

나노파이버 기반의 의료용 지지체 제작 기술 및 응용

신호준⁺, 이창훈⁺, 조인희⁺, 김인애⁺, 이용재⁺, 박기동⁺⁺, 김정욱^{*}

Fabrication of Nanofiber-based Medical scaffolds and their Prospective Application

Ho Joon Shin⁺, Chang-Hun Lee⁺, In-Hee Cho⁺, In Ae Kim⁺, Yong Jae Lee⁺, Ki-Dong Park⁺⁺,

Jung-Woog Shin^{*}

Abstract

Utilizing the electrospinning technique nanofiber-based biodegradable scaffolds made of PLGA was suggested. Under various conditions, their diameters and porosity as well as mechanical strength were evaluated. In addition to those, cell(chondrocyte) proliferation and formation of extracellular matrices were also investigated along with the conventional membrane type PLGA scaffolds for the potential use in tissue engineering. As conclusions, this type of scaffold showed a potential of application to tissue engineering in view of mechanical stability as well as cellular responses.

Key Words : Electrospinning, PLGA, nanofiber structure, cartilage, reconstruction

1. 서론

최근 들어 여러 첨단 분야에서 나노기술에 대한 관심이 높아지고 있는 가운데 전기방사는 용매에 용해된 고분자 용액에 전기적인 힘을 가하여 나노섬유를 생산하는 방법으로 제조 과정의 단순성과 복합성분의 나노섬유를 제작할 수 있어 제품 기술의 응용성이 높은 방법으로 평가받고 있다.^{1,2)}

전기방사 기법은 방사구 끝에 매달려 있는 고분자 용액에 높은 전기장을 가하여 유도된 전하의 상호반발력으로 인해 고분자 미세방울이 테일러 콘 (Taylor cone)을 형성하게 되고 이때 전기적 반발력이 표면장력보다 강할 때 고분자 용액 제트가 방출되는 원리를 이용한다. 방출된 용액은 공기 중을 비행하는 동안 용매는 휘발되고 수십~수백 nm의 직경을 지니는 섬유가 3차원 그물구조로 적층되어 부직포 형태의 나노크기의 섬유망을 형성하게 된다.^{3,4)} 이러한 방법으로 만들어진 부직포는 부피 대비 표면적의 비가 극히 높으며 공극률이 매우 높아 뛰어난 호흡성을 지니고 있는 것으로 알려져 있으며 이러한 특성으로 인해 최근 들어 조직공학 분야에서 조직 재생을 위한 지

* 발표자, 인제대학교 의용공학과 (sjw@bme.inje.ac.kr)

(621-749) 경남 김해시 어방동 607번지

+ 인제대학교 의용공학과

++ 아주대학교 고분자과학기술학과

지체로서의 활용 가능성에 주목받아 많은 연구가 진행되고 있다.^{1,2,4,5)}

본 연구에서는 생분해성 고분자인 PLGA (poly (DL-lactide-co-glycolic acid))를 이용하여 나노섬유를 제작 시, 여러 조건들에 의해 섬유 생성이 어떠한 영향을 받는지 연구하고 아울러 구조적 안전성과 세포 적합성을 살펴본다 지지체로서의 가능성에 대해 연구해 보았다.

2. 재료 및 방법

2.1 PLGA 준비

PLGA는 L-lactide와 glycolide 단량체 (Purac biochem., Ltd., Gorinchem, Netherlands)를 에틸아세트로 재결정 시킨 후 개환중합반응을 이용하여 75:25 비율의 PLGA를 합성하였다. 합성시 개시제로는 Stannous-octoate (Sigma-Aldrich Korea, Ltd., Yongin, Korea)를 사용하였으며 앰플형 반응조에 L-lactide와 glycolide를 75:25 몰 비율로 혼합하여 개시제를 첨가한 후 오일 베스에서 140℃로 10시간 정도 가열하였다. 여기서 얻어진 PLGA 고분자 용액을 클로로포름에 녹인 뒤 메틸 알콜에 침전시켜 PLGA를 획득하였다. PLGA는 7일 동안 진공 건조기 (LVD-2030, LABTECH[®] Co., Ltd., Namyangju, Korea)에서 실온으로 건조시킨 후 동결 건조기 (Clean Vac 8, Biotron Co., Ltd., Kangwon, Korea)에서 건조 후 보관하였다. 제조된 PLGA의 특성은 Table 1에 나타내었다.

