Journal of Radiation Industry 5 (4) : 371~376 (2011)

아크릴산이 그라프트된 나노섬유에서의 폴리도파민 코팅

신영민 · 김우진 · 박종석 · 권희정 · 노영창 · 임윤묵*

한국원자력연구원 첨단방사선연구소 공업환경연구부

Polydopamine Coating Behaviors on the Acrylic Acid Grafted-Nanofibers

Young Min Shin, Woo-Jin Kim, Jong-Seok Park, Hui-Jeong Gwon, Young-Chang Nho and Youn-Mook Lim*

Research Division for Industry & Environment, Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 580-185, Korea

Abstract - The surface property of the materials used in tissue engineering application has been essential to regulate cellular behaviors by directing their adhesion on the materials. To modulate surface property of the synthetic biodegradable materials, a variety of surface modification techniques have used to introduced surface functional groups or bioactive molecules, recently polydopamine coating method have been introduce as a facile modification method which can be coated on various materials such as polymers, metals, and ceramics regardless of their surface property. However, there are no reports about the degree of polydopamine coating on the materials with different hydrophilicity. In the present study, we prepared acrylic acid grafted nanofibrous meshes using electron-beam irradiation, and then coated meshes with polydopamine. Polydopamine successfully coated on the all meshes, both properties of acrylic acid and polydopamine were detected on the meshes. In addition, the degree of polydopamine deposition on the materials has been altered according to surface hydrophilicity, which was approximately 8-times greater than those on the non-modified materials. In conclusion, dual effect from the acrylic acid grafting and polydopamine may give a chance as a alternative tool in tissue engineering application.

Key words : Surface modification, Electron-beam irradiation, Polydopamine

서 론

최근 사고나 노령화로 인해 손상된 장기의 치료를 위해 조직공학 분야의 연구 개발이 활발하다. 특히, 조직공학의 핵심요소인 지지체를 개발하기 위해 다양한 종류의 의료용 고분자 소재가 사용되는데, 이들 소재는 조직 특이적인 기계적, 화학적 특성을 갖고 있음과 동시에 이식된 소재와 조직과의 원활한 융합을 관장할 수 있는 생물학적 기능성이 필수적이다(Shin *et al*. 2003). 인체에서 찾아볼 수 있는 천연고분자인 콜라젠, 히알루론산 등은 이미 다양한 형태로 제작되어 이식 소재로써 사용되고 있으나, 기계적 특성의 유연함이 적어 그 적용에 제한점이 있으며, 이를 해결하기 위한 대안으로 합성고분

* Corresponding author: Youn-Mook Lim, Tel. +82-63-570-3082, Fax. +82-63-570-3079, E-mail. ymlim71@kaeri.re.kr

자의 사용이 활발하게 전개되고 있다. 특히, 천연고분자와는 달리 기계적 강도의 조절이 손쉽고, 생분해성, 세포 반응성 등의 조절도 가능한 것으로 알려져 있어 그 유용성이 증가하고 있다(Naderi *et al*. 2011).

대표적인 생체적합성 합성고분자 소재로 poly(glycolide) (PGA), poly(lactide) (PLA) 그리고 이들의 공중합체인 poly(L-lactide-co-glycolide) (PLGA)가 활발하게 사용되고 있다(Ma *et al*. 2005; Park *et al*. 2005; Chong *et al*. 2007). 이들 소재는 앞서 언급한 바와 같이 우수한 기계적 특성을 갖고 있어 골조직, 심근조직, 피부 조직 재생용 소재로 사용되고 있으며, 줄기세포의 분화 조절 기술 개발에도 사용되고 있다(De Bartolo *et al*. 2007). 또한, 합성 몰비 및 분자량의 조절을 통해 인체 내에서 분해를 조절할 수 있어, 원활한 조직의 재생 후에 완전히 제거될 가능성이 높다. 하지만, 일부 생분해성 합성 고분자 소재는 높은 표면 소수성으로 인해 세포의 흡착 등에 다소 제한적인 문제를 낳고 있으며, 실제로 전기방사로 제작된 PLGA 나노섬유 메쉬는 섬유아세포(NIH3T3)의 흡착 및 증식을 제한하였고, 장기간의 생존을 관장하지 못하는 결과를 보여주었다(Kim *et al*. 2006).

