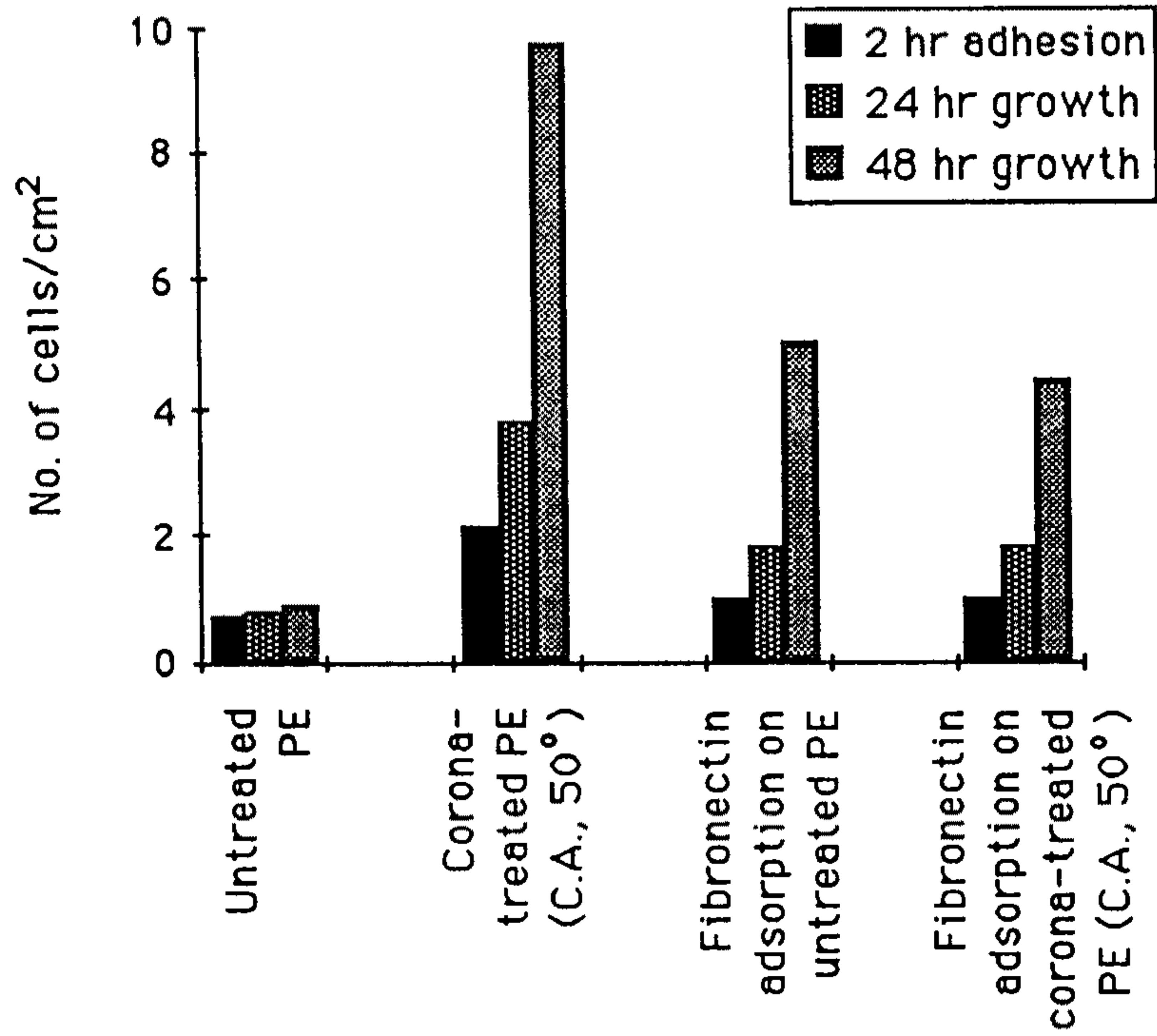


Figure 3-2. Comparison of amount of CHO cells adhered and grown on various PE surfaces

제 4 장 기능성 관능기 (-OH 기) 가 도입된 고분자 재료 표면의 세포 친화성

제 1 절 서 론

그동안 본 연구실에서 행해온 연구 결과에 의하면 고분자 재료 표면에 존재하는 관능기들 중에서 수산기 (hydroxyl group, -OH 기) 가 세포 친화성 향상에 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다 (18, 20). 수산기를 고분자 재료 표면에 도입시키기 위하여 그동안 본 연구실에서는 perchloric acid 용액을 사용하여 왔다.

본 장에서는 고분자 표면에 -OH 기를 좀 더 간편하고 효율적으로 도입하기 위하여 여러가지 고분자 재료 표면에 water vapor plasma 방전 처리를 하고, -OH 기가 도입된 고분자 재료 표면들에서의 세포 친화성을 연구하였다 (21).

제 2 절 실험방법

1. 고분자 시료 및 시료의 전처리

첨가제가 전혀 함유되어 있지 않은 고분자 sheet 들, 즉 polyethylene (PE), polypropylene (PP), polyethylene terephthalate (PET), polymethyl methacrylate (PMMA) 등과 polystyrene (PS) plate (bacteriological grade, cell culture dish, 녹십자의료공업(주)) 가 water vapor plasma 처리 및 세포 배양에 사용되었다.

이들 고분자 시료들은 제 2장 제 2절 1항에서와 동일한 방법으로 clean 처리 되었다.

2. Water vapor plasma 방전 처리 및 세포 배양

본 연구실에서 자체 제작한 radio-frequency glow discharge (RFGD) plasma 방전 장치를 이용하여 water vapor 분위기하에서 고분자 시료들을 처리하였다 (그림 4-1). RFGD generator 의 전력 공급원은 200 volt, 160 mA (100 KHz) 이었다. Plasma 방전 처리는 0.1 torr 의 진공을 유지하고 있는 bell-jar 형 반응기내에서 수행되었다. Clean 처리된 고분자 시료를 반응기 내부의 round plate 금속 전극 위에 올려 놓은 다음 반응기 내부에 진공을 걸어 10 min 동안 배기시켰다. 그런 다음 40°C 를 유지하고 있는 항온조에 담가져 있는 flask 로부터 100 ml/min 의 유속으로 10 min 동안 water vapor 를 반응기내로 주입시켜 주었다. Water vapor 가 계속 주입되고 있는 상태에서 고분자 시료들을 일정 시간동안 plasma 방전 시켰다. 상기 조건에 의해 plasma 방전 처리 했을때, 시료가 처리되는 동안 안정된 plasma 방전이 이루어지는 것을 눈으로 확인할 수 있었다. Plasma 방전이 끝나면 water vapor 주입을 중단하고 다시 10 min 동안 배기시킨후 처리된 시료를 반응기에서 꺼내 물성 평가를 하였다. Water vapor plasma 방전 처리된 고분자 표면들은 물 접촉각 측정과 ESCA 에 의해 분석되었다. ESCA 분석시 survey scan spectrum 들과 carbon 1S core level scan spectrum 들이 취해졌다. 자세한 분석 내용은 제 2장 제 2절 3항에 잘 나타나 있다.

Water vapor plasma 방전 처리된 고분자 표면들은 CHO 세포들을 사용해 제 2장 제 2절 4항에서와 동일한 방법으로 세포 배양 실험에 사용되었다. 재료 표면에 부착증식한 세포들은 위상차 현미경과 SEM 에 의해 관찰되었는데 SEM 으로 재료 표면에 부착된 세포들을 관찰하기 위한 시료 준비는 다음과 같은 방법으로 행하였다. 우선 재료 표면에 세포들을 PBS 용액으로 세척후 PBS 용액을 사용해 2% 농도로 제조한 glutaraldehyde 내에 15~20 min 동안 담가 표면에 세포를 고정 시킨 다음 역시 PBS 용액을 사용해 6.8% 농도로 제조한 sucrose 용액에 30 min 동안 담갔다 꺼내고 나서, ethanol series 즉 50, 60, 70, 80, 90, 100% ethanol 용액에 각각 10 min 씩 담갔다 꺼내 dehydration 시켰다. Dehydration 된 시료들은 실온에서 건조후 SEM 관찰에 사용되었다.

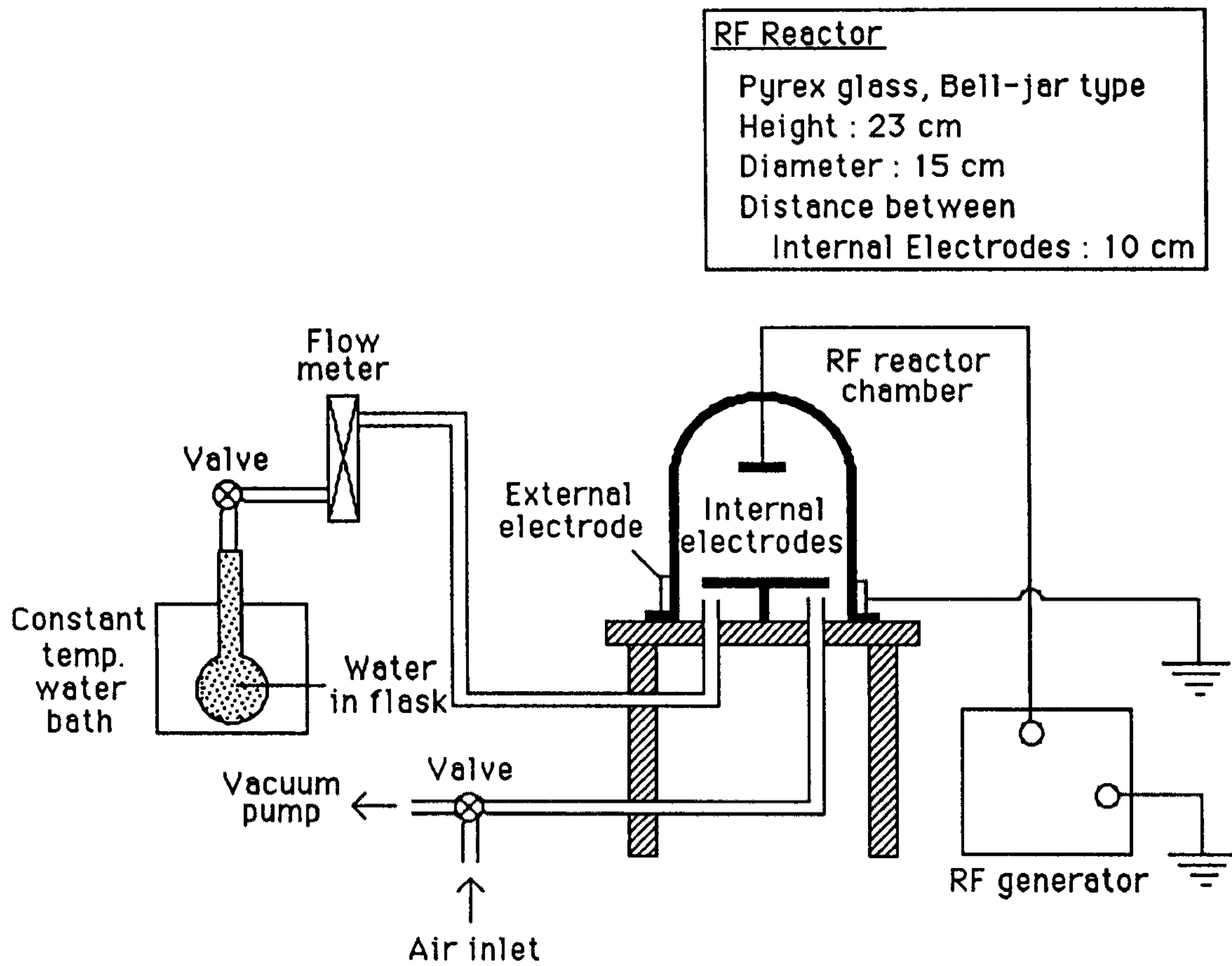


Figure 4-1. Schematic diagram of water vapor plasma discharge apparatus

제 3 절 결과 및 고찰

1. Water vapor plasma 방전 처리된 표면의 물성 평가

그림 4-2 는 water vapor plasma 방전 처리된 고분자 표면들의 물 접촉각 측정 결과를 나타내고 있다. 고분자 시료 표면의 물 접촉각은 plasma 노출시간이 증가함에 따라 급격히 감소하는 경향을 보였다. 그러나 plasma 노출시간이 약 10 sec 이상이 되었을때, 사용한 고분자 시료들 모두 더 이상의 변화를 나타내지 않았다. 본 연구에서는 water vapor plasma 방전 시간을 30 sec 로 고정하여 고분자 시료들을 처리하여 세포 부착 및 증식 경향 연구에 사용하였다.

Water vapor plasma 처리에 의해 고분자 시료 표면에 나타나는 화학적 구조 변화는 ESCA 에 의해 분석되었다. 그림 4-3 은 water vapor plasma 처리한 PE 과 oxygen plasma 처리한 PE 표면의 ESCA survey scan spectrum 들을 비교한 것이다. Oxygen plasma 방전 처리는 water vapor 대신 산소 개스를 사용했다는 것을 제외하고는 water vapor plasma 방전 처리와 동일한 조건으로 행해졌다. Spectrum 상에서 보듯이, control PE 즉 clean 처리만 된 PE 표면의 경우 binding energy, 285 eV 에서 carbon peak 만을 나타내고 있다. Oxygen plasma 또는 water vapor plasma 처리된 표면의 spectrum 상에 나타난 oxygen peak 들 (binding energy, 532 eV) 은 이들 시료 표면이 plasma 방전 처리에 의해 산화 되었음을 의미한다. Plasma 방전 처리에 의한 재료 표면의 산화는 곧 재료 표면에 산소를 함유하는 functional group 들이 도입되었다는 것을 나타내고 있다. ESCA survey scan spectrum 들로 부터는 oxygen plasma 방전시나 water vapor plasma 방전시에 spectrum 상에 나타난 oxygen peak 의 높이가 거의 비슷하게 나타난 걸로 보아, 두 plasma 방전 처리에 의해 표면에 산화된 정도가 거의 비슷한 것으로 판단될 수 있으나, 도입된 산소를 함유하는 functional group 의 종류에 대한 정보를 제공해 주지 못하고 있다.

