



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0001726
(43) 공개일자 2019년01월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/00 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12M 23/02 (2013.01)
C12N 5/0068 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0081717
(22) 출원일자 2017년06월28일
심사청구일자 2018년06월15일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
최호석
대전광역시 유성구 배울1로 147, 203동 403호 (용
산동, 대덕테크노밸리푸르지오하임2단지아파트)
부반티엔
대전광역시 유성구 대학로141번길 6, 204호 (궁동)
(74) 대리인
김원준

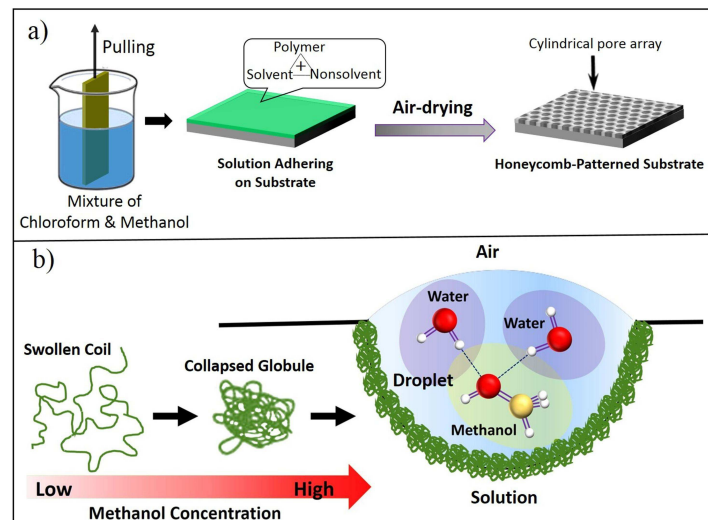
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 세포배양용 용기의 제조방법 및 이를 이용한 세포배양 방법

(57) 요약

본 발명은 세포 부착성과 증식효능이 우수하고, 간단한 방법에 의해 주문형 대량생산이 가능한 세포배양용 용기의 제조방법 및 이를 이용한 세포배양 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 폴리스티렌 재질의 용기를 80:20~98:2 부피비의 클로로포름-메탄올 혼합용액에 침지한 후 건조하여 표면에 실린더 형상의 기공으로 이루어진 허니컴 패턴을 형성시키는 것을 특징으로 하는 세포배양용 용기의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 2513/00 (2013.01)

C12N 2533/30 (2013.01)

C12N 2535/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

폴리스티렌 재질의 용기를 80:20~98:2 부피비의 클로로포름-메탄을 혼합용액에 침지한 후 건조하여 표면에 실린더 형상의 기공으로 이루어진 허니컴 패턴을 형성시키는 것을 특징으로 하는 세포배양용 용기의 제조방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

건조 후 UV를 조사하는 과정을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 세포배양용 용기의 제조방법.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 침지시간은 10초~10분인 것을 특징으로 하는 세포배양용 용기의 제조방법.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 클로로포름과 메탄올의 혼합비에 의해 실린더 형상 기공의 직경을 제어하는 것을 특징으로 하는 세포배양용 용기의 제조방법.

청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 침지시간에 의해 실린더 형상 기공의 중형비를 제어하는 것을 특징으로 하는 세포배양용 용기의 제조방법.

청구항 6

(A) 폴리스티렌 재질의 배양용기를 80:20~98:2 부피비의 클로로포름-메탄을 혼합용액에 침지하는 단계;

(B) 상기 배양용기를 혼합용액으로부터 꺼내어 건조하는 단계; 및

(C) 건조된 배양용기에 세포를 분주하여 배양하는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 배양 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 (B) 단계와 (C) 단계 사이에,

배양용기에 UV를 조사하는 단계;

를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 배양 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포 부착성과 증식효능이 우수하고, 간단한 방법에 의해 주문형 대량생산이 가능한 세포배양용 용기의 제조방법 및 이를 이용한 세포배양 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 세포배양용 용기는 조직 배양, 유전자 검사, 줄기세포 치료 및 시험관 내 약물 검사와 같은 생물학적 과정에서 중요한 세포배양에 사용되는 필수적인 장비이다. 의약품 개발 시 동물실험의 전단계로서 또는 동물실험의 대체법으로서 약물 후보 물질의 스크리닝이나 독성실험에 세포배양을 활용한 in-vitro 실험이 활발하게 진행되고 있다. 그러나 상업용 배양용기(페트리디쉬)에서는 임상반응의 예측과 줄기세포를 포함하는 세포의 분화 유도 등이 한계가 있는 경우가 많은데, 가장 큰 이유로 표면이 평평한 배양용기의 환경이 생체 내에서의 유사한 실제 3D 환경을 제공하지 못하는 것이 제시되고 있다. 세포는 생체 내에서는 주로 3차원적 집단으로 존재하지만, 평면 배양에서는 세포가 용기에 달라붙는 단층형으로 배양되며, 배양 환경의 차이에 따라 세포의 성질 또한 크게 달라진다는 것이 보고되어 있다. 최근에는 고분자 지지체(scaffold)로부터 뼈나 연골 조직을 배양하는 것도 많은 주목을 받고 있다. 이상적인 지지체의 조건은 영양분의 공급이나 대체 산물의 이동이 효율적으로 이루어질 수 있도록 상호 연결된 다공성의 3차원 구조를 갖는 것이며, 허니컴 기공 구조를 그 이상적인 예로 들 수 있다.

[0003] 이에, 보다 생체에 가까운 기능을 발휘하는 3차원 구조를 갖는 배양용기를 제공하기 위한 시도들이 있어 왔다. 등록특허 10-1407605호는 사출성형이나, 핫엠보싱 공정에 의해 제조된 나노크기의 돌기(나노필러)가 규칙적으로 배열되어 있는 배양용기를, 등록특허 10-1522120호는 나노필러가 형성된 배양시트를 제시하였다. SCOVAX사가 개발한 NanoCulture Plate(NCP)는 나노임프린트 기술을 이용하여 마이크로 스케어 또는 마이크로 허니컴 형상의 패턴을 갖는 집착형의 세포 배양플레이트이다. 그러나 이들은 모두 나노몰드를 사용한 인쇄방식으로 나노 패턴을 형성하며, 이는 특수 장비를 사용하여야 하므로 배양용기가 고가일 수밖에 없다. 따라서 특별한 장비를 사용하지 않더라도 상용화된 페트리디쉬와 같은 배양용기를 세포배양에 적합하도록 손쉽게 가공하는 것에 의해 제조할 수 있는 세포배양용 배양용기의 제조방법과, 이를 이용한 세포배양 방법이 필요하다.