합성고분자 소재의 세포 반응성을 높여주기 위해 다양한 표면 개질 기술이 사용되는데 산 또는 염기 처리를 통한 표면 분해, 플라스마, 감마선 조사를 통한 친수성 고분자 물질의 그라프팅 기술이 대표적이다. 한국과학기술연구원의 한동근 박사팀은 PLLA 필름과 지지체에 플라스마 처리를 통해 아크릴산을 그라프트 한 후 생체활성 펩타이드인 Arg-Gly-Asp (RGD) 펩타이드를 화학적으로 고정화하여 세포의 흡착 및 증식을 높여준 결과를 보고하였으며(Yang *et al*. 2008), Grondahl 또한 PHBV 필름에 감마선을 이용하여 아크릴산을 그라프트함으로서 소수성 고분자의 표면 특성을 개질하였다(Grondahl *et al*. 2005). 본 연구팀 역시 탄성을 갖고 있어 근육이나 혈관 조직 재생용 소재로 각광을 받고 있는 PLCL 소재를 감마선 조사 기술을 이용하여 친수성을 높여줌과 동시에 천연고분자인 젤라틴을 화학 결합함으로서 성체줄기세포의 흡착 및 증식, 분화를 조절할 수 있는 결과를 보여주었다(Shin *et al*. 2008).

최근 새로운 표면 개질 기술로써 폴리도파민 도포에 관한 연구가 보고되었는데, 이는 홍합 접착단백질의 흡착 특성에 기반한 소재로 해당 단백질에서 DOPA와 lysine의 반복구조에 기반한다고 보고되었으며, 구조적으로 유사한 형태를 갖는 도파민이 자가중합될 경우 이러한 특성의 모사가 가능한 것으로 보고되었다. 따라서, 다양한 소재에 폴리도파민의 도포 및 세포의 반응을 조절하는 결과가 보고되고 있는데, 금속, 세라믹, 고분자 등 다양한 소재에 도포가 가능하며, 도포 이후 생체활성물질의 추가적인 도입이 가능해 그 중요성이 부가되고 있다(Lee *et al*. 2007). 하지만, 폴리도파민의 도포 경향에 관한 보고는 일부만 보고되어 있으며(Tao *et al*. 2009; Zhu *et al*. 2009), 소재의 표면 특성에 따른 도포 경향에 관한 연구는 부족한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 앞서 언급한 PLCL 소재를 기반으로 나노섬유를 제작한 후 전자선 조사를 이용한 아크릴산을 그라프트하였다. 이에 다시 폴리도파민을 도포함으로서 동일 소재의 친수성 변화에 따른 폴리도파민의 도포 경향 변화를 확인하였다.

재료 및 방법

1. 재료

L-lactide (LA)는 Purac Biochem (Gorinchem, Netherlands)에서 구매하였으며, ε-caprolactone (CL), 옥토산 주석, 아크릴산, 도파민 하이드로클로라이드는 시그마 알드리치(St. Louis, MO)에서 구매하였다. 그 외 실험에 사용된 모든 시약은 추가적인 정제과정 없이 사용되었다.

2. PLCL 합성

PLCL은 개환중합을 통해 합성하였다(Jeong *et al*. 2004). 유리 앰플에 50 : 50의 비율로 LA와 CL을 혼합한 후 옥토산 주석을 첨가하여 150°C에서 24시간 동안 교반하였다. 반응 후 합성된 PLCL은 클로로포름에 용해한 후 메탄올을 이용하여 분리 정제하고, 진공 오븐으로 50°C에서 72시간 동안 건조하여 최종산물을 획득하였다.

3. 전기방사를 이용한 나노섬유 매쉬 제작 및 전자선을 이용한 아크릴산 그라프트

합성된 PLCL을 디클로로메탄과 트리플루오로에탄올 혼합용액(80 : 20, v/v)에 용해한 후 23G 금속니들을 장착한 실린지에 충진하여 전기방사하였다(Shin *et al*. 2010). 고분자 용액의 분출속도는 1 ml h^{-1}이었으며, 18 kV의 전압에서 10시간 동안 방사하였고, 전기방사된 PLCL 매쉬는 50°C에서 하루 동안 완전히 건조하였다. 아크릴산의 그라프트를 위해 PLCL 매쉬는 5 wt% 아크릴산 수용액에 담지한 후 1 mA, 10 MeV에서 전사선을 조사(10 kGy)하였으며, 조사완료 후 이차증류수를 이용하여 반복 세척함으로서 미반응된 단량체를 제거하였다.