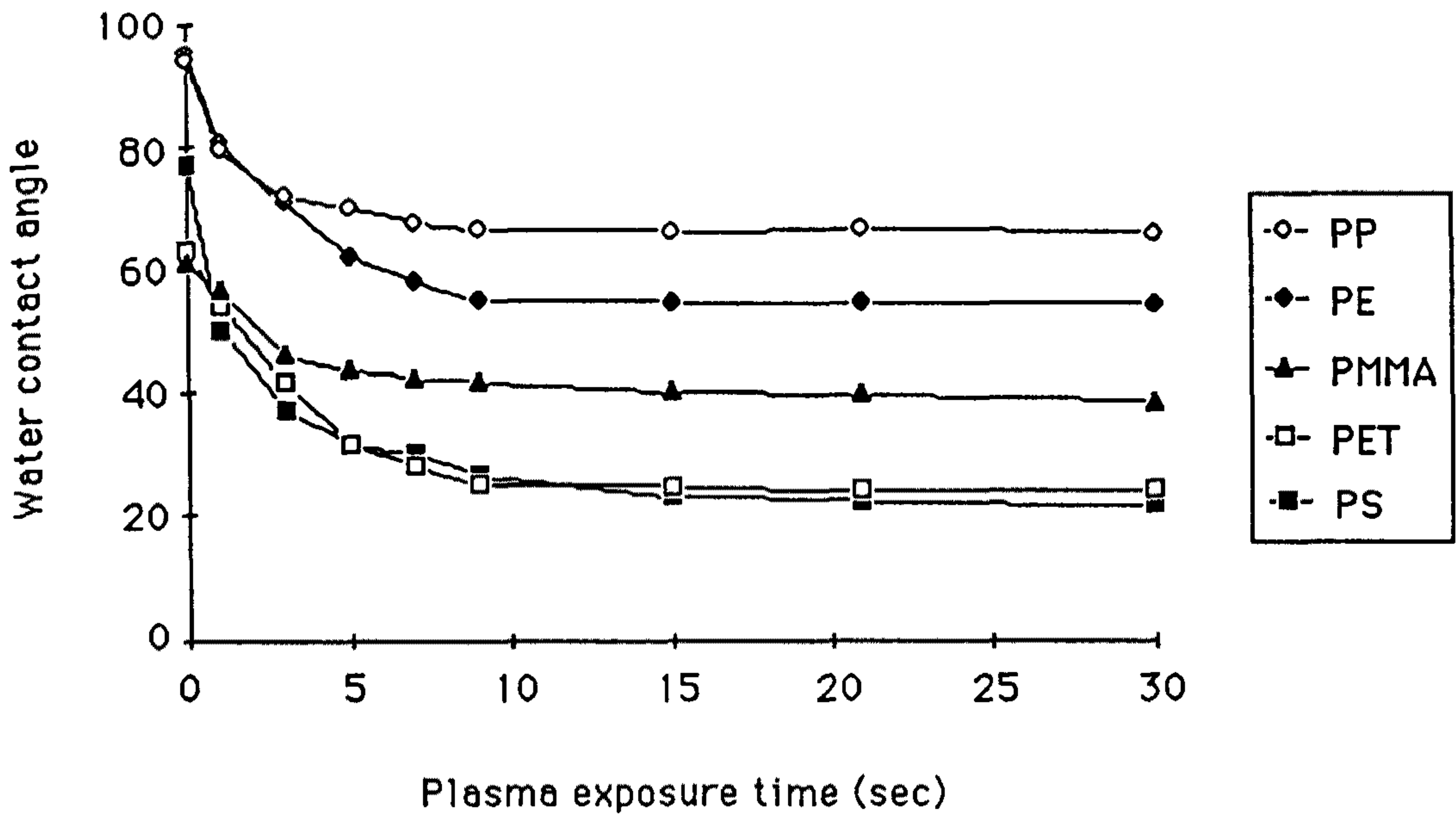


Figure 4-2. Changes in the water contact angle of polymer surfaces with different water vapor plasma exposure time

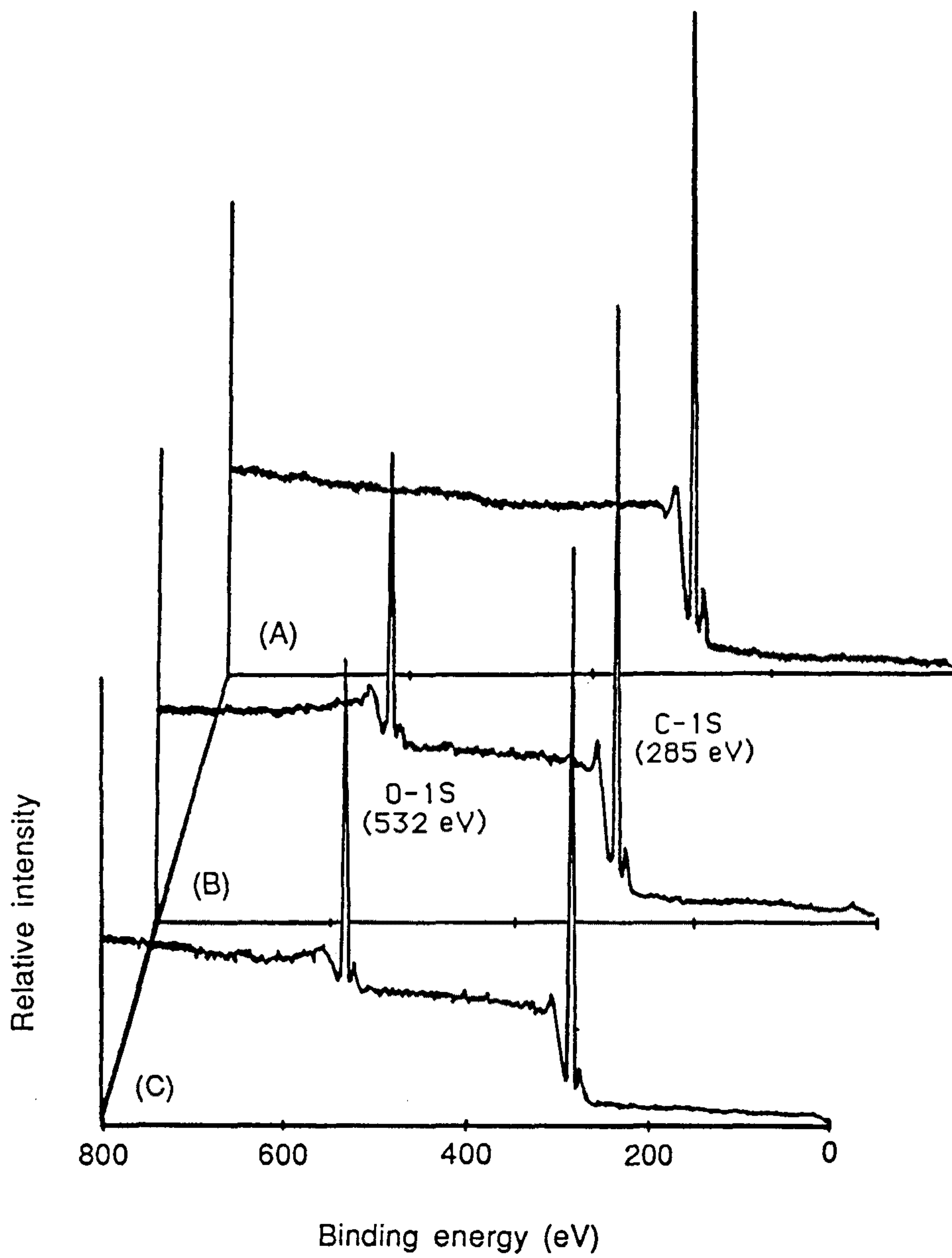


Figure 4-3. ESCA survey scan spectra of (A) control, (B) O₂ plasma-treated (30 sec) and (C) H₂O plasma-treated (30 sec) PE surfaces

Plasma 방전 처리에 의해 표면에 도입된 functional group 에 대한 정보는 ESCA carbon 1S core level spectrum 분석에 의해 알 수가 있다. 그림 4-4 는 oxygen plasma 처리한 PE 과 water vapor plasma 처리한 PE 표면의 ESCA carbon 1S core level scan spectrum 들을 비교한 것인데 표면에 형성된 functional group 들은 oxygen plasma 와 water vapor plasma 방전 처리 경우에 현저한 차이점을 보이고 있다. 그림 4-4 (A) 에서 보듯이 clean 처리만한 PE 표면은 하나의 peak, 즉 alkyl carbon 만으로 구성되어 있다. Oxygen plasma 처리된 표면 (그림 4-4 (B)) 은 네개의 peaks, 즉 spectrum 에 나타낸 것과 같은 4가지 종류의 산소를 함유하는 functional group 들로 구성되어 있는 반면에, water vapor 처리된 표면 (그림 4-4 (C)) 은 표면에서 형성된 거의 모든 functional group 들이 -OH 기로 되어 있음을 볼 수 있다. PE 뿐만이 아니라 PP, PS, PET, PMMA 표면들 역시 비슷한 결과를 나타내었다. 따라서 water vapor plasma 방전 처리가 고분자 표면에 -OH 기를 도입하기 위한 간단하고도 효율적인 방법이라는 것이 ESCA 분석 결과에 의해 입증되었다.

표 4-1 은 여러가지 고분자 시료에 water vapor plasma 방전 처리를 하여 도입된 산소의 양과 -OH 기의 양을 ESCA 에 의해 비교 분석한 결과를 보여주고 있다. Water vapor plasma 방전 처리에 의해 고분자 재료 표면에 도입된 -OH 기의 양은 PE, PS, PET 등의 순이고 PP 의 경우가 가장 작게 나타났음을 보여주고 있다.

2. Water vapor plasma 방전 처리된 표면에서의 세포 부착 및 증식 경향

그림 4-5 는 여러가지 고분자 시료를 water vapor plasma 방전 처리하여 -OH 기를 도입시켰을때와 처리하지 않았을때 세포들이 표면에 부착된 양상을 보여주고 있다. CHO 세포들을 2hr 이틀 표면 각각에 배양시킨후 위상차 현미경으로 400배 확대하여 관찰한 사진들인데, 처리하지 않은 고분자 표면들 경우에는 세포들이 표면에서 둥근 형태를 띠고 있으며, water vapor plasma 처리한 표면들의 경우

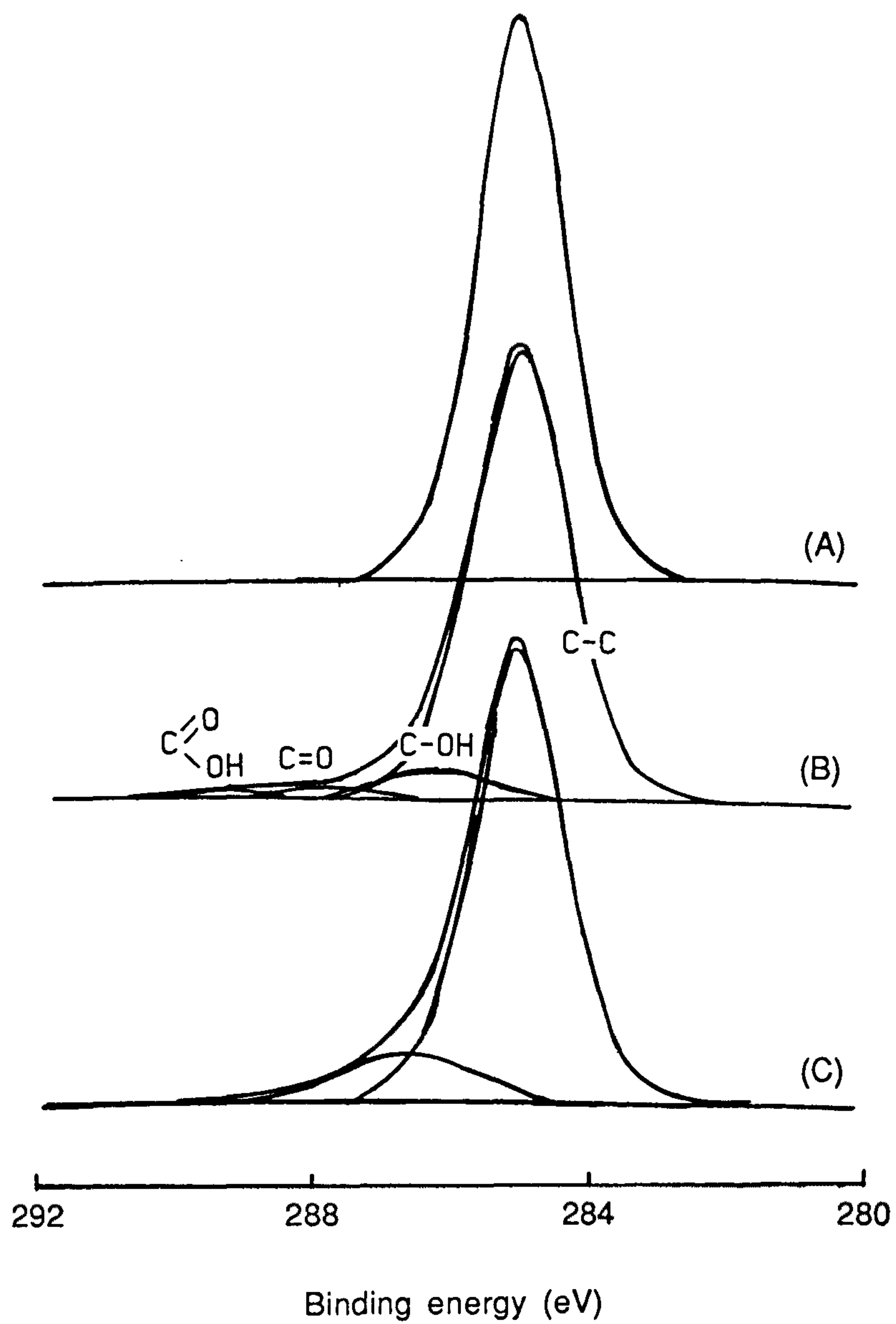


Figure 4-4. ESCA carbon 1S core level scan spectra of (A) control, (B) O₂ plasma-treated (30 sec), and (C) H₂O plasma-treated (30 sec) PE surfaces