[0004] 지난 수십년 동안, 표면 형상의 제어는 재료 과학 및 표면 화학에서 중요한 문제가 되었다. 특히, 조절 가능한 기공 배열을 갖는 3차원 허니컴 패턴의 기관은 생체 내 세포 환경을 제공할 수 있기 때문에 생화학에서 중요한 관심을 끌어들였다. 허니컴 구조의 다공성 필름은 리소그래피, 상분리, 에멀전, 콜로이드 결정 및 BF(breath figure)법과 같은 여러 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 본 발명자들은 용매-비용매 혼합물 처리에 의해 간단한 방법으로 고분자 박막에 허니컴 구조의 패턴을 형성할 수 있음을 등록특허 10-1720665호에서 보고한 바 있다. 그러나 상기 방법 및 상분리법이나 BF법은 기관과 고분자 박막, 용매, 비용매 또는 용매-비용매의 건조 과정에서 응축되는 대기 중의 물의 상호작용에 의해 패턴이 형성되기 때문에 미세 다공성 구조의 필름을 제조하는 데에 제한적으로 사용할 수 있으며, 허니컴 패턴을 박막이 아닌 기관 상에 직접 제조하는 것은 해결되지 않은 중요한 과제로 남아있다.

[0005] 본 발명자들이 출원한 특허인 공개특허 10-2010-0082665호 역시, 용매-비용매의 처리에 의해 기재 표면의 소수성이 향상되는 것은 확인할 수 있었으나 특정 구조의 패턴이 아닌 비규칙적 표면 구조가 형성되는 것을 보여주었다. 최근, Farbod 등은 폴리머 기재에 허니컴 구조를 생성하기 위한 DBF(Direct BF) 방법을 보고하였으나, 기공 크기를 제어하기 어렵고 구조적 균일성이 낮았다. Shen 등은 기재 상에 형성된 벌집 구조의 품질을 향상시키기 위해 DBF와 통상의 BF법을 조합한 semi-direct breath figure(sDBF) 방법을 개발하였다. 그러나 이 방법은 양산에 부적합한 드롭 캐스팅 방법을 사용하며, 습도에 매우 민감하여 약 75%의 높은 습도 범위에서만 허니컴 구조가 달성되어 그 응용에 한계가 있다. 또한 상기 BF 방법을 기반으로 한 구조에서는 반구형의 기공이 형성되며, 계면활성제를 사용하고 고가의 블록공중합체를 기재로 하는 경우에만 실린더 형상의 기공모양이 형성될 수 있었다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 등록특허 10-1407605호
(특허문헌 0002) 등록특허 10-1522120호
(특허문헌 0003) 등록특허 10-1720665호
(특허문헌 0004) 공개특허 10-2010-0082665호

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) Farbod, F 등, Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics 2013, 51 (6), 441-451.
(비특허문헌 0002) Shen, X 등, ACS Applied Materials & Interfaces 2014, 6 (8), 5971-5976.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 상기와 같은 종래기술의 문제점을 해소하기 위하여, 상용 배양용기를 사용하여 단일 공정에 의해 간단하게 경제적으로 세포 부착력과 증식 효능이 우수한 세포배양용 용기를 제조하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0009] 또한 본 발명은 고가의 배양용기를 별도로 구입하지 않더라도 간단한 사전 처리에 의해 세포 부착력과 증식력을 향상시킬 수 있는 세포 배양 방법을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 진술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 폴리스티렌 재질의 용기를 80:20-98:2 부피비의 클로로포름-메탄올 혼합용액에 침지한 후 건조하여 표면에 실린더 형상의 기공으로 이루어진 허니컴 패턴을 형성시키는 것을 특징으로 하는 세포배양용 용기의 제조방법에 관한 것이다.
- [0011] 상기 방법에 의해 형성된 허니컴 패턴은 추가적으로 UV를 조사하는 것에 의해 화학적인 안정성을 얻을 수 있다. 하기 실시예에서 확인할 수 있듯이, UV 처리 전에는 용매 어닐링(solvent annealing)에 의해 허니컴 패턴이 소실되었으나, UV를 처리하면 용매 어닐링 후에도 허니컴 패턴이 그대로 유지되었다. 이는 UV처리에 의해 폴리스티렌 수지 내에 잔존하는 이중결합이 라디칼 반응에 의해 가교결합하기 때문으로, UV 처리 시간은 광량에 따라 적절하게 조절할 수 있을 것이다.
- [0012] 본 발명에서 상기 "용기"란 추후 배양이 이루어질 기재의 의미로 그 형상에 의해 한정되는 것은 아니며, 통상의 페트리디쉬나 웰-플레이트, 시험관 뿐 아니라 시트 형상의 것도 포함한다. 또한 "용기" 그 자체에 세포를 분주하여 배양시킬 수도 있으며, 본 발명의 방법에 의해 제조된 용기를 또 다른 용기 내에 넣어 사용할 수도 있다. 특히 본 발명의 방법은 시험관과 같은 곡률을 가진 용기에 대해서도 균일한 허니컴 패턴을 형성할 수 있으므로, 본 발명의 방법은 용기의 형상에는 제한되지 않는다.
- [0013] 도 1은 본 발명의 세포배양용 용기의 제조방법과 그 원리를 보여주는 모식도이다. 본 발명의 방법에서는 폴리스티렌 재질의 용기를 80:20-98:2 부피비의 클로로포름-메탄올 혼합용액에 침지한 후 건조하는 것에 의해 표면에 실린더 형상의 기공으로 이루어진 허니컴 패턴이 형성된다. 본 발명의 방법은 별도의 고분자 용액을 필요로 하지 않고, 건조 시 높은 습도 범위를 유지할 필요가 없어 대량생산 및 재현성이 우수하다. 본 발명의 방법에 의해 실린더 형상의 기공으로 이루어진 허니컴 패턴은 평평한 바닥구조를 갖는 종래의 배양용기에 비해 앵커링이 용이한 구조를 제공하기 때문에 세포 부착력이 높고, 영양분 및 대사물의 효과적인 3차원 이동 경로를 제공하여 세포 증식력이 우수하다.
- [0014] 폴리스티렌 재질의 용기를 클로로포름과 메탄올의 혼합용액에 침지시키면 혼합용액은 용기의 표면부를 팽윤(swollen)시킨다. 이때, 폴리스티렌에 대한 비용매인 메탄올의 함량이 너무 많거나, 침지시간이 너무 짧으면

팽윤이 효과적으로 이루어지지 않는다. 따라서 클로로포름과 메탄올의 혼합비는 80:20 이상이며, 상기 혼합용액에의 침지는 10초~10분 동안 이루어지는 것이 바람직하다. 하기 실시예에서는 클로로포름과 메탄올의 혼합비가 85:15인 경우에는 허니컴 패턴이 균일하게 형성되지 않았음을 예시하였으나, 동일 조건에서 침지 시간을 길게 하는 경우에는 역시 균일한 허니컴 패턴의 형성이 가능하였다. 한편, 침지시간이 10초 이내인 경우에는 허니컴 패턴이 균일하게 형성되지 않을 수 있으며, 혼합용액의 혼합비에 따라 최소 침지시간은 달라질 수 있으나 상기 혼합비 범위에서는 침지 시간이 10분 이내에서 충분한 효과를 나타내므로 경제성을 고려하여 10분 이내로 처리하는 것이 바람직하다.