4. 폴리도파민 코팅

아크릴산이 그라프트된 PLCL 매쉬는 2 mg ml^{-1} 농도의 도파민 수용액(Tris-HCl, pH 8.5) 에 담지한 후 60분간 교반하였으며(Shin *et al*. 2011), 반응 후 이차증류수로 반복 세척한 후 상온에서 완전 건조하여 최종 시료를 획득하였다.

5. 전자현미경 (Scanning electron microscopy)

폴리도파민이 도포된 나노섬유 매쉬의 형태 변화를 관찰하기 위해 전자현미경(JSM-6390, JEOL, Japan)으로 관찰하였다. 시료는 약 5×5 mm 크기로 고정했으며, 10분간 백금코팅한 후, 10 kV에서 시료의 표면을 관찰하였다.

6. 적외선 분광 분석 (ATR-FTIR)

폴리도파민이 도포된 매쉬의 표면 특성은 적외선 분광기(Tensor 37, Bruker optics, MA, USA)를 이용해 분석하였다. 시료의 크기는 직경 10 mm였으며, 분광기의 해상도는 8 cm^{-1}이었고, 4000～600 cm^{-1} 범위에서 24번 스캔하여 스펙트럼을 얻었다.

7. 도포된 폴리도파민의 정량 분석

매쉬에 도포된 폴리도파민의 정량 분석을 위해 단백질 분석에 사용되는 micro bca assay를 변형하여 실시하였다(Shin *et al*. 2011). 직경 10 mm의 시료를 micro bca 반응용액에 담지한 후 2시간 동안 37°C 배양기에서 발색하였다. 발색된 시약은 562 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준 정량 곡선을 제작을 위해 도파민 수용액을 1.6～160 μg ml^{-1} 농도로 제작하여 흡광도를 동일하게 측정하였다.

결과 및 논의

최근 소개된 폴리도파민 도포 기술은 이전의 기술에 비해 쉽고 빠르게 표면 개질이 가능한 장점을 가지고 있다. 도포되는 소재의 특성에 상관없이 도포되는 것으로 보고되고 있으며, 도포 시간 또한 최소 5분에서 최대 48시간으로 다양하다. 예전에 우리는 본 연구에 사용된 PLCL 소재의 필름을 제작하여 폴리도파민을 다양한 시간 동안 도포한 후 표면의 특성 변화 및 세포의 흡착과 증식을 평가하였으며, 폴리도파민 도포가 세포의 생존을 조절할 수 있다는 것을 보고하였다(Shin *et al*. 2011). 하지만, 폴리도파민의 표면 도포 여부에 대해서만 평가되었을 뿐 표면 특성에 따른 폴리도파민의 도포의 정량 분석은 보고된 적이 없다.

그래서 본 연구에서 우리는 소수성 소재인 PLCL을 이용하여 나노섬유 매쉬를 제작한 후 전자선을 이용하여 아크릴산을 그라프트하고, 다시 폴리도파민을 도포하여 표면 아크릴산에 의해 친수성이 증대된 소재에서 폴리도파민의 도포 여부를 확인하였다(Fig. 1). 폴리도파민

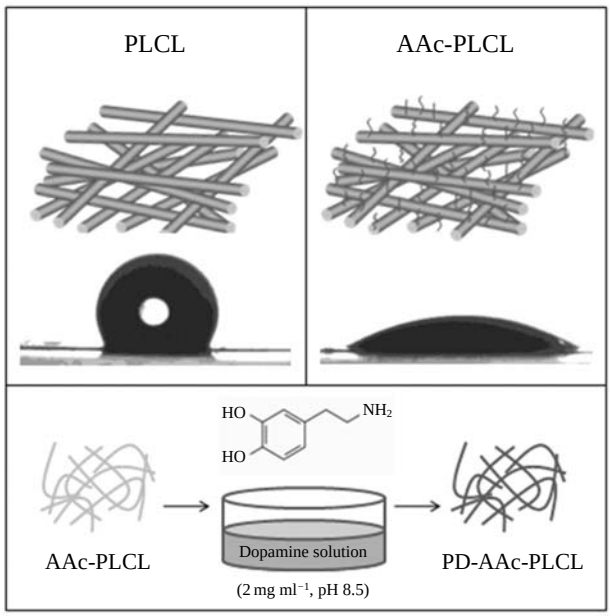

Fig. 1. Water contact angle of PLCL and AAc-PLCL fibrous meshes and schematic diagram of polydopamine coating.