Table 4-1

ESCA Analysis of H₂O Plasma-treated (30 sec) Polymer Surfaces

| Substrate | Oxygen Content (%) | C-OH/C-C (%) |
|-----------|--------------------------|--------------|
| PE | 19.2 | 13.0 |
| PP | 10.3 | 5.4 |
| PS | 17.1 | 7.8 |
| PET | 37.5 (34.3) ^a | 7.1 |
| PMMA | 34.8 (31.5) ^a | 6.6 |

^a Oxygen contents of the control surfaces

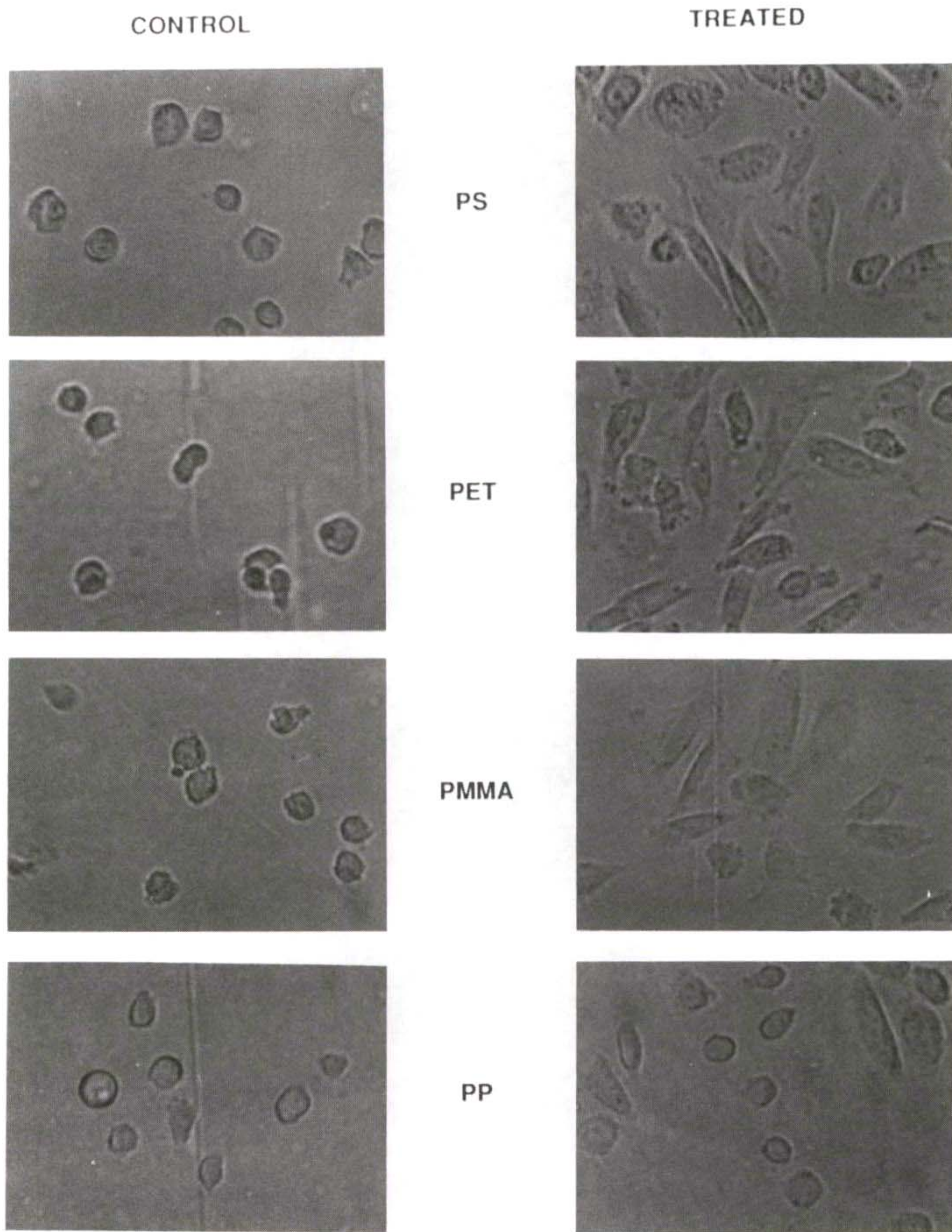


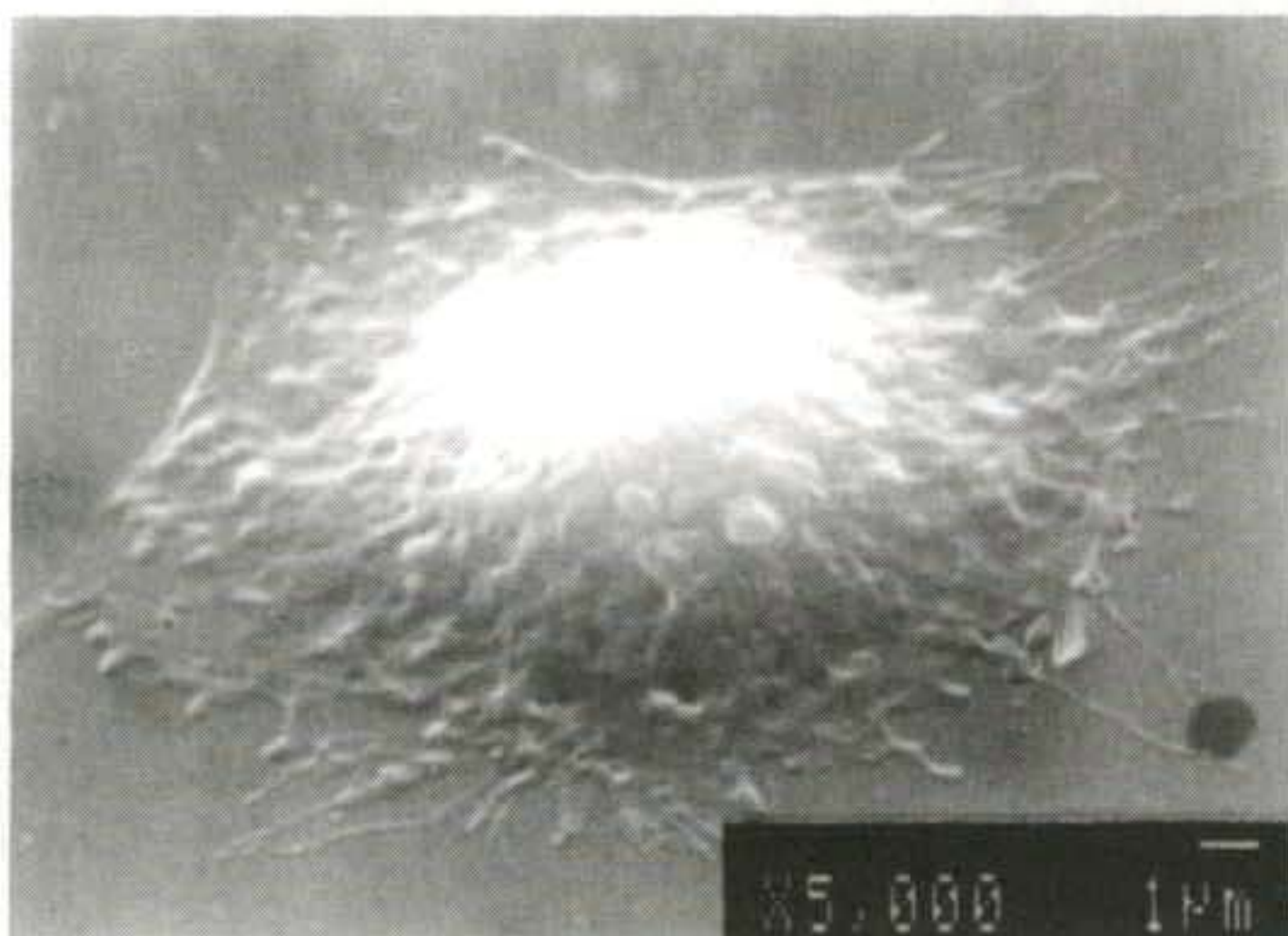
Figure 4-5. Appearance of CHO cells adhered on control and H₂O plasma-treated polymer surfaces (Culture time, 2 hr ; inverted microscope, x400)

에는 부착된 세포들이 길쭉하게 spreading 되어 있음을 볼 수가 있다. 앞항의 ESCA 분석 결과 (표 4-1) 에서 나타났듯이 water vapor plasma 처리된 표면들에 도입된 -OH 기의 양은 PS, PET, PMMA, PP 의 순이었는데, 표면에 도입된 -OH 기의 양이 많을수록 세포가 더 잘 spreading 이 되고 있으며, 도입된 -OH 기의 양이 가장 작은 PP 의 경우에는 세포들의 spreading 이 그다지 양호하게 나타나지 못하고 있다 (PE 의 경우에는 sheet 의 재질 자체가 반투명 내지 거의 불투명하여 위상차 현미경으로 세포의 부착 상태를 확인하지 못하였다).

일반적으로 세포는 자기가 contact 하고 있는 표면이 자신이 성장하기에 적합하다고 판단이 되면 spreading 현상을 보이는 것으로 알려져 있다. 그림 4-6 은 세포가 재료 표면에 부착하여 실제로 spreading 되는 과정을 관찰하기 위하여, water vapor plasma 처리하여 -OH 기를 도입시킨 PS 표면에 CHO 세포를 배양하여 SEM 으로 5000배 확대하여 관찰한 사진들이다. 세포가 일단 재료 표면에 부착하여 (그림 4-6 (A)) 자신이 성장하기에 적합한 표면, 즉 세포 친화성 표면이라고 판단되면 재료 표면에 의족을 뻗게 되고 (그림 4-6 (B)), 다음 단계에서 세포질 표면에 거미줄 형태의 망상 구조가 나타나고 (그림 4-6 (C)), 세포가 표면에 납작하게 퍼지면서 (그림 4-6 (D)), 길쭉하게 spreading 을 완결시킨다 (그림 4-6 (E)) (22).

그림 4-7 은 그림 4-5 와 마찬가지로 처리하지 않은 고분자 재료들과 water vapor plasma 처리를 하여 -OH 기를 도입한 고분자 재료 표면들에 CHO 세포를 24 hr 배양한후 이들 표면에서 세포가 증식한 정도를 역시 위상차 현미경으로 100배 확대하여 관찰한 사진들이다. 고분자 재료 표면을 처리하지 않았을때에는 24 hr 배양한 후에는 세포들이 spreading 을 거의 못하고 있으며 증식성도 좋지 않음을 보여주고 있다. 그러나 water vapor plasma 처리한 표면들인 경우에는 길쭉하게 spreading 된 세포들이 양호하게 증식하고 있는 것을 볼 수 있다. 특히 표면에 도입된 -OH 기의 양이 비교적 많은 PS 이나 PET 의 경우에는 24 hr 배양후 세포들이 표면에 거의 monolayer 로 콤팩하게 배양되고 있으며, 도입된 -OH 기의 양이 작은 PP 의 경우에는 spreading 이나 증식성이 그다지 양호하지 못하게 나타