2.2 나노섬유 지지체 제작

나노 섬유 지지체는 자체 제작된 전기방사 시스템을 이용하여 제작되었다 (Fig. 1). 전기방사 시스템의 방사구는 18 게이지 주사바늘을 이용하였으며 급속판으로 구성된 집속부, 분사구와 집속부 사이에 고전압을 부과하기 위해 고전압 발생기 (SHV200RD-40K, ConverTech, Korea)를 사용하였다. 전기 방사 시스템은 챔버 내에 위치하여 주변의 기류의 영향을 배제하였다. 전기방사 시 효과적인 용매의 증발과 용액의 일정한 점도 유지를 위해 챔버의 내부 온도를 40℃로 유지하였다. 나노섬유는 PLGA를 DMF (N,N-Dimethylformamide,

Junsei Chemical Co., Ltd, Japan)와 THF (Tetrahydrofuran, Junsei Chemical Co., Ltd, Japan)를 1:1로 혼합한 용매⁶⁾에 20wt%로 녹인 후 0.56kV/cm의 전압을 가하여 제작하였다. 제작된 부직포는 진공건조기 (LVD-2030, LABTECH[®] Co., Ltd., Namyangju, Korea)에서 5일간 실온에서 건조 후 건조기에서 보관하였다

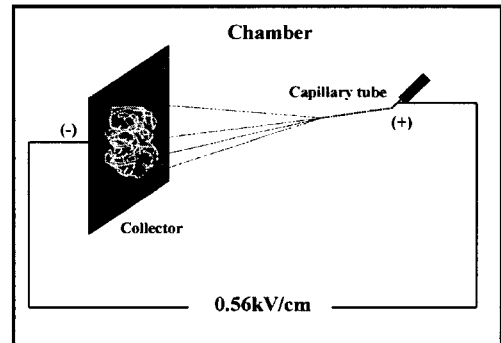


Fig. 1 Electrospinning system to fabricate non-woven nanofiber

2.3 나노섬유의 직경 측정

나노섬유의 직경을 측정하기 위해 SEM (Scanning Electron Microscope, JSM-6700F, JEOL, Tokyo, Japan)을 이용하였다. 제작된 나노섬유 부직포는 백금 코팅 후 SEM을 이용하여 촬영 되었다. 촬영된 이미지는 HImage++97 (Western Vision Software, USA)에서 섬유의 직경에 해당하는 픽셀의 수를 측정 후 픽셀의 크기와의 곱으로 직경을 계산하였다.

2.4 공극률 측정

시편을 10mm×10mm×0.2mm로 재단 후 건조 상태와 젖은 상태의 무게를 측정하여 다음과 같은 식을 이용하여 공극률을 계산하였다.

$$\text{공극률} = \frac{\text{흡수한 수분의 부피}}{\text{지지체의 부피}} \times 100(\%)$$

2.5 방사조건 변화에 따른 나노섬유의 직경 변화

2.5.1 방사용액의 농도변화에 따른 직경변화

방사용액의 농도는 20, 25, 30wt%로 변화시켰

으며 방사거리는 25cm, 전압은 14kV를 부과한 상태에서 부직포 제작 후 나노섬유의 직경 변화를 관찰하였다.

2.5.2 방사거리 변화에 따른 직경변화

방사거리는 5~40cm까지 5cm단위로 변화시켰으며 농도는 20wt%, 전압은 14kV를 유지하였다. 제작된 부직포는 SEM촬영 후 나노섬유의 직경을 측정하였다.