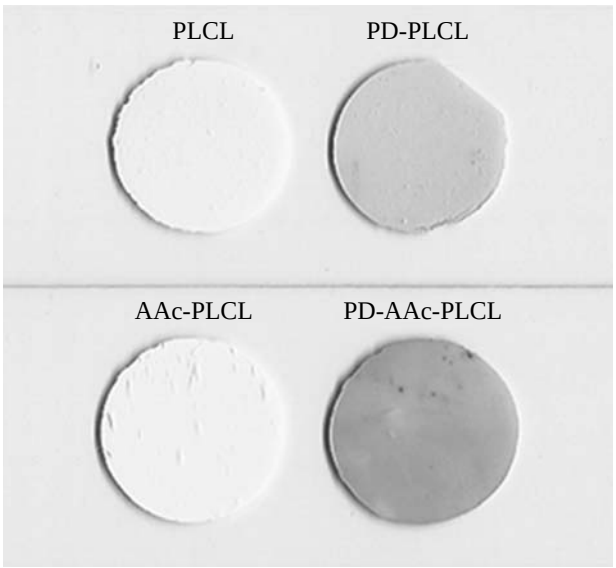

Fig. 2. Alteration of the meshes color after polydopamine coating.

도포 후 폴리도파민의 도포 여부는 육안으로 쉽게 식별이 가능하다. 이해신 교수는 폴리도파민 도포 후에 소재의 색깔이 갈색 또는 짙은 갈색으로 변하는 것을 보고하였으며 (Lee *et al*. 2007), 유사한 결과로 Fig. 2에서 보는 바와 같이 PLCL 매쉬 (PLCL)는 흰색으로 본연의 색을 보여주고 있으나, 폴리도파민이 도포된 PLCL (PD-PLCL) 매쉬는 갈색을 띠고 있었다. 또한, 이는 도포 시간의 경과에 따라 더 엷게 또는 더 진하게 관찰되었다. 아크릴산이 도입된 PLCL (AAc-PLCL) 매쉬 또한 PLCL 매쉬와 마찬가지로 흰색이나 여기에 다시 폴리도파민을 도입한 경우 (PD-AAc-PLCL) 아크릴산 없이 폴리도파민이 도입된 매쉬와는 다르게 약간 푸른 빛을 띄고 있으나 폴리도파민의 도포 여부는 쉽게 판단할 수 있었다.

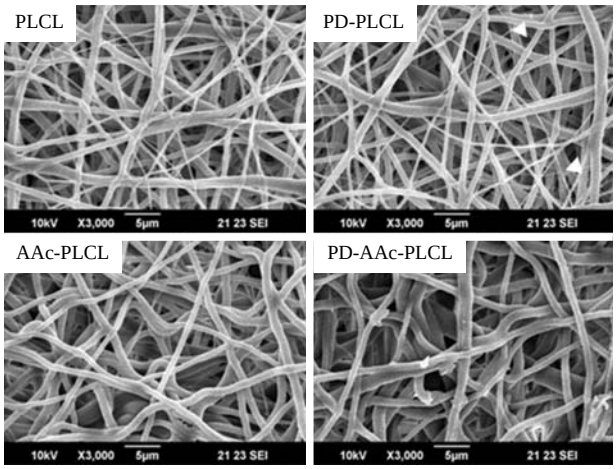

Fig. 3. SEM of polydopamine-coated nanofibrous meshes.