[0015] 이후, 팽윤된 용기를 건조시키면 클로로포름은 메탄올에 비해 증발속도가 빠르기 때문에 증발이 진행됨에 따라 표면에는 메탄올의 농도가 증가하고, 또한 증발과정에서 대기 중의 물이 일부 응축되면서 상분리가 일어나게 된다. 또한 팽윤되어 있던 폴리스티렌 용기의 표면은 다시 응축되면서 상분리에 의해 형성된 액적(droplet)의 모양을 반영한 기공이 형성되어 결과적으로 실린더 형상을 갖는 기공으로 이루어진 허니컴 패턴이 형성된다. 이때, 메탄올이 존재하지 않는다면 상기 기작에 의한 허니컴 패턴의 형성이 불가능하며 실제 실험결과에서도 허니컴 구조가 형성되지 않았다. 사전 실험에 의하면, 허니컴 구조의 형성을 위해서는 혼합용액 중 메탄올의 함량이 2부피% 이상이어야 하였으므로, 본 발명의 방법에서 클로로포름과 메탄올의 혼합비는 80:20~98:2 부피비로 한정하였다.

[0016] 건조과정에서 혼합용액 중 메탄올의 함량이 많을수록 액적의 직경이 증가하므로 기공의 직경 역시 증가하고, 이를 이용하여 클로로포름과 메탄올의 혼합비에 의해 실린더 형상 기공의 직경을 제어할 수 있다. 클로로포름과 메탄올의 혼합비는 기공의 종횡비에는 거의 영향을 미치지 않았다. 반면 침지 시간은 폴리스티렌 용기의 팽윤되는 깊이에 영향을 미치기 때문에 동일한 혼합비에서 침지 시간이 길어지면 기공의 직경은 거의 영향을 받지 않았으나, 깊이에 영향을 미치게 되어 종횡비가 증가하게 된다. 이외에도 건조 시의 습도나 온도도 기공의 직경이나 깊이에 영향을 미칠 수 있으나 그 영향은 크지 않았다.

[0017] 또한 본 발명의 세포배양용 용기는 일단 허니컴 패턴이 형성되어 있다고 하더라도, 다시 혼합용매를 처리하고 건조하면 새롭게 허니컴 패턴을 형성할 수 있기 때문에 세포배양용 용기의 재사용이 가능하다.

[0018] 본 발명은 또한 상용의 펠트리디쉬를 사용하여 세포의 부착성과 증식성을 증가시킬 수 있는 세포 배양방법을 제공한다. 즉, 본 발명의 세포 배양방법은 (A) 폴리스티렌 재질의 배양용기를 80:20~98:2 부피비의 클로로포름-메탄올 혼합용액에 침지하는 단계; (B) 상기 배양용기를 혼합용액으로부터 꺼내어 건조하는 단계; 및 (C) 건조된 배양용기에 세포를 분주하여 배양하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 한다. 이때, 세포 배양 후의 처리과정에서의 화학적 안정성을 증가시키기 위해서는 상기 (B) 단계와 (C) 단계 사이에, 배양용기에 UV를 조사하는 단계를 추가로 포함시킬 수 있다.

발명의 효과

[0019] 이상과 같이 본 발명의 방법에 의하면 고가의 장비를 사용하지 않더라도 간단한 공정에 의해 경제적으로 세포의 부착이 용이하며 영양분의 공급 경로를 제공할 수 있는 실린더 형상의 기공으로 이루어진 허니컴 패턴을 형성시킬 수 있어 생체 모사 환경을 제공하는 세포배양용 용기를 제조할 수 있다.

[0020] 본 발명의 세포배양용 용기 제조방법에서는, 클로로포름과 메탄올의 혼합비와 혼합용매에의 침지시간을 조절하는 것에 의해 기공의 직경과 종횡비를 용이하게 제어할 수 있어 용도에 따른 주문형 제작이 가능하다.

[0021] 또한 본 발명의 세포 배양 방법에 의하면 미세 패턴을 형성시킨 고가의 배양용기를 별도로 구매하지 않더라도 실험실 내에서 간단한 처리에 의해 효과적으로 세포를 배양할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 본 발명에 의한 세포배양용 용기의 제조방법 및 그 원리를 보여주는 모식도.

도 2는 일 실시예에 의해 제조된 세포배양용 용기의 표면 및 단면 구조를 보여주는 FESEM 이미지.

도 3은 클로로포름-메탄올 혼합용매의 비율 및 침지시간에 따른 표면 및 단면 구조를 보여주는 FESEM 이미지.

도 4는 클로로포름-메탄올 혼합용매의 비율에 따른 다른 실시예의 표면 및 단면 구조를 보여주는 FESEM 이미지.

도 5는 상대습도에 따른 표면 구조를 보여주는 FESEM 이미지.

도 6은 용매 어닐링에 대한 UV 조사의 영향을 보여주는 FESEM 이미지.

도 7은 재처리에 따른 배양용기의 표면 및 단면 구조를 보여주는 FESEM 이미지.

도 8은 본 발명에 의한 세포배양용 용기의 세포배양에 대한 효능을 보여주는 SEM 이미지.

도 9는 본 발명에 의한 세포배양용 용기의 세포배양에 대한 효능을 보여주는 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하 첨부된 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0024] [실시예]

[0025] 실시예 1 : 허니컴 패턴의 페트리디쉬의 제조

[0026] 도 1에 도시된 방법에 따라 페트리디쉬의 기재를 혼합용매로 처리하였다. 다양한 조건에서의 표면 패턴 형성을 확인하기 위하여, 폴리스티렌 재질의 페트리디쉬(Mw~220,000, 직경 3.5cm, Sigma-Aldrich)를 5×3 cm로 자른 후 사용 전에 증류수로 세척하고 질소 가스로 건조하였다. dip coater(E-flex, Korea)를 사용하여 페트리디쉬 조각을 클로로포름과 메탄올의 혼합용매에 10~120초간 침지한 후 꺼내어 공기중(RH 65%, 27℃)에서 자연 건조시켰다.