2.6 인장실험

제작된 지지체의 구조적 안전성을 검증하기 위해 인장실험을 실시하였다. 시편은 10mm × 60mm × 0.2mm⁷⁾의 크기로 재단되었으며 특별히 제작된 지그를 이용하여 인장시험기 (MTS 858.20 Microbionix, MTS System Corp., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 실온에서 0.05cm/sec⁷⁾의 속도로 시편에 변형을 주어 파괴될 때까지 인장력을 가하였다. 데이터는 0.5 Hz의 간격으로 획득하였다. 실험군은 방사용액의 농도에 따라 20, 25, 30wt%로 구분되었으며 변형-하중 데이터로부터 인장계수, 최대 인장응력, 최대 인장 변형률을 계산하였다.

2.7 생물학적 반응

2.7.1 세포분리

연골세포는 생후 6개월 된 돼지 뒷다리 무릎관절의 대퇴골 면의 연골에서 0.2% type II collagenase (Gibco BRL[®], USA)를 사용한 효소분리법으로 분리하였다. 분리된 세포는 DMEM/F-12 배지 (10% 우세포혈청 (FBS, Gibco BRL[®], USA), 50 µg/ml의 L-ascorbic acid)를 이용하여 37 °C, 5% CO₂ 상태의 배양기에서 배양되었으며, 2회 계대배양 후 실험에 사용하였다.

2.7.2 나노섬유 및 막 형태 지지체 제작

나노섬유 지지체는 농도 20wt%, 0.56kV/cm의 전압 조건에서 제작되었다. 막 형태 지지체는 20wt%의 용액을 평평한 유리 디쉬에 넣은 후 진공건조기에서 5일 동안 건조시켜 제작하였다.

2.7.3 SEM 촬영

나노섬유 지지체에 부착되어 있는 세포의 형상을 관찰하기 위해 SEM을 이용하였다. SEM 촬영을 위해 시편에서 배지를 제거한 후 세포의 고정을 위해 2% glutaraldehyde를 이용하여 4 °C에서 2시간 동안

고정하였다. 고정 후 50, 70, 80, 90, 100% 에틸 알코올에 2분씩 세척하여 탈수를 한 후 상온에서 건조시켰다.⁸⁾ 시편은 백금을 이용하여 코팅하였으며 5kV에서 SEM을 촬영하였다.

2.7.4 표면 상태에 따른 조직 형성 비교

제작된 지지체를 10mm×10mm×0.2mm로 제단 후 UV를 이용하여 멸균하였다. 50% 에틸 알코올에 30초간 prewetting을 실시하였으며 HBSS에 24시간 동안 보관 후 배지를 이용하여 2회 세척하였다. 연골 세포는 지지체 당 5×10⁴cells⁷⁾로 seeding한 후 24-well plate에서 배양하였다. 실험군은 나노섬유 지지체를 이용한 군과 막 형태 지지체를 이용한 군 (대조군)으로 구분하였으며 각각 배양 후 1, 7, 14일에 시편을 획득하였다. DNA 키트 (PicoGreen dsDNA Quantitation kit, Molecular Probes, Eugene, OR, USA)와 GAG 키트 (Blyscan Glycosaminoglycan Assay, Biocolor Ltd., Belfast, N. Ireland)를 이용하여 세포증식 및 세포외기질 형성 정도를 관찰하였다.

3. 결 과

3.1 나노섬유의 직경

20wt%, 0.56kV/cm의 환경에서 나노섬유의 직경은 0.55±0.15µm였으며 분포는 0.33~1.04µm였다 (Fig. 2).

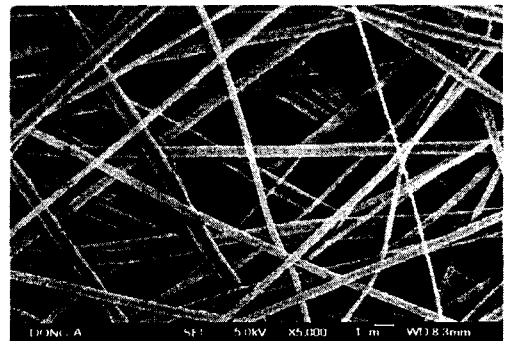


Fig. 2 SEM micrograph of nanofiber scaffold

3.2 공극률

나노섬유 지지체의 공극률은 지지체가 흡수한 수분의 부피와 지지체 부피의 비를 가지고 계산하였으며 85.21±4.62%의 공극률을 보였다.