나노섬유 매쉬 구조에 대한 폴리도파민 도포의 영향을 확인하기 위해 전자현미경을 통해 매쉬를 구조를 관찰하였다. 일반적으로 판형의 필름에서 폴리도파민은 도포 시간 경과에 따라서 두꺼운 폴리도파민 층을 형성한다고 보고되고 있지만 수십나노미터 수준으로 알려져 있으며 (Jiang *et al*. 2010), 나노섬유형 매쉬의 경우 각각의 나노섬유의 표면에 얇은 형태로 도포되거나 작은 크기의 입자형태가 일부 관찰되는 것으로 알려져 있다. PLCL 매쉬는 일반적인 나노섬유형태로 수백나노에서 수 마이크로미터 크기의 나노섬유가 불규칙한 형태로 배열되고 있으며, PD-PLCL의 경우 다수의 폴리도파민 입자를 확인할 수 없지만 일부 섬유에서 폴리도파민으로 추정되는 입자를 확인할 수 있었다. AAc-PLCL 매쉬는 PLCL 매쉬에 비해 상대적으로 섬유의 직경이 약간 증가한 것으로 관찰되었으나 구조적인 차이나 다공도의 차이는 관찰할 수 없었으며, PD-PLCL의 경우에도 아무런 차이를 관찰할 수 없이 유사한 형태를 보여주었다. PD-AAc-PLCL 매쉬에서는 PD-PLCL 매쉬에서 일부 관찰된 폴리도파민 입자 역시 관찰되지 않았으나, 이는 폴리도파민이 얇은 판 형태로 도포되었을 것으로 추정된다 (Fig. 3).

전자현미경 상에서 큰 차이를 관찰할 수 없었기 때문에 적외선 분광분석을 통해 폴리도파민이 도포된 후 표면의 특성변화를 관찰하였다. Fig. 4a에서 보는 바와 같이 wide 스펙트럼에서 PLCL 매쉬는 1740 cm^{-1}에서 ester bond의 carbonyl group이 두드러지게 관찰되었고, PD-PLCL 매쉬도 유사한 형태를 보여주었지만, 1540 cm^{-1}과 1580 cm^{-1}에서 각각 aromatic ring과 quinone의 신호가

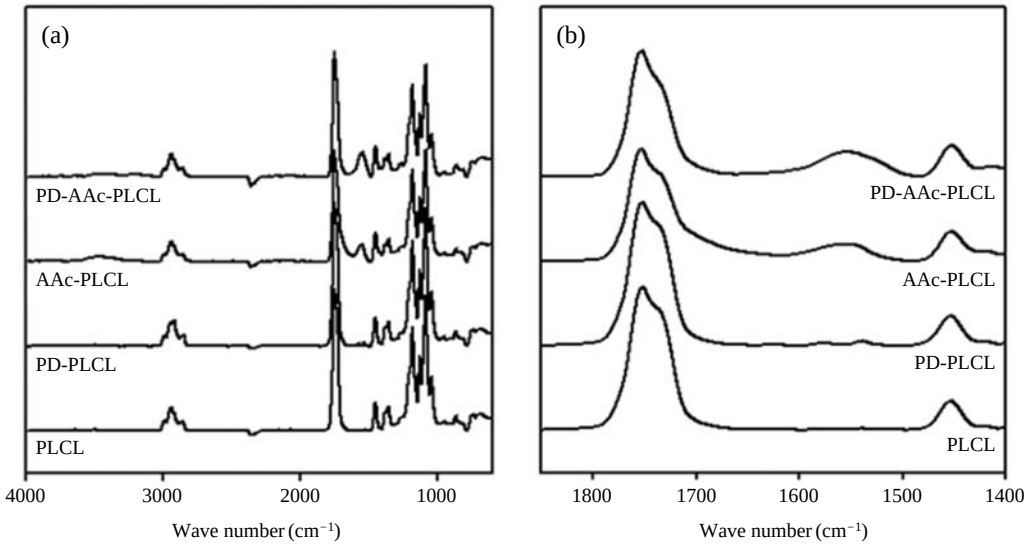

Fig. 4. ATR-FTIR. (a) wide spectrum of polydopamine-coated nanofibrous meshes, and (b) narrow spectrum of the meshes (1900 ~ 1400 cm^{-1}).

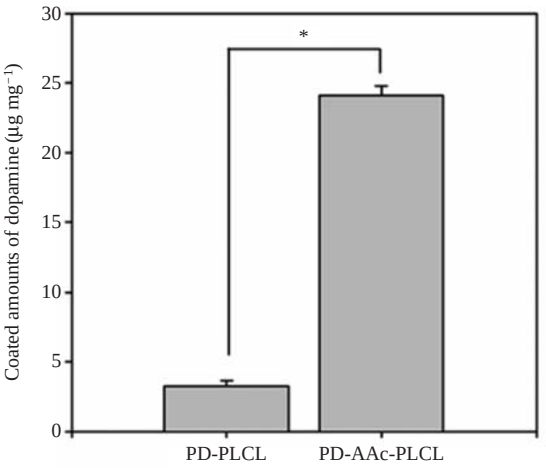

Fig. 5. Quantification of coated amounts of dopamine on the nanofibrous meshes (*: $p < 0.05$).