[0027] 실시예 2 : 구조 분석

[0028] 1) 혼합 용매 처리에 의한 표면 구조 분석

[0029] 실시예 1에서 90:10 부피비의 클로로포름-메탄올 혼합용매로 20초간 처리한 후 건조한 페트리디쉬의 표면 구조를 FESEM(field emission scanning electron microscope, JEOL, JSM-7000F, Japan)으로 확인하였다. 도 2는 실제 실험 사진(도 2의 a))과 표면구조(도 2의 b)와 c)) 및 단면구조(도 2의 d))를 보여주는 FESEM 이미지로 기판의 전 영역에 걸쳐 허니컴 패턴이 형성되어 있음을 알 수 있다. 기공의 평균 직경은 약 7 μm , 기공 간의 간격은 약 0.8 μm 로 좁은 분포를 나타내었다. 도 2의 c)의 내부 도면은 FFT(fast Fourier Transform) 이미지로 기공의 배열이 규칙적이고 육각 구조를 갖는 것을 보여준다. 기공의 단면 관찰로부터 기공이 단층으로 형성되어 있으며 종횡비가 큰 실린더 형태임을 확인할 수 있었다. 이와 같은 기공의 형태는 본 발명의 특징적인 형태이다.

[0030] 2) 혼합용매 처리 및 건조 조건에 따른 표면 모폴로지 분석

[0031] 혼합용매 처리 조건 및 건조 조건을 조절하는 것에 의해 표면의 모폴로지를 조절할 수 있는 지 확인하였다.

[0032] 도 3의 a)와 b)는 각각 95:5 및 90:10 부피비의 클로로포름-메탄올을 20초간 처리하고 건조한 후의 표면 FESEM 이미지이며, 도 3에서 스케일바의 크기는 10 μm 를 나타낸다. 95:5 및 90:10의 부피비에서는 규칙적인 허니컴 패턴이 형성된 것에 비해, 도 4의 a), b)와 c), d)는 각각 100:0, 85:15 부피비의 클로로포름-메탄올을 처리한 결과의 표면 및 단면 FESEM 이미지로 규칙적인 기공이 형성되지 않은 것을 보여준다. 하기 표 1은 혼합비에 따른 모폴로지 특성을 정리한 결과로, 기공직경, 기공밀도(기공수)와 기공깊이는 FESEM 이미지로부터 ImageJ 프로그램을 사용하여 분석하였다. 배양용기의 젖음성은 세포 부착과 증식에 영향을 미치는 중요한 인자로, 젖음성의 변화를 측정하기 위하여 3 μm 크기에 물방울에 대한 접촉각을 drop shape analyzer(Kruss DSA 100, Germany)로 측정하여 표 1에 함께 기재하였다. 하기 표 1에서 부피비가 100:0과 85:15인 조건에서는 규칙적인 패턴이 형성되지 않았으므로 작은 기공을 선택하여 그 값을 측정하였다.

표 1

부피비 (ChL:MeOH)	기공직경 (d, μm)	기공밀도 (pore/($10^3\mu\text{m}^2$))	기공깊이 (h, μm)	종횡비 (h/d)	접촉각 ($^\circ$)
100:0	8.1 ± 5.2	3.8	3.9 ± 1.5	0.7	75
95:5	6.2 ± 0.3	21.3	7.9 ± 0.5	1.3	128
90:10	7.3 ± 0.3	18.8	9.2 ± 0.7	1.3	132
85:15	10.1 ± 3.1	4.42	13.3 ± 0.9	1.3	112

[0033]

[0034]

도 3의 a), b), 도 4 및 표 1을 참조하면, 메탄올의 부피가 증가함에 따라 기공의 직경과 깊이가 증가하여 기공 밀도는 감소하였으며, 종횡비는 혼합비에 거의 영향을 받지 않는 것을 확인할 수 있다.

[0035]

페트리디쉬의 물에 대한 초기 접촉각은 76.8° 로 클로로포름-메탄올 혼합용액의 처리에 따라 접촉각이 증가하여 소수성이 향상되었음을 보여주었다. 접촉각은 90:10의 클로로포름-메탄올 혼합용액의 처리시 132° 로 최대값을 나타내었다.

[0036]

도 3의 c)~f)와 표 2는 각각 90:10 부피비의 클로로포름-메탄올 혼합용액에의 침지시간(10초, 20초, 30초 및 60초)에 따른 기공의 단면 형상을 보여주는 FESEM 이미지와 그로부터 계산된 기공의 모폴로지 데이터이다. 도 3과 표 2에서 확인할 수 있듯이 혼합용액에의 침지시간이 길어짐에 따라 기공직경은 거의 변화가 없는 반면, 기공깊이는 증가하여 종횡비가 점차 증가하였다. 또한 10초, 20초 동안 침지하는 경우에는 각 기공이 분리되어 있었으나, 침지 시간이 30초를 넘어서면 기공들의 상부는 분리되어 있으나 하부 부분들은 일부 병합된 구조를 형성하였다. 침지시간이 10초보다 짧은 경우에는 규칙적인 기공이 형성되지 않았으며, 침지시간을 120초로 더 증가시키더라도 기공깊이나 구조, 종횡비에 추가적인 변화는 관측되지 않았다(데이터 미도시).

표 2

침지시간 (s)	기공깊이 (μm)	종횡비 (h/d)
10	7.5 ± 0.2	1.2
20	8.2 ± 0.2	1.3
30	10.3 ± 0.7	1.5
60	14.4 ± 1.2	2.2

[0037]

[0038]

도 5는 상대습도가 40%와 80%인 조건에서 90:10 부피비의 메탄올을 사용하여 20초간 침지한 페트리디쉬의 표면 FESEM 이미지이다. 습도가 증가함에 따라 기공의 크기는 다소 증가하였으나, 클로로포름-메탄올의 혼합비나 침지시간만큼 큰 영향을 미치는지는 못함을 확인할 수 있다.

[0039]

실시예 3 : 자외선 처리에 의한 화학적 안정성 평가

[0040]

폴리스티렌 재질의 시험관을 90:10 부피비의 메탄올에 20초간 침지한 후 상온(RH 65%, 27°C) 조건에서 건조하였다. 건조된 시험관에 Oriel Flood Exposure System (Model 92521, Newport Corporation, USA)을 사용하여 대기 중에서 220~260 nm의 자외선($19.0 \text{ mW}/\text{cm}^2$)을 6시간 동안 조사하였다. UV 광원과 시험관의 거리는 5cm를 유지하였다.