3.3 방사환경 변화에 따른 나노섬유의 직경 변화
방사용액의 농도와 방사거리에 따른 나노섬유의 직경 변화를 관찰한 결과 농도가 높을수록 섬유 직경은 커졌다 (Fig. 3). 하지만 방사거리의 경우에는 5-10cm 정도의 근거리에서는 상대적으로 직경이 컸으나 10cm 이후부터는 전체적으로 감소하는 경향을 보였으나 그 정도는 미비하였다 (Fig. 4).

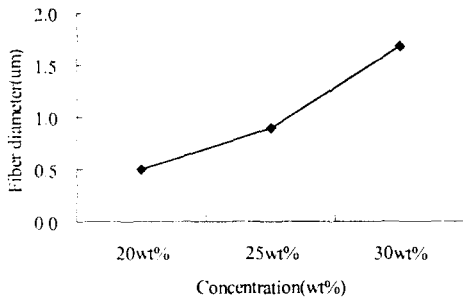


Fig. 3 Fiber diameter in different solution concentration at 25cm and 14kV.

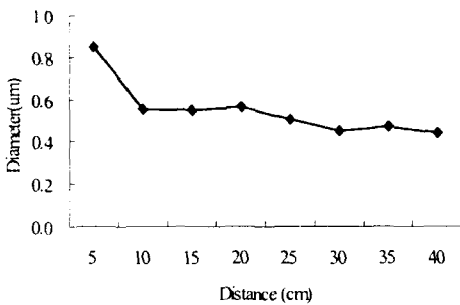


Fig. 4 Fiber diameter in different distance at 20wt% and 14kV.

3.4 인장실험

방사용액의 농도에 따른 나노섬유 지지체의 인장률, 최대 인장 응력, 인장 변형률을 비교한 결과 방사용액의 농도가 높을수록 높은 값을 지니는 것으로 나타났으며 그 차는 통계적으로 유의하였다 (Fig. 5, 6).

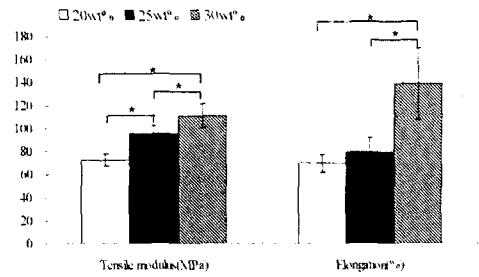


Fig. 5 Tensile modulus and Elongation in various solution concentration (* : $p < 0.05$).

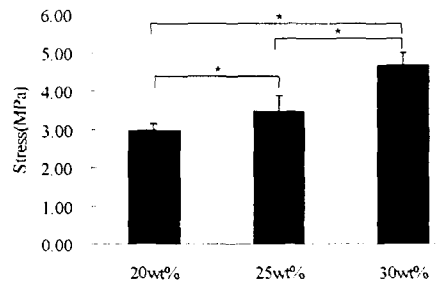


Fig. 6 Ultimate tensile stress in various solution concentration (* : $p < 0.05$).

3.5 생물학적 반응 비교

3.5.1 SEM 촬영

연골세포가 지지체의 섬유들 사이에 부착되어 섬유를 따라 자라는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 7).