미약하게 관찰되었다(Fig. 4b). 하지만, AAc-PLCL 매쉬에서는 3400 cm^{-1}에서 hydroxyl group이 관찰되었으며, 1700 cm^{-1}에서의 아크릴산의 carboxyl group이 carbonyl group과 합쳐져서 넓은 형태로 관찰되었다. PD-AAc-PLCL 매쉬에서는 앞서 언급한 AAc-PLCL 매쉬에서의 특성이 모두 관찰되었으나 폴리도파민 도포에서 관찰되었던 aromatic ring과 quinone의 신호는 아크릴산의 신호와의 중첩으로 관찰되지 않았다. 하지만, 3300 cm^{-1}에서 amine 신호가 관찰됨에 따라 폴리도파민의 도입 여부를 다시 확인할 수 있었다. 폴리도파민의 도입 전 후 ATR-FTIR 분석을 통한 표면 특성 분석에 대한 연구 보고는 많지 않으며 일부만 보고되고 있다. 우리 연구에서도 역시 일부의 폴리도파민의 peak을 확인할 수 있었으며, 매쉬에 색깔 변화와 연관 지을 수 있었다.

실제로 아크릴산에 의해 표면 친수성이 변화한 매쉬에 폴리도파민의 도입량 변화를 확인하기 위해 micro bca assay를 변형하여 실시하였다. 우리가 이전에 보고한 것처럼, micro bca 반응용액은 카테콜아민 그룹과 반응하여 발색하는 특성을 가지고 있어 표면에 도입된 폴리도파민을 정량할 수 있었다. 예상과 같이 PLCL과 AAc-PLCL 매쉬는 micro bca 반응에서 거의 발색을 보여주지 않아 카테콜아민 또는 아민 그리고 단백질 등이 없는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 PD-PLCL 매쉬에서는 약 3.2±0.4 μg mg^{-1}의 도파민이 정량되었으며, PD-AAc-PLCL 매쉬에서는 반응용액을 넣자마자 반응이 시작되어 약 24.1±0.6 μg mg^{-1}의 도파민이 정량되어 약 8배 높은 수준으로 폴리도파민이 도입되는 것으로 확인되었다(Fig. 5). 이전에 상대적으로 친수성 표면 특성을 갖는 glass에서는 폴리도파민의 도입 후 물 접촉각이 높이지는 결과가 보고되었고, 높은 소수성을 갖는 PLCL 또는 PLLA 소재는 물 접촉각이 낮아지는 경향을 보여주었다. 하지만, 이들 보고는 폴리도파민의 도입량과 무관하게 동일 시간동안 폴리도파민을 도포 했을 때 도포 유무에 따른 변화였다(Ku *et al*. 2010). 하지만, 본 연구에서 우리는 아크릴산을 도입하여 친수성을 높여주었을 경우 동일 소재에서 폴리도파민의 도포 경향이 변화하는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 기존 보고와 함께 폴리도파민 도포에 관한 새로운 영향을 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

본 연구에서는 최근 새로운 표면 개질 기술로서 주목을 받고 있는 폴리도파민을 이용하여 소재의 표면 친수성 변화에 따른 폴리도파민의 도포 영향을 분석하였다. 폴리도파민은 고분자, 금속, 세라믹 등 다양한 소재에 도포가 가능한 것으로 알려져 있으나 친수성 또는 소수성 표면 특성에 따른 폴리도파민의 도포의 정량적 분석은 보고된 적이 없다. 전자선을 이용한 PLCL 매쉬에 아크릴산을 도입한 후 폴리도파민을 도포했을 경우 아크릴산이 도입되지 않은 매쉬에 비해 높은 수준의 폴리도파민이 도입되는 것을 확인하였으며, 더 나아가서는 아크릴산과 폴리도파민이 동시에 도포된 소재의 세포 반응성 조절에 관한 연구를 진행할 수 있을 것으로 기대된다.