[0041]

도 6의 a)와 b)는 각각 UV 조사 전, 후의 시험관 내부 표면 이미지로, 평평한 기관이 아닌 시험관에서도 균일한 허니컴 구조가 형성되며, UV 조사 후에도 기공직경이 다소 증가하지만 허니컴 구조가 유지됨을 보여준다.

[0042]

상기 방법에 의해 형성된 표면구조가 용매에 대해 안정한가를 확인하기 위하여 용매 어닐링(solvent Annealin

g)을 실시하였다. 용매 어닐링은 시험관을 포화 클로로포름 증기 조건에서 5분간 방치하는 방식으로 실시하였다. 도 6의 c)와 d)는 각각 UV 조사 전, 후의 시험관에 대해 용매 어닐링 후의 FESEM 이미지이다. UV 조사 전에는 용매 어닐링에 의해 허니컴 구조가 흐트러지지만 UV 조사 후에는 용매 어닐링 후에도 허니컴 구조가 그대로 유지되어 안정성이 크게 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0043] 한편, 표면 재처리 가능성을 확인하기 위하여 일차적으로 허니컴 패턴을 형성시켰던 페트리디쉬를 다시 한번 클로로포름-메탄올 용액에 침지한 후 건조시켜 재사용이 가능한 지 확인하였다. 도 7은 표면 재처리 후의 표면 FESEM 이미지로 재처리 과정에서도 균일한 허니컴 구조가 형성된 것을 확인할 수 있다. 이로부터 페트리디쉬는 허니컴 패턴을 재형성하여 반복 사용할 수 있음을 알 수 있다.

[0044] 실시예 4 : 세포 배양

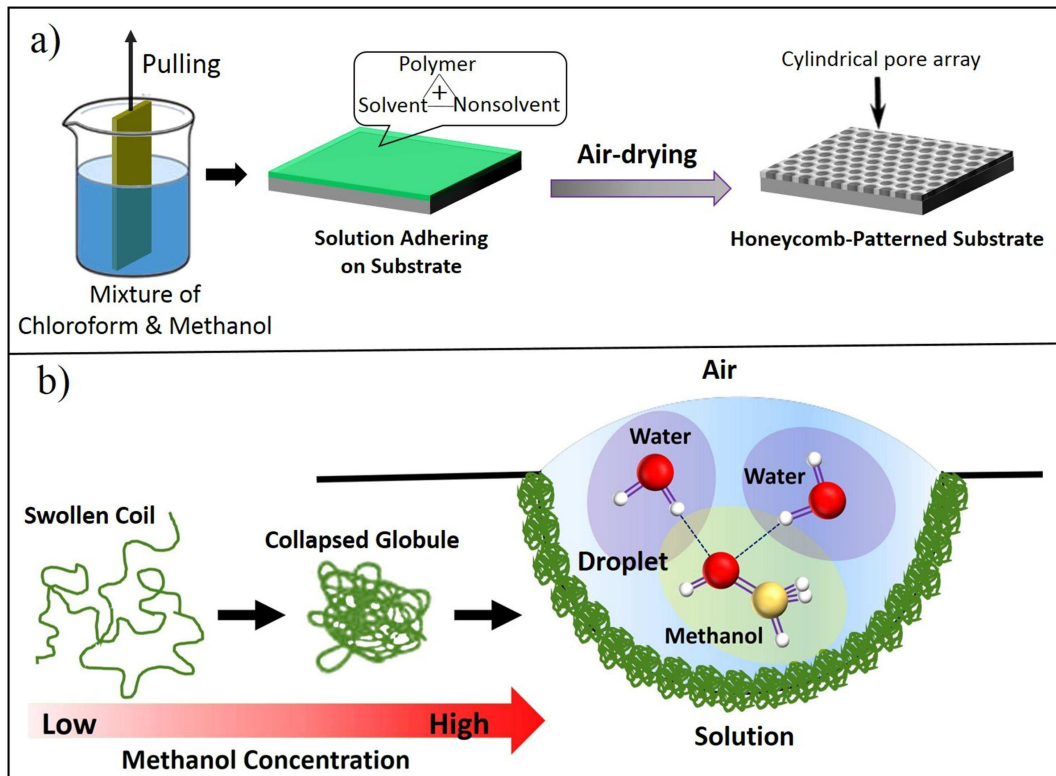
[0045] NIH3T3 세포주(Korea Cell Line Bank)를 사용하여 상용 페트리디쉬와 허니컴 패턴이 형성된 본 발명의 페트리디쉬에서의 세포 성장 양상을 확인하였다. 허니컴 패턴은 페트리디쉬를 90:10 부피비의 클로로포름-메탄올 용액에 20초간 침지한 후 건조하여 형성하였다. FESEM 이미지 분석을 위하여 상용 페트리디쉬 또는 허니컴 패턴이 형성된 페트리디쉬를 $5 \times 3 \text{ cm}^2$ 의 크기로 자른 후 멸균을 위하여 UV로 5분간 조사하고, Dullbecco's PBS(DPBS) 용액으로 2회 세척하여 24-well 플레이트 또는 6-well 플레이트의 각 웰에 넣었다. 각 웰에 89% DMEM, 10% FBS, and 1% 100X antibiotic-antimycotic agent를 포함하는 10^5 cells/ml 농도의 NIH3T3 세포 용액 1ml를 넣고 37°C , 5% CO_2 조건에서 24시간 배양하였다. 배양 후 페트리디쉬 조각을 꺼내어 DPBS 용액으로 2회 세척하고 4% 포르말데하이드로 30분간 고정하였다. 이후 DPBS로 다시 세척하고, 50%(v/v) 에탄올 15분, 75%(v/v) 에탄올 15분, 95% 에탄올(v/v) 15분씩 2회, 100% 에탄올 30분씩 2회 순차적으로 처리하여 탈수시켰다. fume hood에서 건조시킨 시료를 SEM으로 관측하고, 그 결과를 도 8에 도시하였다.

[0046] 도 8에서 a), b)는 상용 페트리디쉬, c), d)는 허니컴 패턴이 형성된 페트리디쉬에서 배양된 세포의 SEM 이미지이며, e)와 f)는 사시 이미지이다. 도 8은 동일 시간 배양 시에 상용 페트리디쉬에 비해 허니컴 패턴이 형성된 페트리디쉬의 표면에 부착된 세포가 훨씬 많으며, 상용 페트리디쉬에서는 세포들이 전체 영역에 랜덤하게 퍼져 있는 것에 비해, 허니컴 페트리디쉬에서는 세포들이 뭉쳐서 존재함을 보여준다. 또한 고배율의 이미지에서 허니컴 페트리디쉬의 표면에 부착된 세포는 사상위족(filopodia)이 발달되어 있으나, 상용 페트리디쉬의 세포에서는 사상위족이 관측되지 않았다. 사시 이미지에서도 허니컴 페트리디쉬에서 세포와 세포, 세포와 페트리디쉬 간 상호작용을 보여준다.