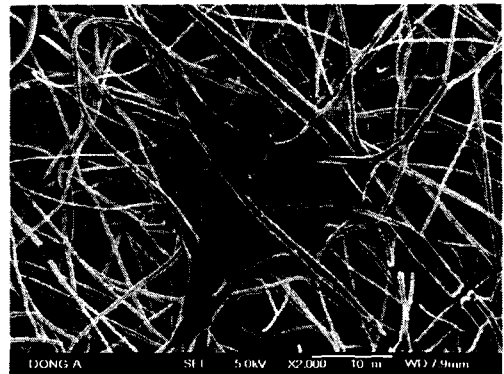
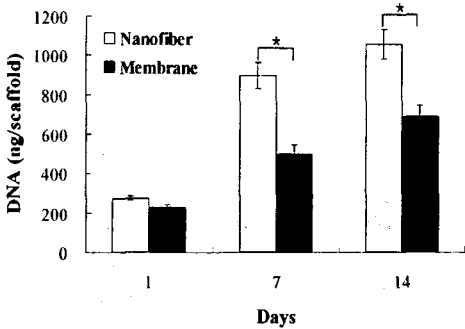


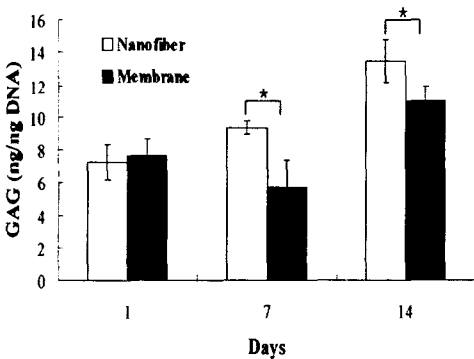
Fig. 7 SEM observation of chondrocytes in nanofiber scaffold.

3.5.2 표면 상태에 따른 조직 형성 비교

나노섬유 지지체가 지니는 섬유성 구조가 세포 증식 및 세포외기질 형성에 미치는 영향을 알아보기 위해 나노섬유 지지체와 막 형태의 지지체에 연골세포를 배양하여 DNA 및 GAG 양을 비교해 보았다. 배양 7일 이후부터 나노섬유 지지체 쪽이 높은 DNA와 GAG의 증가 정도를 보여주었으며 그 차는 통계적으로 유의하였다(Fig. 8).



(a) DNA content



(b) GAG content

Fig. 8 DNA and GAG content of nanofiber and membrane scaffold (* : $p < 0.05$).

4. 고찰 및 결론

본 연구에서는 생분해성 고분자인 PLGA를 전기방사법을 이용하여 나노 크기의 섬유로 구성된 지지체를 제작함에 있어 최적의 방사조건을 찾는 동시에 제작된 지지체의 구조적 안전성과 섬유성 구조가 세포의 증식과 세포외기질 형성에 미치는 영향을 알아

보았다. 선행연구들에 의해 방사용액의 농도와 방사 거리는 나노섬유의 직경에 큰 영향을 미치는 요소임이 알려져 있다.^{1,2,3,4)} 실험결과 용액의 농도가 높을수록 굵은 직경을 지닌 섬유가 만들어 졌다. Buchko 등¹⁰⁾은 용액의 점도 η 와 섬유직경 d 의 관계를 $d = \sqrt{\eta}$ 로 표현하였다. 용액의 점도와 표면 장력은 반비례 관계를 지니고 있는 것으로 알려져 있고 표면장력과 테일러 콘의 말단부의 곡률반경 역시 반비례 관계인 것으로 알려져 있다.¹¹⁾ 즉 점도와 콘 말단부의 곡률반경은 정비례 관계를 지니고 있으며 높은 점도의 용액은 방사시 큰 곡률반경을 지니는 콘을 형성하기 때문에 굵은 직경을 지닌 섬유를 형성할 가능성이 높은 것으로 사료된다. 방사거리의 변화에 따른 섬유 직경의 변화는 방사거리 10cm 이후로는 점차적으로 낮아지는 경향을 보였으나 그 정도는 미비하였다. 근거리에서 굵은 직경의 나노섬유가 형성된 이유는 방사거리가 짧아 용매의 증발이 충분하지 못한 상태에서 섬유들이 서로 뭉쳐졌기 때문으로 사료된다.