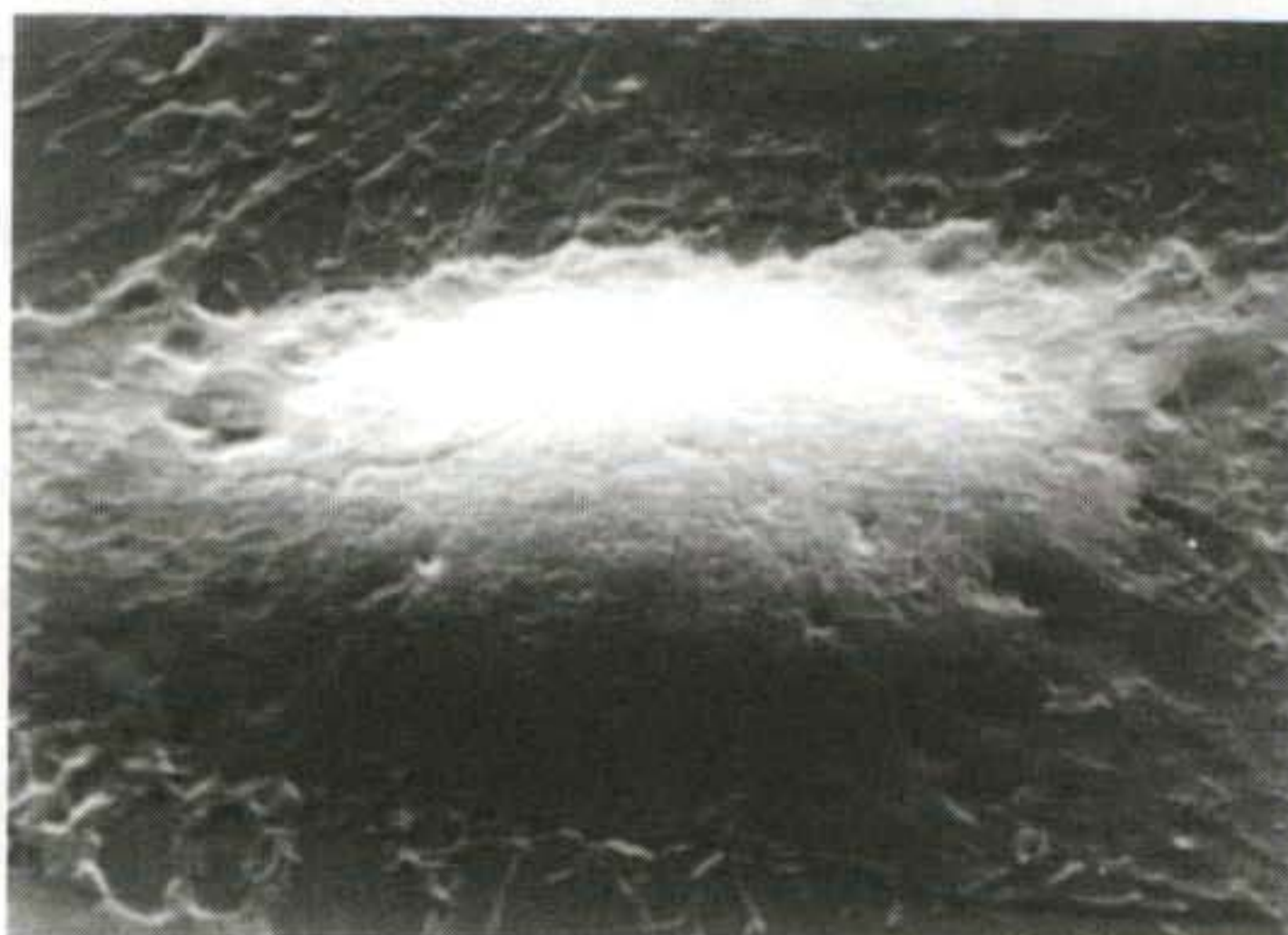
A) CELL ATTACHMENT



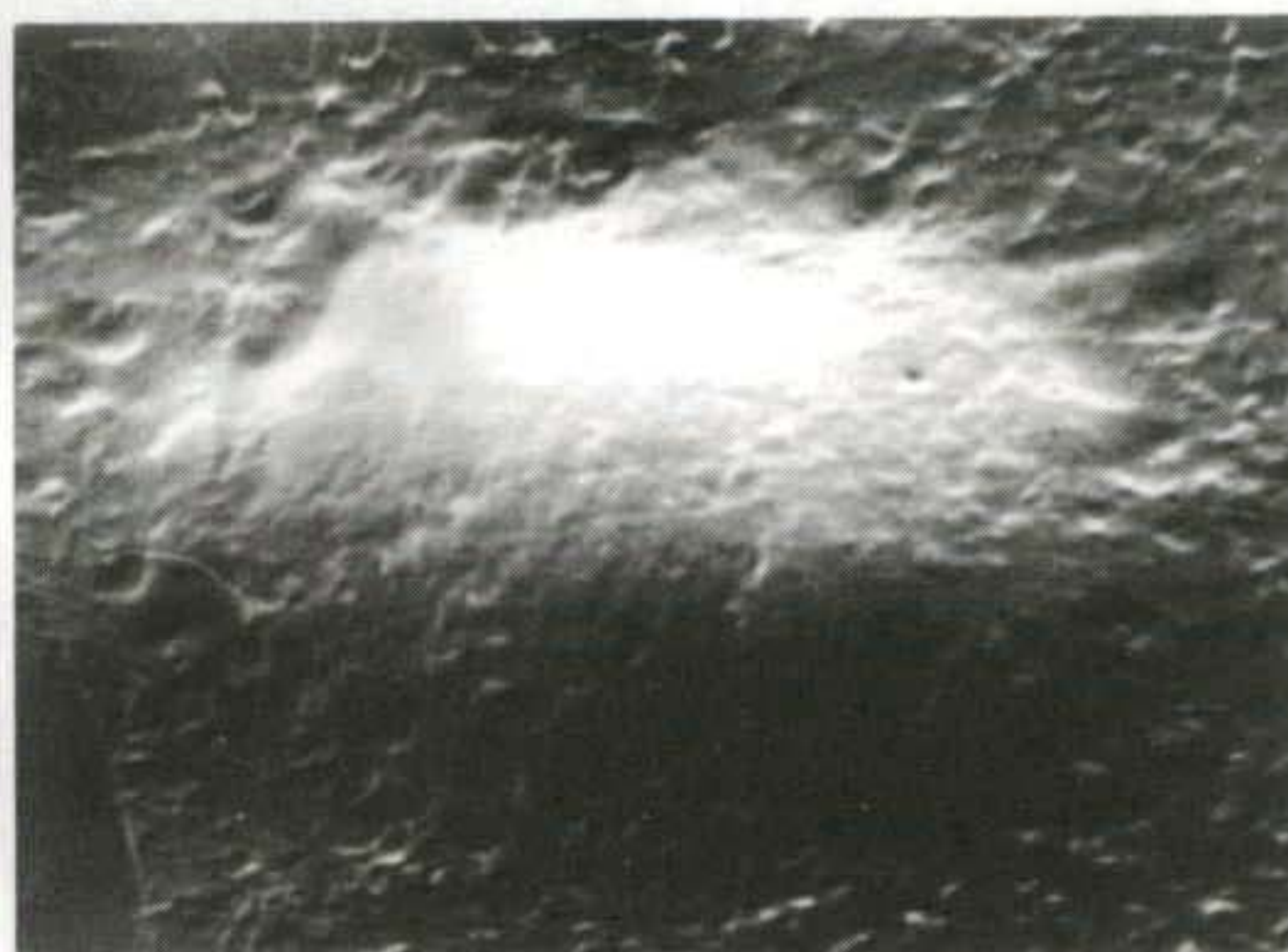
B) FILOPODIA GROWTH



C) CYTOPLASMIC WEBBING



D) FLATTENING



E) COMPLETE SPREADING



Figure 4-6. Appearance of CHO cell adhered and spread on H_2O plasma-treated PS surface (SEM, x5,000)

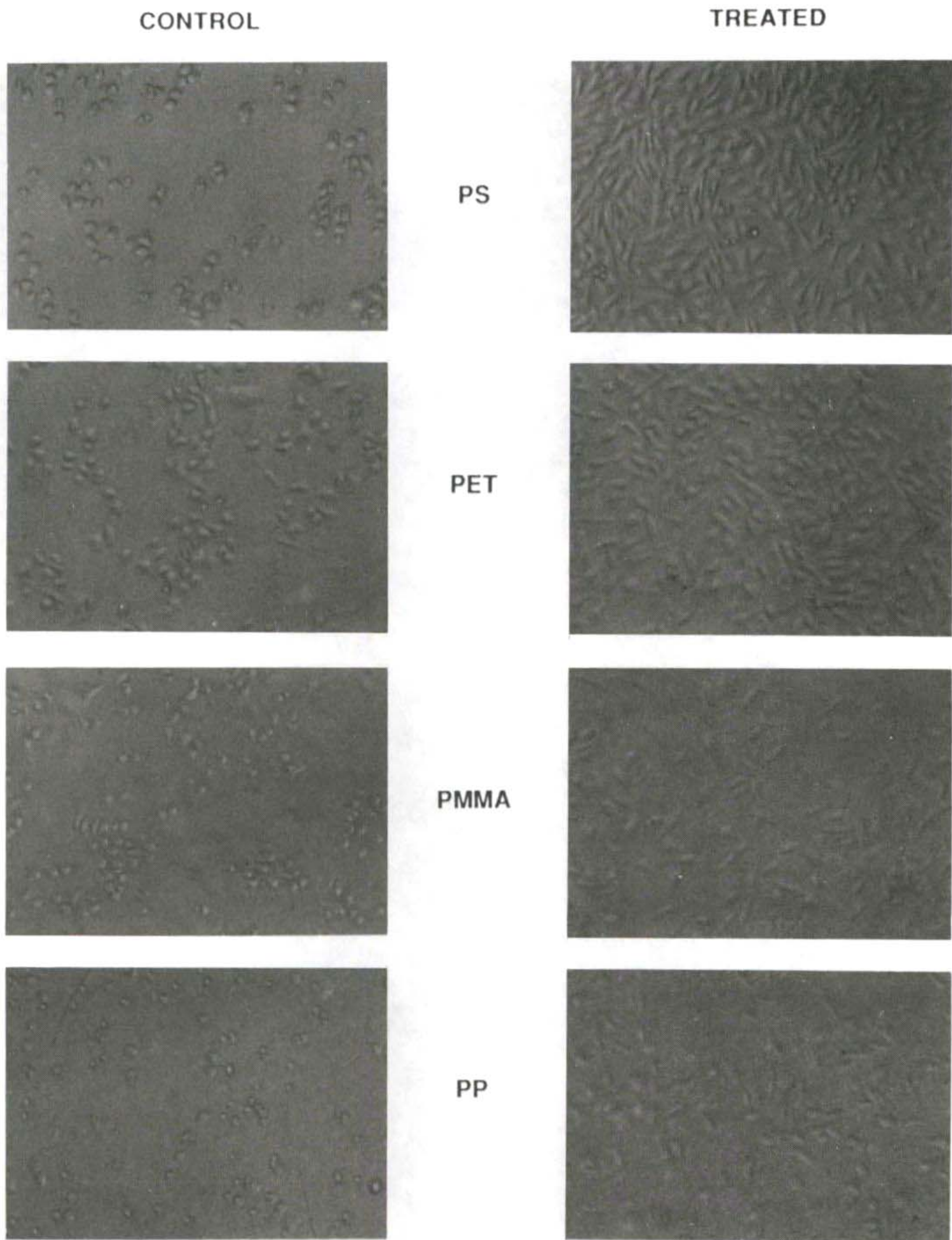


Figure 4-7. Appearance of CHO cells grown on control and H₂O plasma-treated polymer surfaces (Culture time, 24 hr ; inverted microscope, x100)

났다. -OH 기가 도입된 재료 표면의 세포 친화성, 즉 부착, spreading, 증식성이 등이 양호하게 나타나는 이유에 대해서는 아직 정확하게 규명이 되어 있지 않지만 재료 표면의 -OH 기와 세포 표면의 polar group 들간의 specific hydrogen bonding 에 의한 것으로 추정하고 있다 (23).

본 장에서의 연구 결과로서, water vapor plasma 방전 처리가 고분자 재료 표면에 -OH 기를 도입하기 위한 효율적인 방법이라는 것이 입증되었고, -OH가 도입된 재료 표면의 세포 친화성이 상당히 양호한 것으로 평가되었다.

그러나 본 장에서의 연구 결과들은 서로 다른 고분자 재료 표면을 사용하였기 때문에 세포 친화성을 논의하는데 있어서 엄밀한 의미에서 -OH 기만의 효과를 나타내지는 못하고 있다. 따라서 한 재료 표면에서 -OH 기가 점진적으로 증가한다면, 즉 -OH group gradient surface 를 제조하여 세포 친화성을 연구한다면 -OH 기가 세포 친화성에 미치는 효과를 좀 더 명백히 규명할 수 있을 것이다. 본 연구실에서는 water vapor plasma 방전 장치를 이용하여 -OH group gradient surface 를 제조하는 방법을 고안해 이미 논문 발표를 하였고 (13), 이렇게 제조된 -OH group gradient surface 에서의 세포 부착 및 증식 경향을 조사하기 위한 연구를 현재 수행중에 있다.

제 5 장 알긴-기능성 고분자 혼합 겔 비드내에 세포 고정화 및 배양

제 1 절 서 론

앞의 제 2장에서 제 4장까지는 고분자 재료 표면을 개질하여 세포 친화성을 향상시켜 인공장기나 기타 의료용품에 응용하기 위한 토대를 마련하기 위한 연구이었고 본 장에서의 연구는 세포를 겔 비드내에 고정화하여 고밀도로 배양하여 세포가 자체적으로 합성·분비해 내는 유용한 물질들을 추출해 생산하기 위한 기초 연구라 할 수 있다.

세포 고정화 기술은 오래전부터 세포를 bioreactor 내에서 연속 공정에 의해 대량 생산하거나 세포가 분비하는 물질들중 유익한 성분을 대량 생산하기 위해 시도되어 왔다. 이러한 세포를 고정화 시키는 공정은 유기 용매를 사용하거나 고온 또는 아주 높거나 낮은 pH 값등 세포가 살아있기에 부적절한 조건에서는 행하여 질 수 없으므로 세포 고정화에 사용하는 matrix 는 수용액 및 완충 용액 또는 배양액 내에서 쉽게 겔을 형성할 수 있어야 하며, 물질 자체가 독성을 띄어서도 안된다. 또한 matrix 내에 고정화된 세포가 배양액내에서 성장하면서, 얻고자 하는 유익한 성분을 분비해 내야 하기 때문에 matrix 자체가 배양액 내의 자양분이나 산소등이 matrix 내의 세포로 공급될 수 있도록 어느 정도 투과성을 지녀야 한다.