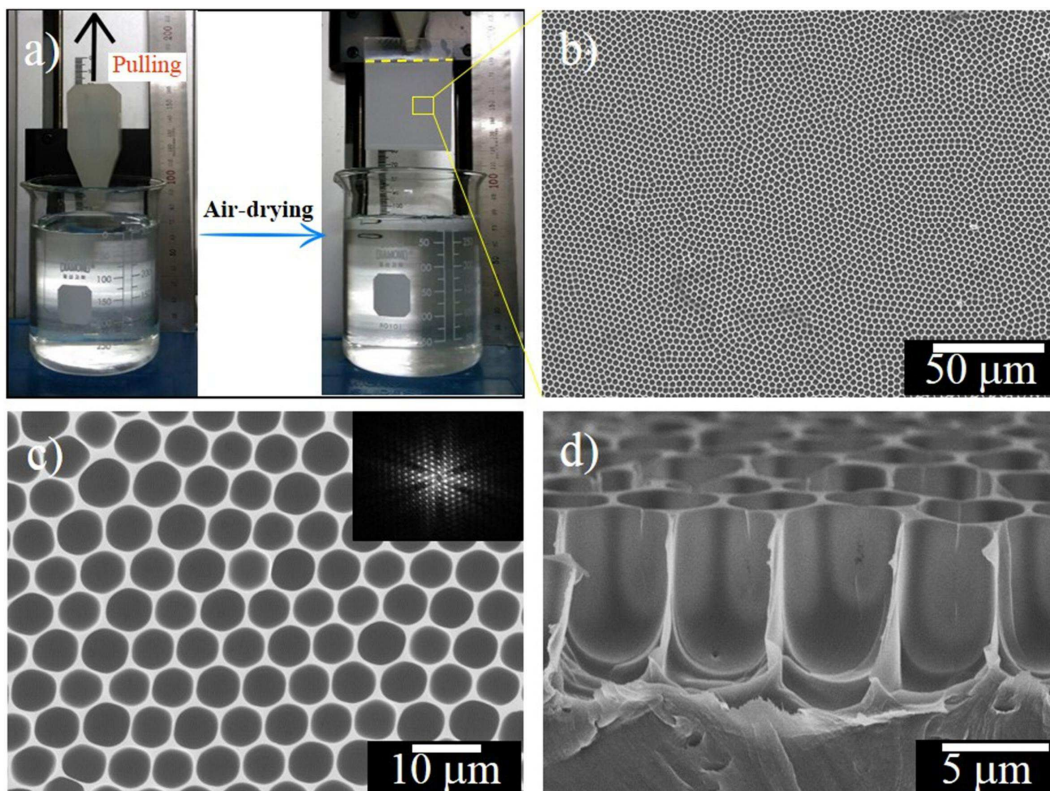
[0047] 세포 증식에 대한 배양용기의 영향을 정량적으로 분석하기 위하여, 12시간, 24시간 및 48시간 배양 후의 세포 밀도를 측정하였다. 표면 세포 밀도(cells/ cm^2)는 혈구계수기(haematocytometer)로 측정하였으며, unpaired Student's t-test (GraphPad Prism 5 for Windows)로 통계처리하였다. 도 9는 그 결과로서, 상용 페트리디쉬에 비해 허니컴 페트리디쉬에서 세포 성장이 유의미하게 증가함을 보여준다($p < 0.001$).