사 사

이 논문은 교육과학기술부의 재원으로 시행하는 한국과학재단의 원자력기술개발사업으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

Chong MSK, Lee CN and Teoh SH. 2007. Characterization of smooth muscle cells on poly([epsilon]-caprolactone) films. *Mat. Sci. Eng. C* **27**(2):309-312.

De Bartolo L, Morelli S, Piscioneri A, Lopez LC, Favia P, d'Agostino R and Drioli E. 2007. Novel membranes and surface modification able to activate specific cellular responses. *Biomol. Eng.* **24**(1):23-26.

Grondahl L, Chandler-Temple A and Trau M. 2005. Polymeric grafting of acrylic acid onto poly(3-hydroxybutyrate-co-3-

hydroxyvalerate): surface functionalization for tissue engineering applications. *Biomacromolecules* **6**(4):2197-2203.

Jeong SI, Kim SH, KimYH, Jung Y, Kwon JH, Kim BS and Lee YM. 2004. Manufacture of elastic biodegradable PLCL scaffolds for mechano-active vascular tissue engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **15**(5):645-660.

Jiang JH, Zhu LP, Li XL, Xu YY and Zhu BK. 2010. Surface modification of PE porous membranes based on the strong adhesion of polydopamine and covalent immobilization of heparin. *J. Membrane. Sci.* **364**(1-2):194-202.

Kim TG and Park TG. 2006. Biomimicking extracellular matrix: cell adhesive RGD peptide modified electrospun poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanofiber mesh. *Tissue. Eng.* **12**(2): 221-233.

Ku SH, Ryu J, Hong SK, Lee H and Park CB. 2010. General functionalization route for cell adhesion on non-wetting surfaces. *Biomaterials* **31**(9):2535-2541.

Lee H, Dellatore SM, Miller WM and Messersmith PB. 2007. Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings. *Science* **318**(5849):426-430.

Ma Z, Gao C, Gong Y and Shen J. 2005. Cartilage tissue engineering PLLA scaffold with surface immobilized collagen and basic fibroblast growth factor. *Biomaterials* **26**(11): 1253-1259.

Naderi H, Matin MM and Bahrami AR. 2011. Review paper: Critical Issues in Tissue Engineering: Biomaterials, Cell Sources, Angiogenesis, and Drug Delivery Systems. *J. Biomater. Appl.* **26**(4):383-417.

Park GE, Pattison MA, Park K and Webster TJ. 2005. Accelerated chondrocyte functions on NaOH-treated PLGA scaffolds. *Biomaterials* **26**(16):3075-3082.

Shin H, Jo S and Mikos AG. 2003. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials* **24**(24):4353-4364.

Shin YM, Kim KS, Lim YM, Nho YC and Shin H. 2008. Modulation of spreading, proliferation, and differentiation of human mesenchymal stem cells on gelatin-immobilized poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) substrates. *Biomacromolecules* **9**(7):1772-1781.

Shin YM, Lee YB and Shin H. 2011. Time-dependent mussel-inspired functionalization of poly(L-lactide-co-[epsilon]-caprolactone) substrates for tunable cell behaviors. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **87**(1):79-87.

Shin YM, Lim YM and Shin H. 2010. Surface modification of electrospun poly(L-lactide-epsilon-caprolactone) fibrous meshes with a RGD peptide for the control of adhesion, proliferation and differentiation of the preosteoblastic cells. *Macromol. Res.* **18**(5):472-481.

Tao C, Yang S, Zhang J and Wang J. 2009. Surface modification of diamond-like carbon films with protein via polydopamine inspired coatings. *Appl. Surf. Sci.* **256**(1):294-297.

Yang HS, Park K, Kim JJ, Kim BS and Han DK. 2008. Effect of bioreactor system on chondrocyte proliferation using cell adhesive PLLA-PAA-RGD scaffolds. *Tissue Eng. Regen. Med.* **5**(3):498-505.

Zhu LP, Yu JZ, Xu YY, Xi ZY and Zhu BK. 2009. Surface modification of PVDF porous membranes via poly(DOPA) coating and heparin immobilization. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **69**(1):152-155.

Manuscript Received: November 14, 2011
Revised: November 30, 2011
Revision Accepted: December 9, 2011