이상의 조건을 만족시켜 주는 물질로서 calcium alginate gel 이 살아 있는 동물 세포를 고정화 시키기 위한 matrix 로서 사용되어져 왔다 (24). Calcium alginate gel 은 algin (일명 sodium alginate) 과 살아있는 세포가 혼합되어 있는 배양액을 CaCl_2 용액에 방울방울로 떨어뜨려 줌으로서 얻어지는데, 이렇게 제조된 겔 비드는 반투막 특성을 지니기 때문에 배양액 중에서 세포가 자라고 신진대사를 하기 위해 필요한 성분들인 분자량이 작은 자양분, 산소등의 공급이 가능하고, 분자

량이 큰 박테리아와 같이 오염원이 되는 물질의 침투를 막아 준다. 따라서 지난 10여년 동안 calcium alginate gel 을 이용한 세포 고정화에 대한 많은 연구들이 진행되어 왔고, 근래에 들어서는 calcium alginate gel 에 세포를 고정화 시켜 연속 공정에 의해 배양했을때 기존의 현탁 배양 (suspension culture) 방법보다 세포들이 더 장시간 살아있는 상태로 유지될 수 있고 세포 밀도 및 추출하고자 하는 유익한 성분의 농도가 더욱 높아진다는 보고들이 많이 나오고 있다.

이와같은 세포 고정화 방법에 의해 여러가지 세포들 또는 유전학적으로 변형시킨 세포들로부터 얻을 수 있는 추출 생성물들은, monoclonal antibodies, interferons, vaccines, interleukins, erythropoietin, insulin 등 다양하지만 현재까지는 hybridoma cell 을 이용한 monoclonal antibody 생산이 주가 되고 있다.

본 장의 연구에서는 algin 을 matrix 로 하여 여기에 -OH, -COOH, -NH₂ 등 관능기를 지닌 고분자 물질을 각각 혼합하여 살아 있는 동물세포가 내부에 고정화된 반투막 겔 비드를 제조하고, 이들 세포가 비드내에서 배양될때 사용된 각 관능기가 세포 성장에 미치는 영향을 고찰하였다 (25, 26).

제 2 절 실험방법

1. 세포 고정화에 사용한 고분자 시료

세포 고정화에 사용된 고분자 물질들은 algin (ALG, 일명 sodium alginate, Sigma), algin 과 기능성 관능기를 가진 고분자들의 혼합물 등이었다. Algin 은 PBS (pH 7.2-7.3) 용액에 용해시켜 4% 농도로 만들어 주었다.

기능성 관능기를 가진 고분자들로서는 -OH 기를 가진 polyvinyl alcohol (PVA, 분자량 약 100,000, Aldrich, U.S.A.), -COOH 기를 가진 polyacrylic acid (PAA, 분자량 약 100,000, Aldrich), -NH₂ 기를 가진 polyacryl amide (PAAM, 분자량 약 5,000,000, Aldrich) 등이었다. 이들 고분자들 역시 PBS 용액에 용해시켜 4% 농도로 만들었다.

Alginate 용액 (4%) 과 기능성 관능기를 가진 각 고분자 용액 (4%) 은 1:1 의 비로 다시 혼합해주고, 혼합 용액 각각의 pH 가 세포가 살아 있기에 적합한 7.2-7.3 정도가 되도록 1N HCl 과 1N NaOH 를 사용해 조정해 주었다.

2. 세포 고정화 및 배양

겔 비드에 고정화 시키기 위해 사용한 세포는 CHO cell 과 Baby Hamster Kidney (BHK, 녹십자의료공업(주)) cell 들이었다. 이들 세포들은 각각 interferon, erythropoietin 등을 생산하기 위해 사용되어지고 있는 세포들이다. 이들은 제 2장 제 2절 4항에서와 동일한 방법으로 PS culture flask 내에서 배양분주되었다. CHO 와 BHK cell 들을 위해 사용한 배양액은 각각 Ham's F-12 nutrient mixture 와 minimum essential medium (GIBCO) 이었다.

PS culture flask 로부터 떼어낸 CHO 와 BHK cell 들은 각각 배양액내에 혼합시켜 2×10^6 cells/ml 의 농도가 되게 만들었다. PBS 용액으로 희석하여 2% 의 농도로 만들어준 alginate 용액과 alginate (4%) / 기능성 관능기를 가진 고분자 (4%) (1:1) 혼합 용액은 autoclave 내에서 121°C 의 온도로 15 min 동안 살균 처리하고, 이들 각각에 cell suspension (2×10^6 /ml) 을 1:1 의 비로 혼합해 주었다. 최종 혼합 용액내에 세포 농도와 alginate 및 기능성 관능기를 가진 고분자의 농도는 각각 1×10^6 /ml, 1%, 1% 이었다.

그림 5-1 은 세포 고정화 및 고정화된 세포들의 배양 과정을 보여주고 있다. Cell suspension 을 포함한 alginate 용액 또는 alginate/기능성 관능기를 가진 고분자 혼합 용액을 살균처리된 일회용 주사기 (22-gauge needle, 녹십자의료공업(주)) 내에 주입하고 배양액에 1.5% 로 용해시킨 CaCl_2 용액에 방울방울로 떨어뜨렸다. 혼합 용액은 CaCl_2 용액에 떨어지면서 곧바로 세포가 내부에 고정화된 겔 비드 (평균 직경 2-3 mm) 를 형성하였다. CaCl_2 용액내에 10 min 동안 계속 교반시켜 주어 calcium 으로 안정되게 가교시킨 겔 비드들은 CaCl_2 용액으로부터 여과 분리하고 배양액으로 여러번 세척해준 다음 배양액을 담고 있는 petri dish (녹십자의

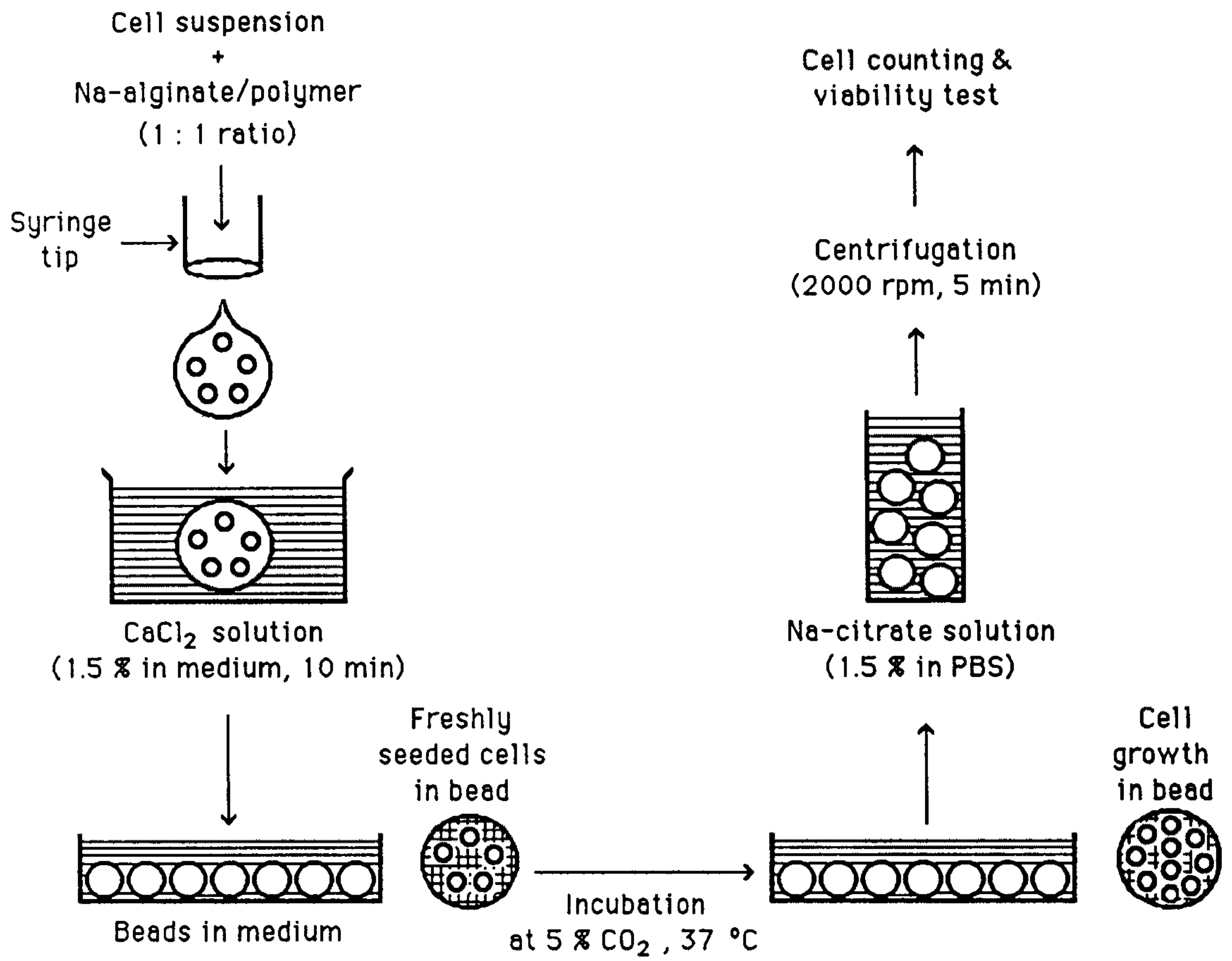


Figure 5-1. Experimental scheme showing cell immobilization, cultivation, and analysis processes

료공업(주)) 에 옮겨 37°C, 5% CO₂ 개스 분위기를 유지하고 있는 incubator 내에서 겔 내부에 고정화된 세포들을 배양하였다. 배양액은 1~2 일에 한번씩 새로운 액으로 교체하여 주었다.

3. 배양된 세포 및 겔 비드 분석

그림 5-1 에 나타난 바와 같이, petri dish 내에서 일정시간 배양후 겔 비드들의 일부를 취해 PBS 용액으로 세척하고 aspiration 시켜 정확한 무게를 측정해 둔 다음, PBS 용액으로 1.5% 의 농도로 용해시킨 sodium citrate 용액내에 집어 넣어 서서히 흔들어서 주었다. Calcium 으로 가교된 겔 비드들이 sodium citrate 용액내에서 가교가 풀어지면서 용해되어 액이 투명해지면, 원심분리기에 의해 2000 rpm 으로 5 min 동안 원심분리하여 세포들만 분리해 내었다. 분리된 세포들은 Hank's balanced salt solution (Sigma) 에 다시 현탁시키고, 0.4% trypan blue (Sigma) 로 세포들을 염색시키면 죽은 세포들이 푸른색으로 염색되어 살아 있는 세포와 구분되었다. 세포들의 생존율과 살아 있는 세포들의 갯수는 haemocytometer 와 위상차 현미경을 사용해 산출하였다.

겔 비드들의 일부는 물로 세척후, 냉동 건조하고 면도날로 반을 잘라 SEM 에 의해 내부 구조가 관찰되었다. 배양액 내에서 겔 비드에 고정화 되어 자라고 있는 세포들은 직접 위상차 현미경에 의해 관찰되었다.

제 3 절 결과 및 고찰

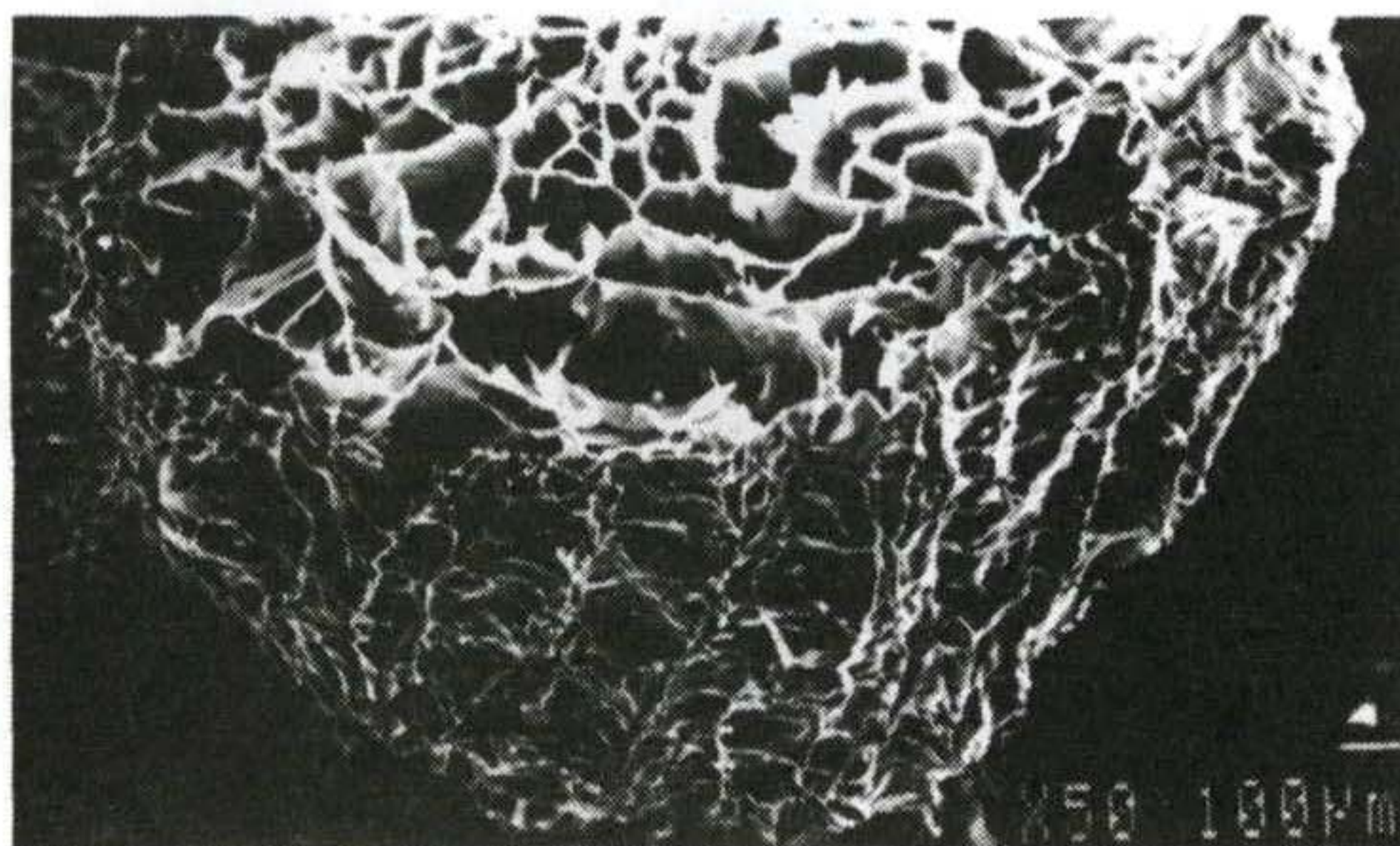
Algin (또는 sodium alginate) 은 β -D-mannuronate 와 α -L-gluconate 가 1-4 glycosidic linkage 에 의해 결합되어 있는 천연산 공중합체이다. Algin 은 일반적으로 Ca²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺ 등과 같은 다가 양이온들과 강한 친화력을 가져, 다가 양이온을 함유한 수용액내에서 쉽게 가교되어 반투막 겔을 형성하며 독성이 없어 세포 고정화를 위한 matrix 로 널리 사용되고 있는 물질이다.