도면

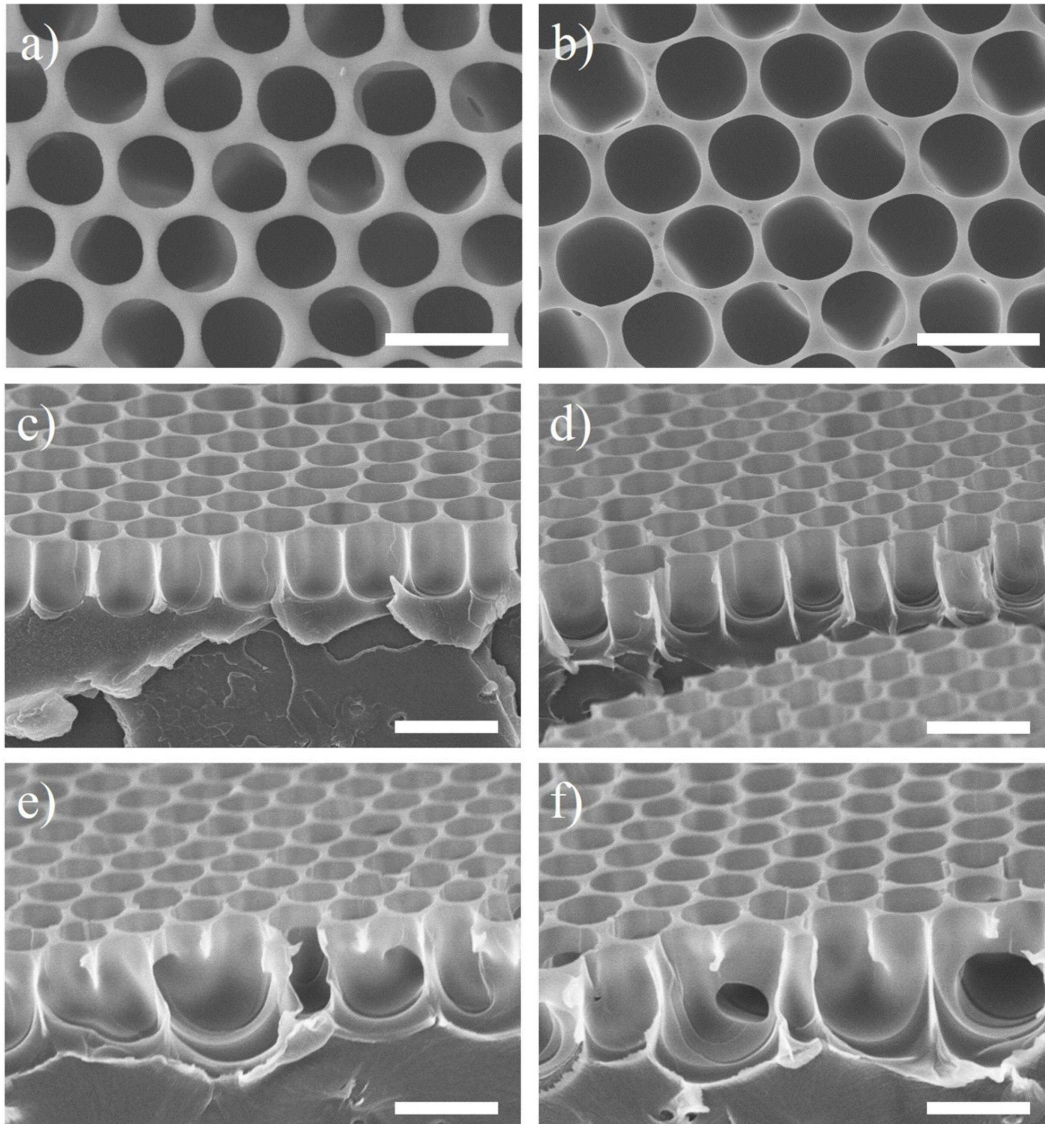
도면1



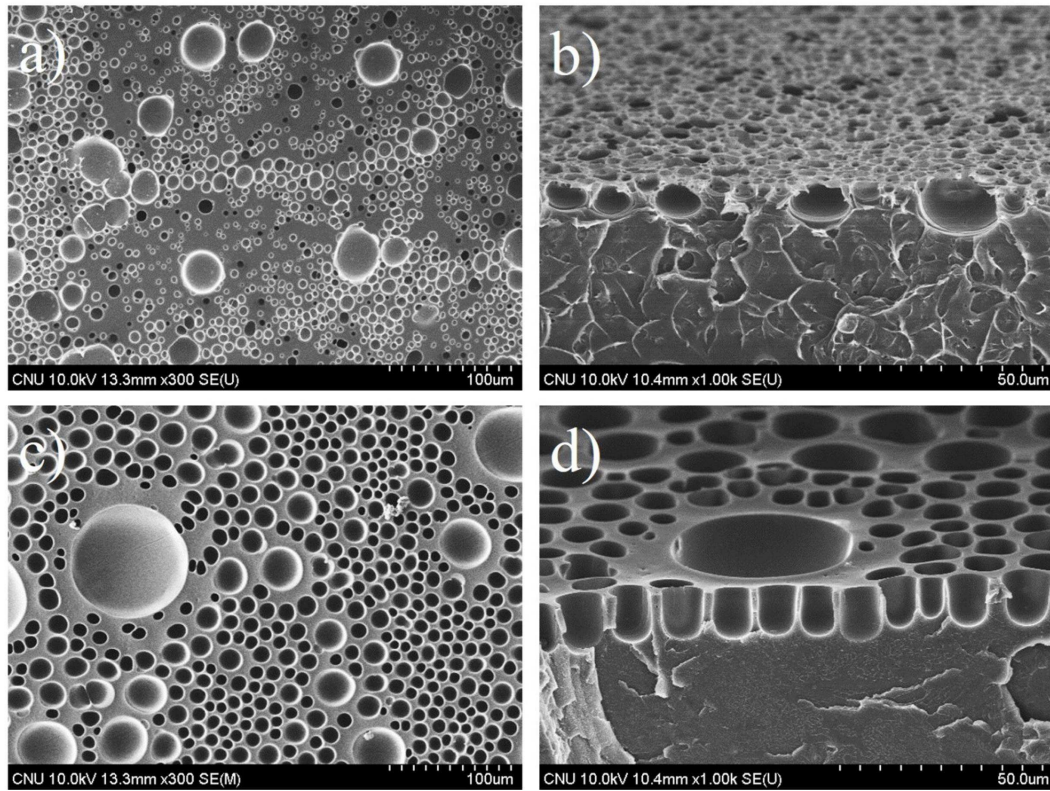
도면2



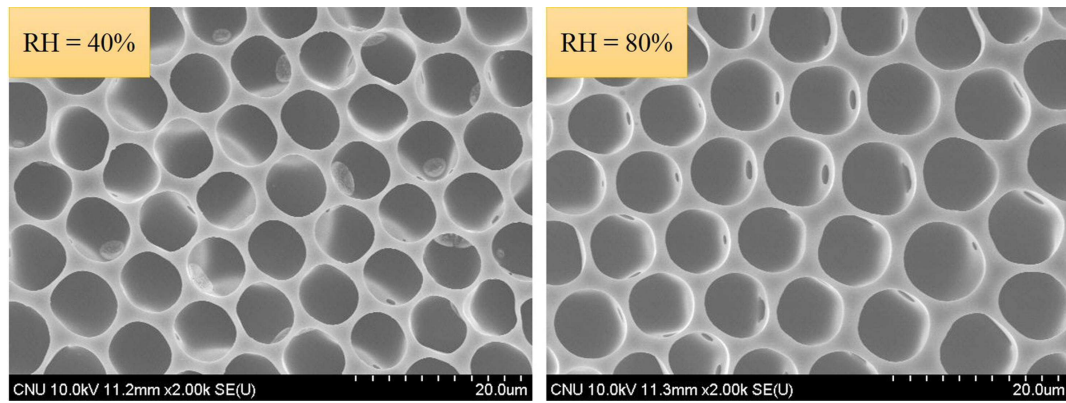
도면3