그림 5-2 는 algin 겔 비드 또는 algin/기능성 관능기를 가진 고분자 혼합 겔 비드들의 내부 구조를 SEM 으로 관찰한 사진들이다. 비드들 내부가 상당히 많은 open pore 들로 이루어져 있음을 볼 수 있으며, algin 겔 비드 또는 algin/PAA (-COOH 기) 혼합 겔 비드의 경우에는 내부 구조가 벌집 모양의 random open-pore 구조를 하고 있는 반면에 algin/PVA (-OH 기) 혼합 겔 비드 경우에는 이들과는 달리 중심 방향으로 향하는 channel-type open-pore 구조를 하고 있는 것을 볼 수가 있다. 세포들은 이들 비드 내부의 pore 들 사이에서 고정화되어 자라게 되며, 세포들이 성장하는데 필요한 영양분이나, 산소, 탄소 공급원으로서의 glucose 등은 배양액으로부터 비드 표면의 반투막을 통해 공급 받게 된다 (그림 5-3). 또한 세포 증식을 억제하는 ammonia 나 lactate 등과 같은 세포 분비물들은 역시 비드 표면의 반투막을 통해 밖으로 빠져 나간다. 세포들이 비드내에서 고밀도로 성장하면서 합성분비해내는 유용한 성분들은 분자량에 따라서 비드 내부 또는 외부에서 추출해 낼 수 있다.

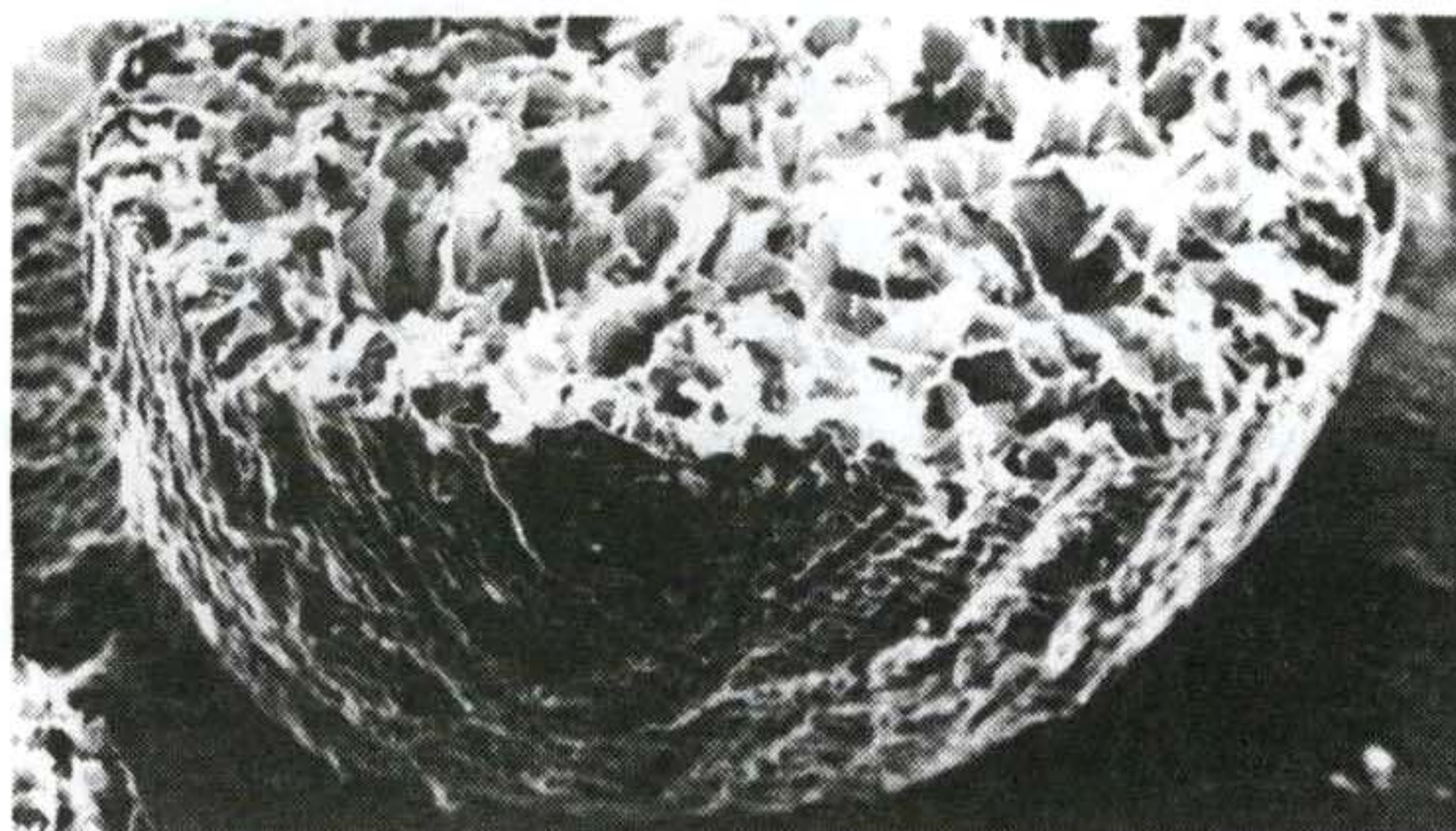
Algin 겔 비드 또는 algin/기능성 관능기를 가진 고분자 혼합 겔 비드들 내부에 고정화된 CHO 또는 BHK 세포들은 petri dish 내에서 배양되었다. 그림 5-4 는 algin 겔 비드와 algin/기능성 관능기를 가진 고분자 혼합 겔 비드들내에서 고정화되어 petri dish 내에서 3 day 동안 자란 BHK 세포들을 직접 위상차 현미경으로 관찰한 사진들이다. 비드들 내에서 점점으로 보이는 것들이 BHK 세포들인데, 세포들이 겔 비드내에 골고루 분산되어 자라고 있는 것을 볼 수가 있다.

비드내에서 일정시간 배양후, CHO 와 BHK 세포들의 생존률 (viability) 을 조사하기 위해 trypan blue 염색후에 haemocytometer 와 위상차 현미경을 사용하였다. 죽은 세포들은 위상차 현미경으로 관찰시 푸른색으로 염색되어 있어 살아 있는 세포들과 쉽게 구분이 되었다. 세포의 생존율은 총 세포들중에서 살아 있는 세포들의 백분율에 의해 결정되었다. 그림 5-5 에서 보듯이 배양시간이 경과 하더라도 겔 비드내에 고정화된 세포들의 생존율은 거의 감소되지 않았다. 특히 algin/PVA 혼합 겔 비드내에 고정화된 세포들은 CHO 세포의 경우에 생존율이

ALG



ALG/PAA



ALG/PVA

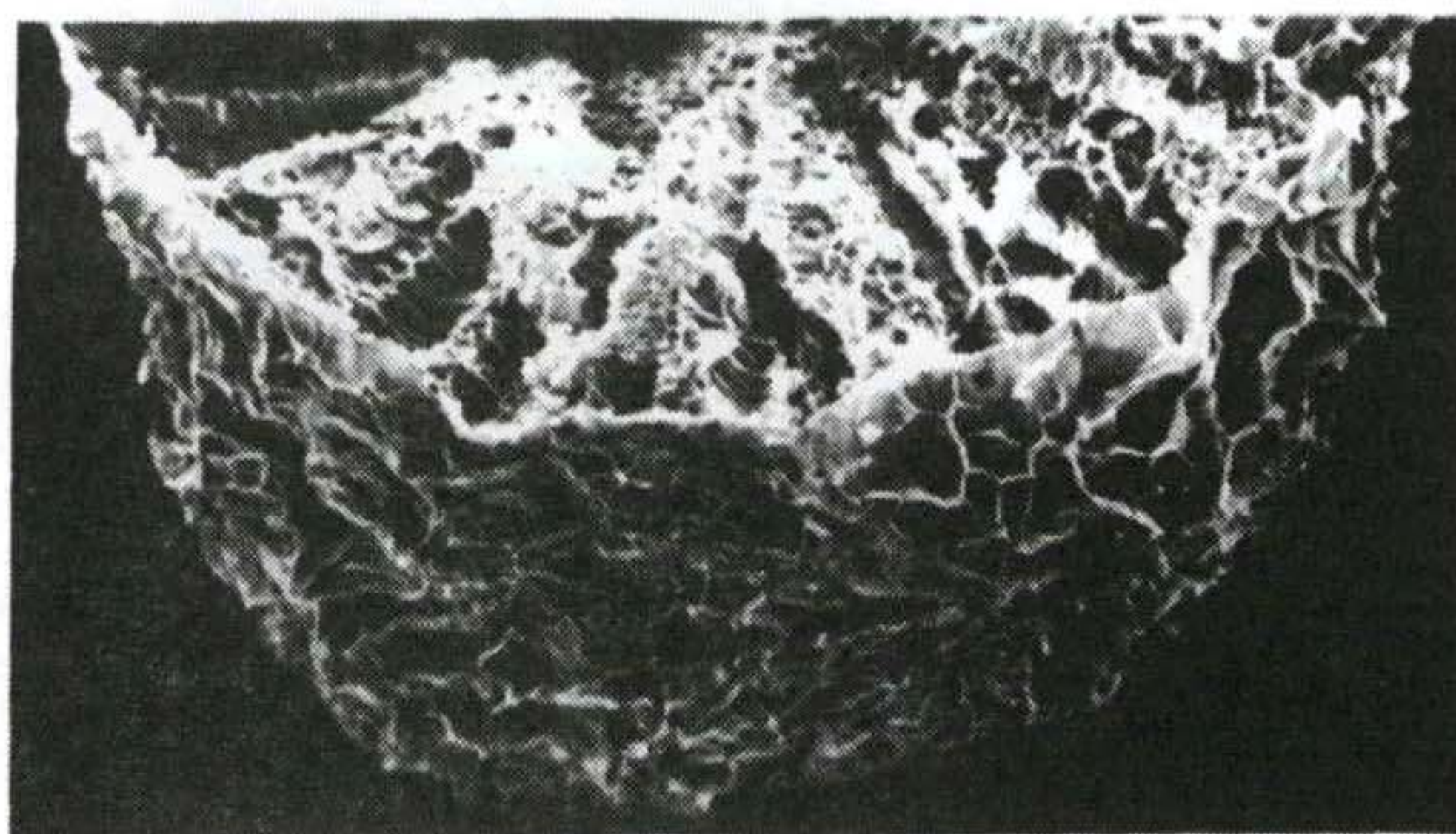


Figure 5-2. SEM pictures of the gel beads prepared by alginate and alginate/functional polymer mixtures after freeze-drying and half-cutting (x50)

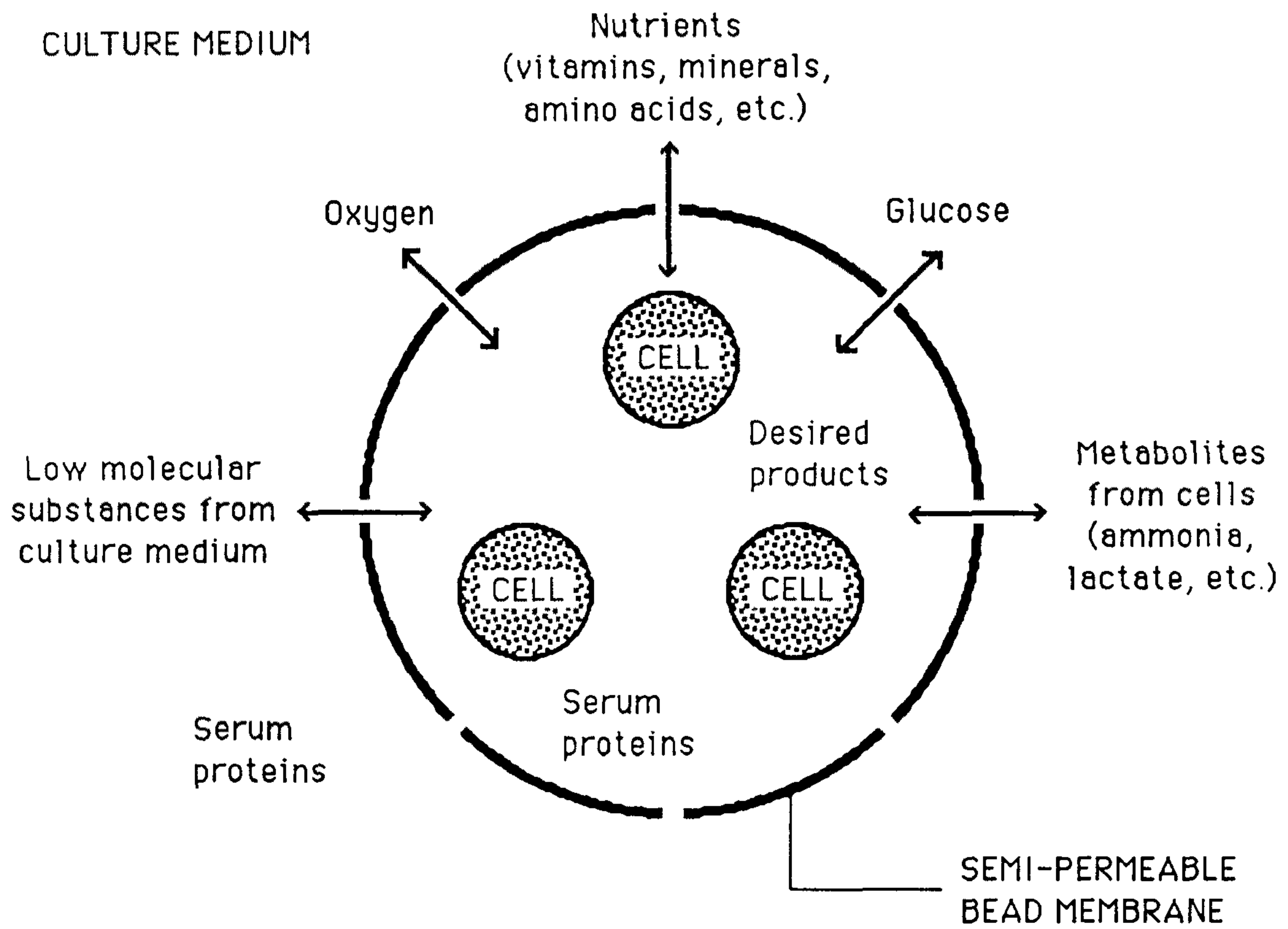


Figure 5-3. Schematic diagram showing the transport of the low molecular substances between the cells in the gel bead of algin or algin/functional polymer mixture and culture medium

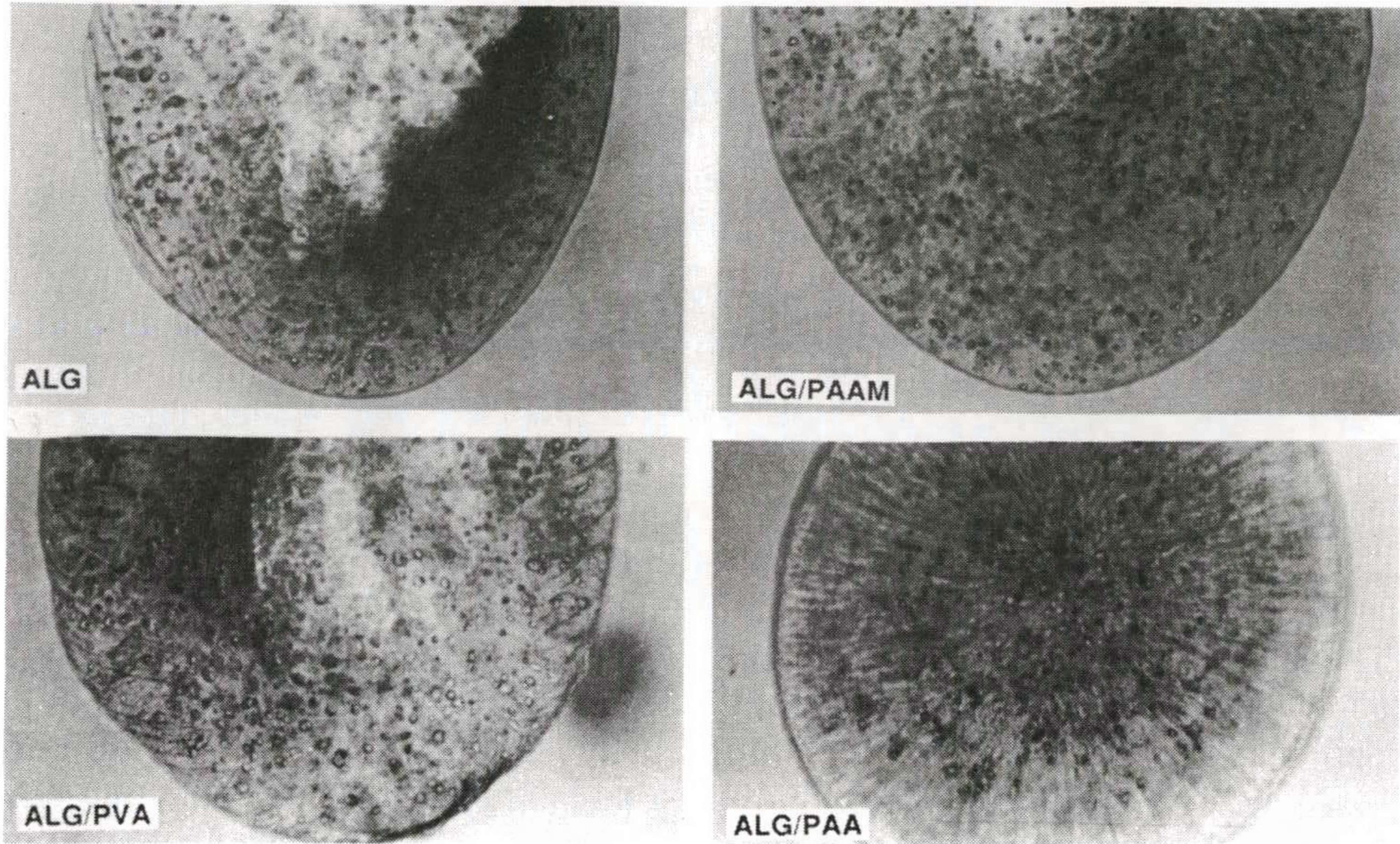


Figure 5-4. Appearance of BHK cells immobilized and growing in the gel beads of algin and algin/functional polymer mixture after 3 days culture in petri dishes (Inverted microscope, x 40)

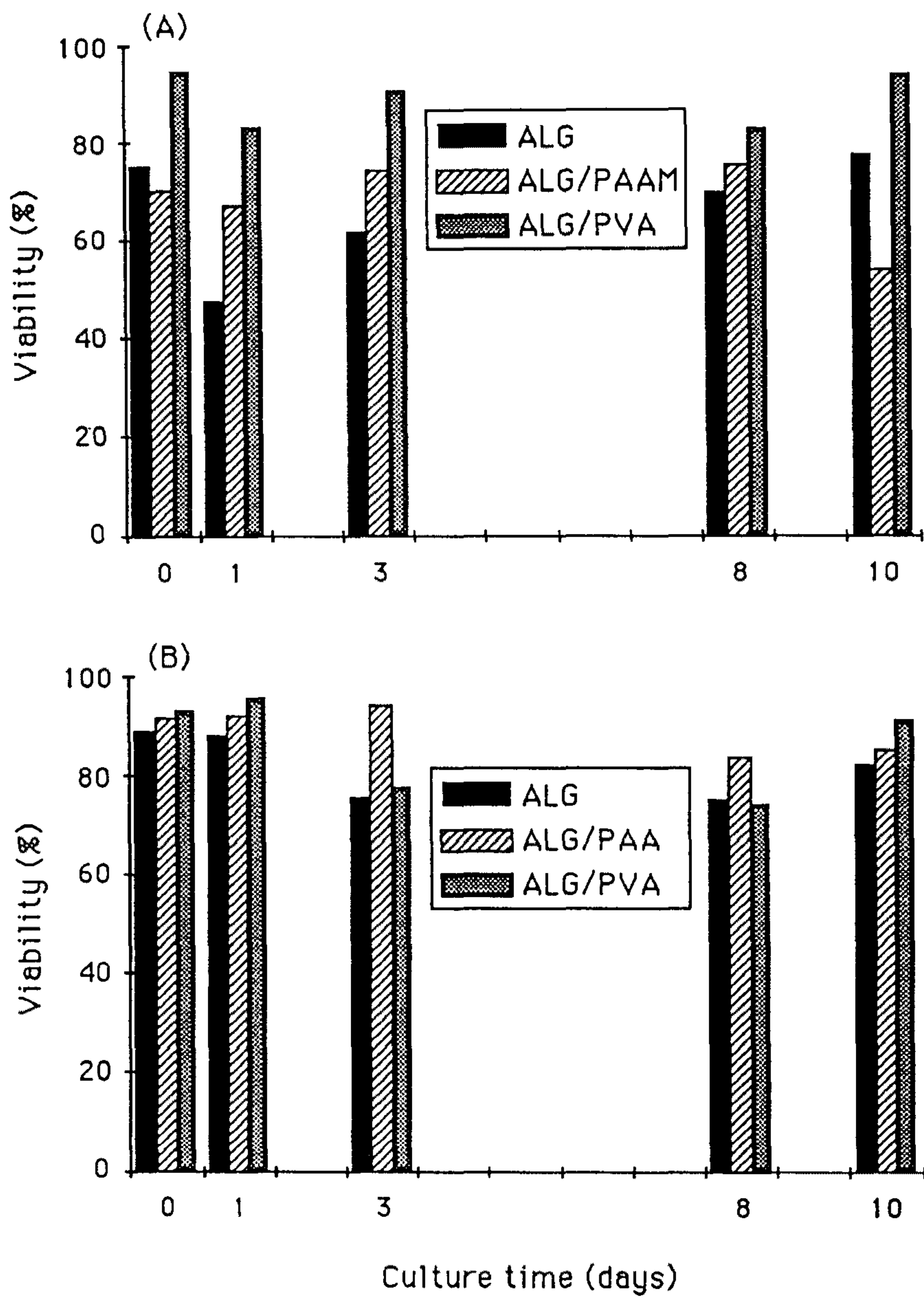


Figure 5-5. Viabilities of CHO and BHK cells immobilized in the gel beads of algin and algin/functional polymer mixture as a function of culture time, (A) CHO cells and (B) BHK cells

배양기간에 관계없이 80% 이상으로 algin 겔 비드 또는 다른 혼합 겔 비드들의 경우보다 우수하게 나타났다. BHK 세포의 경우에는 세포를 고정화한 겔 비드들의 종류와 무관하게 생존율이 모두 70% 이상을 나타내었다.

그림 5-6 은 algin 과 algin/기능성 관능기를 가진 고분자 혼합 겔 비드 1 gram 당 살아서 증식 되어 있는 CHO 와 BHK 세포들의 갯수, 즉 살아 있는 세포 밀도를 배양시간에 따라 나타낸 것이다. 세포들은 배양 시간이 지남에 따라 겔 비드들내에서 증식하고 있음을 볼 수 있다. 특히 algin/PVA 혼합 겔 비드의 경우에는 CHO 세포의 증식성이 algin 겔 비드나 다른 혼합 겔 비드 보다 월등히 우수하게 나타나, 10일 배양후에 세포들의 갯수가 약 3배로 증가 하였다. BHK 세포는 3일 배양시까지 세포들이 거의 자라고 있지 못하다가 역시 algin/PVA 혼합 겔 비드의 경우에 10일 배양후 세포들의 갯수가 역시 약 3배로 증가하였다.

왜 algin/PVA 혼합 겔 비드가 algin 겔 비드나 다른 혼합 겔 비드 보다 세포 생존율과 증식성에 있어서 우수한지에 대해서는 정확하게 밝혀지지 않았지만, 두 가지 관점, 즉 비드들의 morphology 와 화학적 구조를 고려해 볼 수 있다. 우선 비드들 내부 구조를 비교해 볼때, 그림 5-7 에서와 같이 algin/PVA 혼합 겔 비드의 내부 구조가 다른 겔 비드들 구조와는 전혀 다른 것을 볼 수 있다 (그림 5-2 참조). Algin/PVA 혼합 겔 비드의 내부 구조가 channel-like open pore 구조를 하고 있는데 비해 다른 것들은 벌집 모양의 pore 구조를 이루고 있다. 왜 이와같은 구조적 차이가 생겼는지에 대해서는 분명하지 않지만 이와 같은 비드들의 내부 구조 차이가 비드내에 고정화된 세포들의 생존율과 증식성에 영향을 미칠 것으로 보고 있다. 또한 혼합 겔 비드를 제조하기 위해 사용한 기능성 관능기를 가진 고분자들의 화학적 구조를 고려할때, 앞의 제 3장에서도 논의되었듯이 -COOH 기 나 -NH₂ 기 보다는 -OH 기가 세포 친화성에 상당히 좋은 영향을 미치는 것으로 나타나고 있어, algin 과 세포 친화성 관능기인 -OH 기를 가진 PVA 로 혼합 겔 비드를 제조 했을때가 -COOH 기를 가진 PAA 나 -NH₂ 기를 가진 PAAM 으로 혼합 겔 비드를 제조했을때 보다 좀 더 세포 친화성 겔 비드가 되어 세포 생존율 과 증식성에 좋은 영향을 미친 것이 아닌가 하고 유추하고 있다.

Algin 과 PVA 의 혼합 겔 비드를 사용해 세포를 고밀도고생존율로 배양 하는 방법은 현재 특허 출원중에 있다 (25).