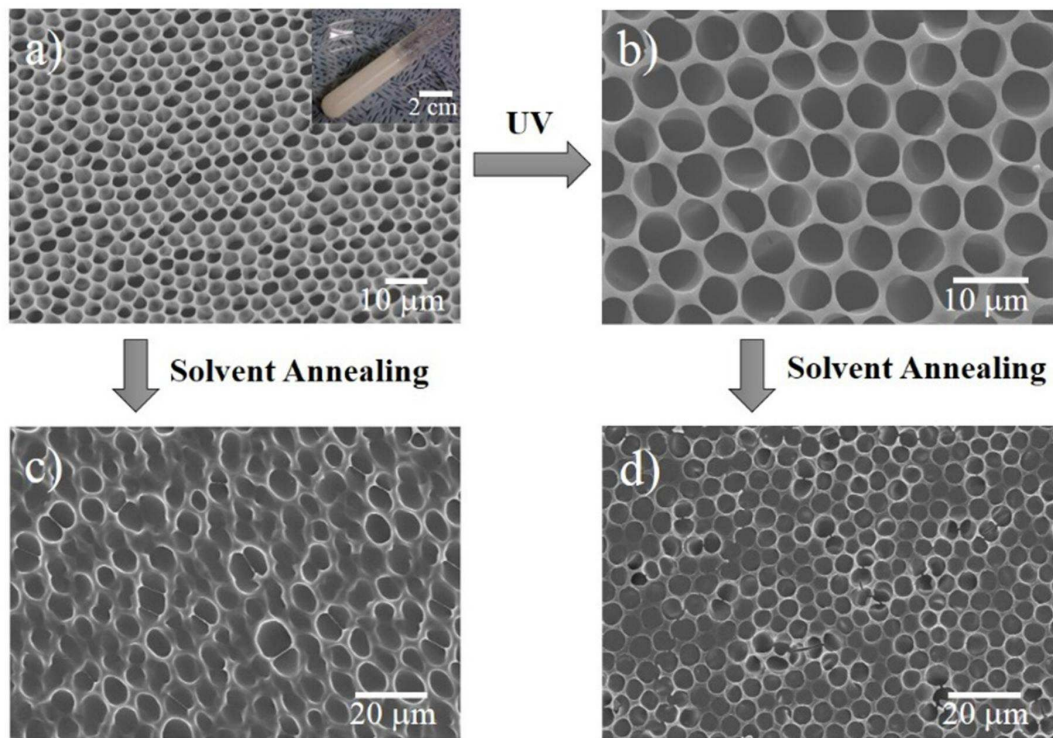
도면4



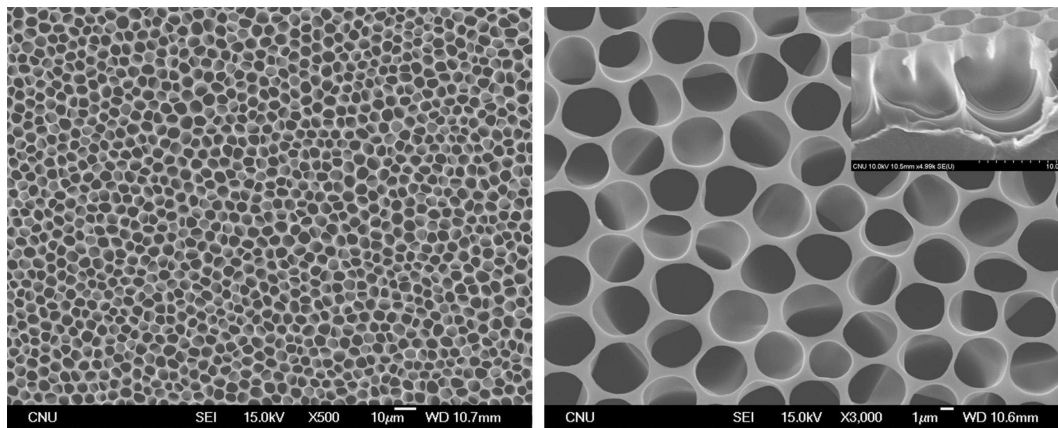
도면5



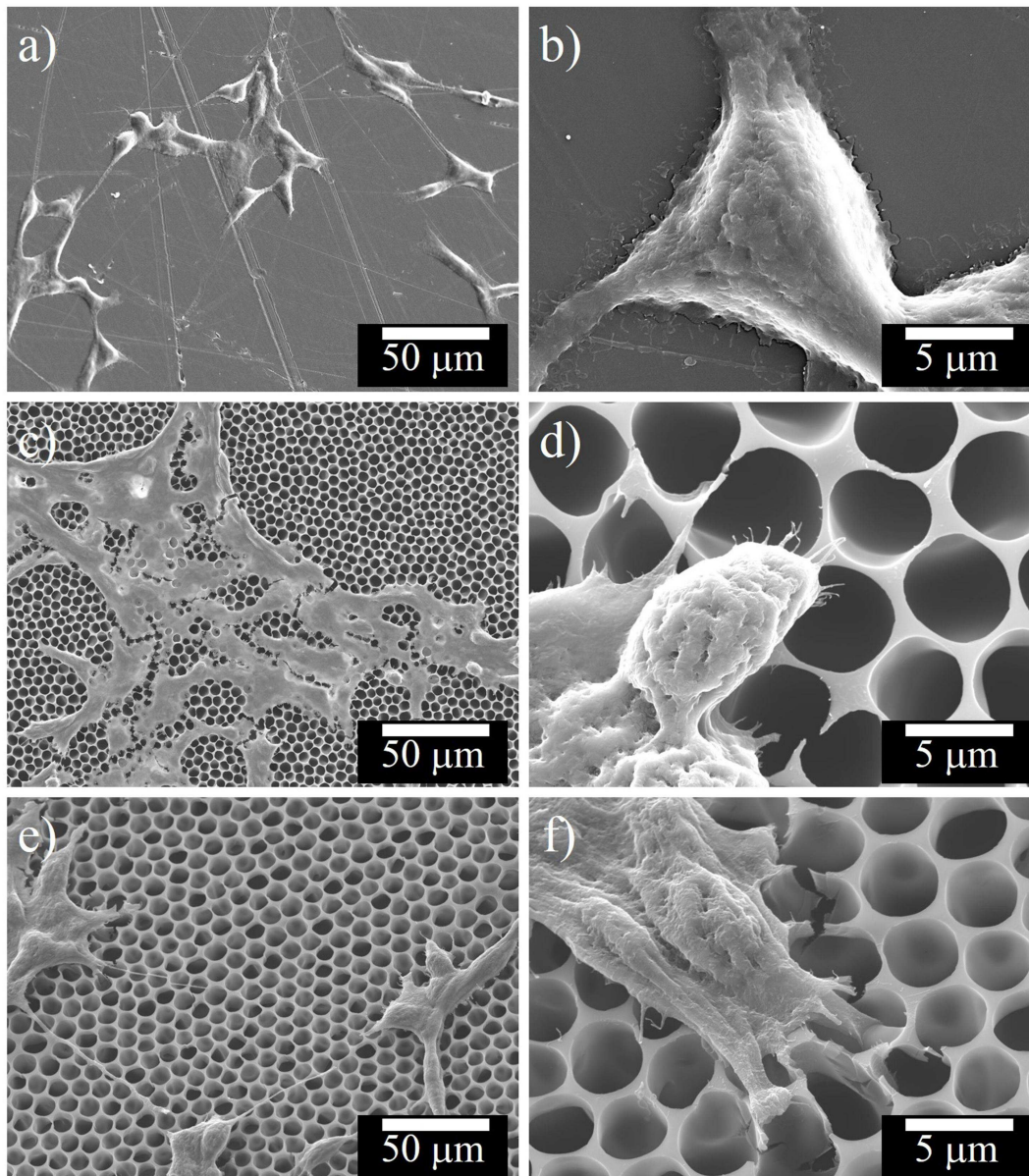
도면6



도면7



도면8



도면9