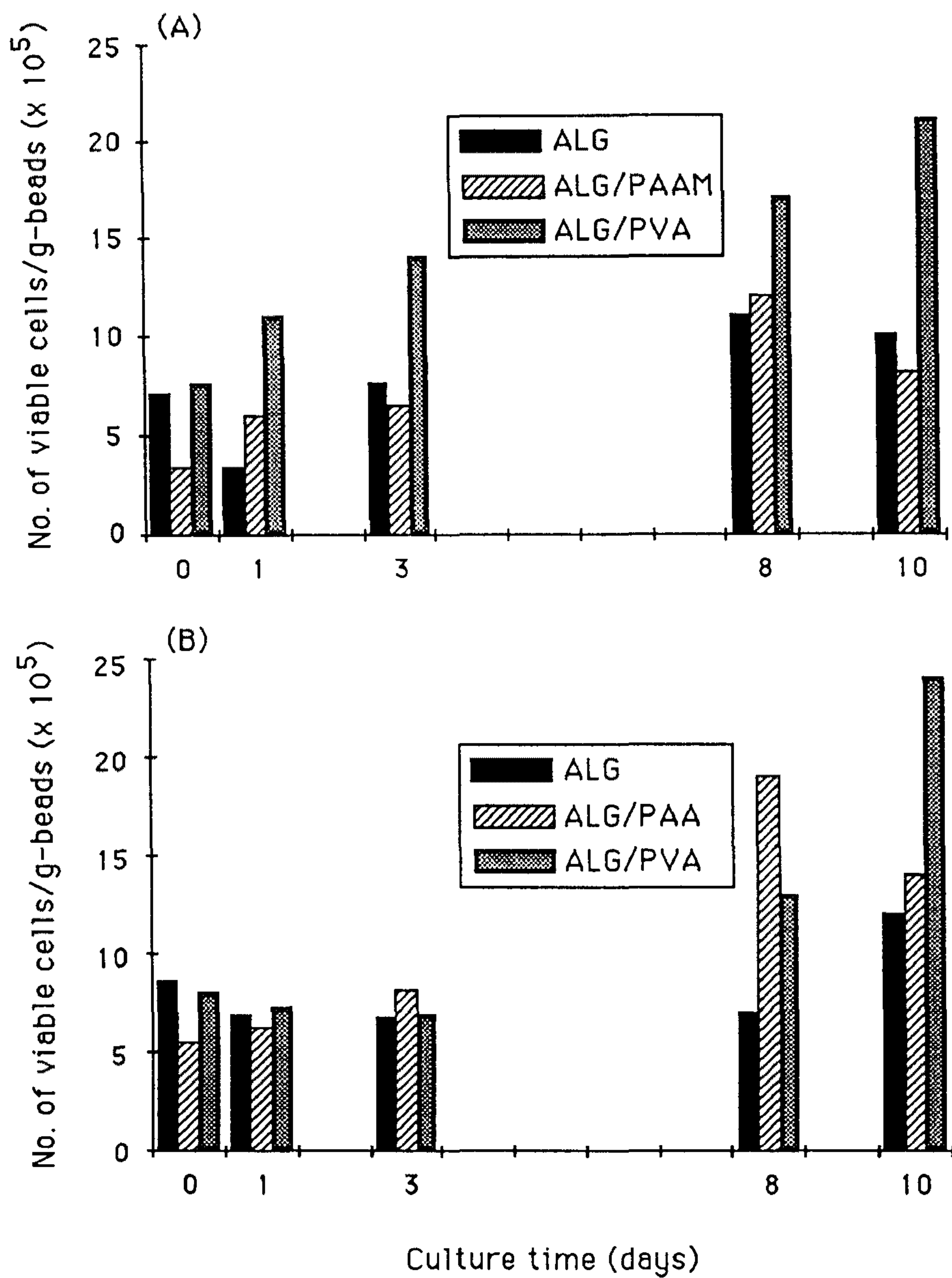


Figure 5-6. Viable cell densities for CHO and BHK cells in the gel beads of algin and algin/functional polymer mixture as a function of culture time, (A) CHO cells and (B) BHK cells

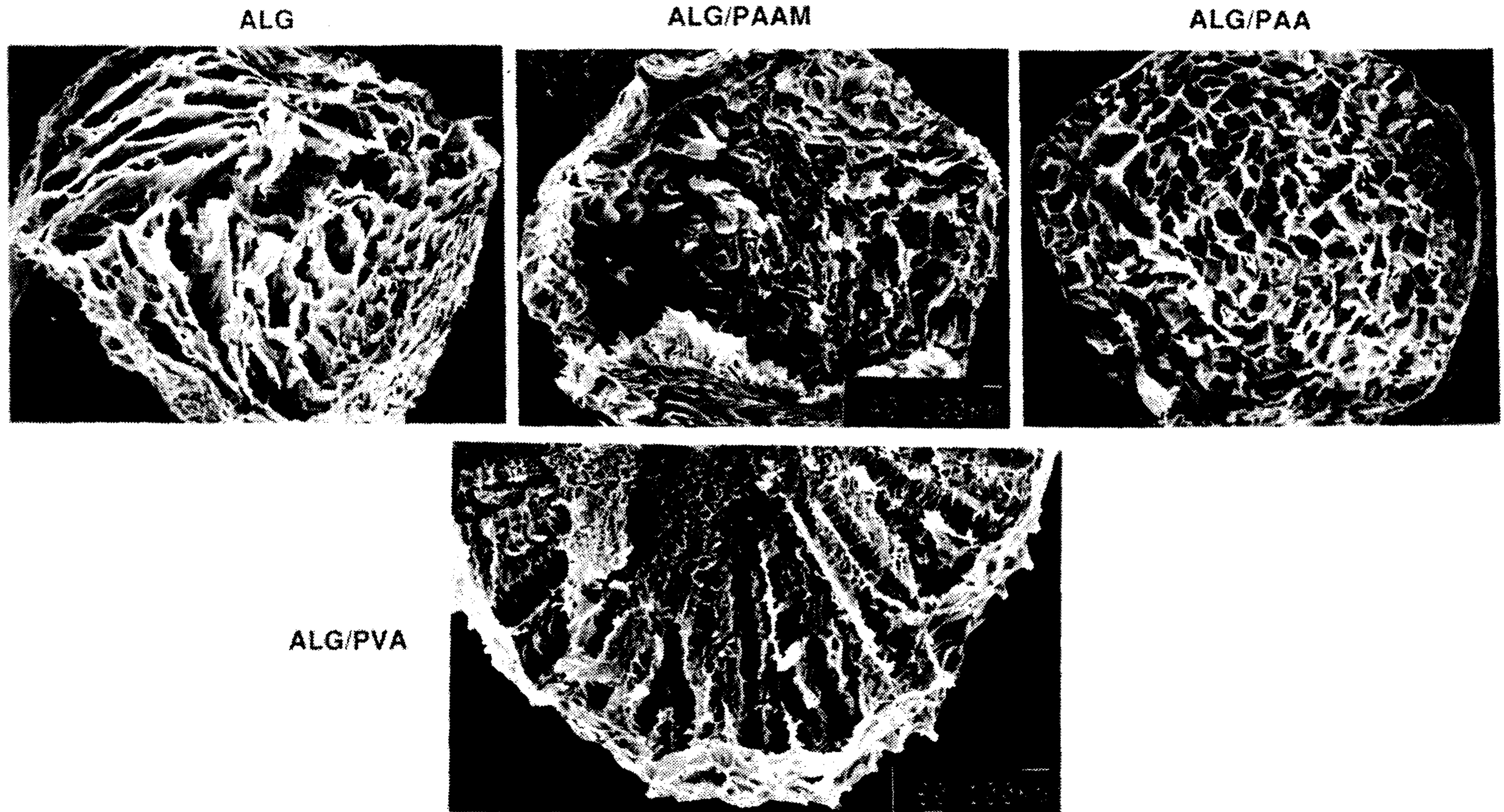


Figure 5-7. SEM pictures of the cross-sectioned gel beads of algin and algin/functional polymer mixture after freeze-drying (x 40 for top pictures and x 60 for bottom picture)

제 6 장 결 론

제 2장에서 제 4장까지는 의료용 재료로 사용되는 고분자들이 일반적으로 세포와의 친화성이 좋지 않기 때문에 고분자 재료의 세포 친화성을 향상시켜 주는 방안으로서 재료 표면의 친수성을 증가시켜 주는 방안 (제 2장), 재료 표면에 세포 부착을 촉진시켜 주는 단백질을 미리 도포해 주는 방안 (제 3장), 재료 표면에 세포가 잘 부착·성장할 수 있는 기능성 관능기를 도입시켜 주는 방안 (제 4장) 등 세가지 방법을 사용해 고분자 재료 표면을 개질하고 이에 따른 세포의 부착 및 증식 경향을 연구한 결과에 대해 논의 하였다. 이들 세포 친화성 향상을 위한 표면 개질 연구 결과를 요약해 보면 다음과 같다.

- i) 재료 표면을 corona 방전 처리하여 제조한 wettability gradient surface 에 세포를 배양했을때, 재료 표면의 물 접촉각이 50° 부근이 세포 부착 및 증식에 최적 조건인 것으로 나타났으며,
- ii) 세포 부착 촉진 단백질로 알려진 fibronectin 이 흡착된 표면의 세포 부착 및 증식성은 양호하나, 물 접촉각이 50° 정도가 되도록 친수화 처리된 표면 보다는 세포 친화성이 덜 향상되었고,
- iii) Water vapor plasma 처리에 의해 -OH 기가 도입된 표면의 세포 친화성, 즉 세포가 표면에 부착하고 spreading 되고 증식하는 정도가 상당히 양호한 것으로 나타났다.

제 5장에서는 세포를 고밀도로 배양하여 biotech 제품 생산에 응용하기 위한 시도로서 수용액내에서 쉽게 반투막 겔 비드를 형성할 수 있는 algin 을 matrix 로 하여 여기에 -OH 기, -COOH 기, -NH₂ 기를 가지는 고분자를 각각 혼합하여 동물세포가 내부에 고정화된 겔 비드들을 제조하고, 이들 각각 기능성 관능기들이 비드내에 고정화된 세포들의 성장에 미치는 영향을 연구하였다. 혼합 겔 비드들중에서는 algin 과 -OH 기를 가지는 polyvinylalcohol 로 제조된 혼합 겔 비드가 algin 겔 비드나 다른 혼합 겔 비드들 보다 세포의 생존율과 증식성에 있어서 우수한 것으로 판명되었다.

앞으로는 1차년도 연구 결과를 토대로 하여 세포 친화성 인공장기, 그중에서도 특히 인공혈관에 응용하는 연구를 계속 수행해 나갈 예정이며, 이밖에도 세포 배양 용기의 고품질화, 또는 algin 과 PVA 혼합 겔 비드내에 세포를 고밀도로 배양하여 세포가 자체적으로 합성분비해 내는 biotech 제품을 생산하기 위한 연구도 병행하여 수행할 계획으로 있다.

참 고 문 헌

1. H. Elwing, S. Welin, A. Askendal, U. Nilsson, and I. Lundstrom, J. Colloid Interface Sci., 119, 203 (1987)
2. H. Elwing, A. Askendal, and I. Lundstrom, Progr. Colloid Polymer Sci., 74, 103 (1987)
3. H. Elwing, A. Askendal, and I. Lundstrom, J. Biomed. Mat. Res., 21, 1023 (1987)
4. H. Elwing, B. Nilsson, K. E. Svensson, A. Askendal, U. R. Nilsson, and I. Lundstrom, J. Colloid Interface Sci., 125, 139 (1988)
5. H. Elwing, A. Askendal, and I. Lundstrom, J. Colloid Interface Sci., 128, 296 (1989)
6. S. W. Klintstrom, M. Wikstrom, A. Askendal, H. Elwing, I. Lundstrom, J. O. Karlsson, and S. Renvert, Colloids & Surfaces, 44, 51 (1990)
7. V. Hlady, C. Golander, and J. D. Andrade, Colloids & Surfaces, 33, 185 (1988)
8. C. G. Golander, Y. S. Lin, V. Hlady, and J. D. Andrade, Colloids & Surfaces, 49, 289 (1990)
9. C. G. Golander, K. Caldwell, and Y. S. Lin, Colloids & Surfaces, 42, 165 (1989)
10. H. B. Lee and J. D. Andrade, Trans. 3rd World Biomaterials Congr., p.43, Kyoto, Japan (1988)
11. H. B. Lee, in "Frontiers of Macromolecular Science", (T. Saegusa, T. Higashimura, and A. Abe, Eds.), p.579, Blackwell Scientific Publications, London (1989)
12. J. H. Lee, J. W. Park, G. S. Khang, and H. B. Lee, Korea-Japan Joint Conf. on MBE, p.77, Seoul (1989)
13. J. H. Lee, J. W. Park, and H. B. Lee, Polymer (Korea), 14, 646 (1990)
14. W. G. Pitt, J. Colloid Interface Sci., 133, 223 (1989)
15. C. G. Golander and W. G. Pitt, Biomaterials 11, 32 (1990)
16. H. B. Lee, G. S. Khang, and J. H. Lee, Korea Patent, Application No. 90-15981 (1990)
17. J. H. Lee, H. G. Kim, G. S. Khang, H. B. Lee, and M. S. Jhon, J. Colloid Interface Sci., submitted (1991)

18. J. H. Lee, G. S. Khang, K. H. Park, H. B. Lee, and J. D. Andrade, J. of KOSOMBE, 10, 195 (1989)
19. J. H. Lee, G. S. Khang, K. H. Park, and H. B. Lee, "A study on the development of blood compatible materials (III)", Research Report of KRICT, N88-0124, Korea Ministry of Science and Technology (1989)
20. J. H. Lee, G. S. Khang, K. H. Park, H. B. Lee, and J. D. Andrade, J. of KOSOMBE, 10, 43 (1989)
21. J. H. Lee, J. W. Park, and H. B. Lee, Biomaterials, in press (1991)
22. R. Rajaraman, D. E. Rounds, S. P. S. Yen, and A. Rembaum, Exp. Cell Research, 88, 327 (1974)
23. A. S. G. Curtis, J. V. Forrester, C. McInnes, and F. Lawrie, J. Cell Biol., 97, 1500 (1983)
24. F. Lim, U. S. Patent, 4,409,331 (1983)
25. H. B. Lee, J. H. Lee, and J. W. Park, Korea Patent, Application NO. 91-5802 (1991)
26. J. H. Lee, J. W. Park, and H. B. Lee, Polymer (Korea), in press (1991)