나노 섬유 지지체는 제작 시 농도, 방사거리, 전압 등의 여러 변수에 영향을 받으며 본 연구에서는 이러한 변수 중 방사용액의 농도에 따른 지지체의 강성도 변화에 대해 연구하였다. 전기방사 시 용액의 농도는 나노 섬유의 직경에 영향을 미치는 중요한 요소로서 농도가 높을수록 굵은 직경의 섬유가 생성되는 것으로 보고되고 있다.^{4,6,12)} 인장 실험의 결과, 높은 농도에서 만들어진 지지체가 인장 계수, 최대 인장 응력, 최대 인장 변형률에서 모두 높은 수치를 나타내었으며 이러한 사실들로부터 나노 섬유 지지체의 경우 지지체를 구성하는 섬유의 직경은 지지체의 물성치에 영향을 미치는 요소인 것으로 사료된다. 가장 강성도가 높은 30wt% 군의 경우 인장 계수가 $110.78 \pm 10.13 \text{MPa}$ 로 인간의 연조직과 유사한 강성도를 지니고 있어 지지체로서 충분한 구조적 안전성을 제공할 수 있을 것으로 사료된다.⁷⁾

나노섬유와 막 형태 지지체에서 DNA와 GAG 정도를 비교한 결과 배양 7, 14일 때 나노섬유 지지체 쪽의 연골세포가 DNA, GAG 모두 높은 수치를 보여주었으며 그 차는 통계적으로도 유의하였다 (Fig. 8). Flemming 등⁸⁾은 마이크로 및 나노

사이즈의 기질기를 지닌 표면이 세포의 점착 및 세포외기질 형성에 유리하다는 연구 결과를 보고하였으며 Li 등⁷⁾은 나노섬유 지지체의 섬유성 구조가 세포외기질의 콜라겐 구조와 유사하다는 연구 결과를 보고하였다. 그리고 공극률이 85%로 물질 교환에 유리한 환경을 제공하고 있다. 이러한 사실들로부터 나노 섬유 지지체의 섬유성 구조는 세포의 증식 및 세포외기질 형성에 유리한 표면조건을 제공하는 것으로 사료된다.

이러한 사실에 근거하여 전기방사법을 제작된 PLGA 나노섬유 지지체는 연골 재생용 지지체로서 높은 가능성을 지니고 있는 것으로 사료된다.

후 기

본 연구는 2003년 산업자원부 차세대신기술개발 과제 '이온빔 이용 나노가공용 장비 개발' 사업의 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

Table 1. The major properties of PLGA used

Polymer	Data		
	Molecular weight (kD)	Intrinsic viscosity (g/dl)	Tg (°C)
75:25 PLGA	123.0	0.3968	59.0

참고문헌

- (1) Doshi, J., and Reneker, D. H., 1995, "Electrospinning Process and Applications of Electrospun Fibers", *J. Electrostatics*, Vol. 35, pp. 151-160.
- (2) Zong, X., Kim, K., Fang, D., Ran, S., Hsiao, B. S. and Chu, B., 2002, "Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes" *Polymer*, Vol. 43, pp. 4403-4412.
- (3) Lee, S. G., Choi, S. S., Joo, C. W., 2002, "Nanofiber formation of poly(etherimide) under various electrospinning condition", *J. Korean fiber society*, Vol. 39, pp.1-13.
- (4) Deitzel, J. M., Kleinmeyer, J., Harris, D., 2001, "The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles", *Polymer*, Vol. 42, pp. 261-272.
- (5) Yoshimoto, H., Shin, Y. M., Terai, H., 2003 "A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering", *Biomaterials*, Vol. 24, pp. 2077-2082.
- (6) Lee, K. H., Kim, H. Y., La, Y. M., Lee, D. R. and Sung, N. H., 2003, "Influence of a mixing solvent with tetrahydrofuran and N,N-dimethylformamide on electrospun poly(vinyl chloride) nonwoven mats," *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.*, Vol. 49, pp. 259-268.
- (7) Li, W. J., Laurencin, C. T., Catterson, E. J., 2002, "Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering", *J. Biomed. Mater. Res.*, Vol. 60(4), pp. 613-621.
- (8) Flemming, R. G., Murphy, C. J., Abrams, G. A., Goodman, S. L. and Nealey, P. F., 1999 "Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior", *Biomaterials*, Vol. 20, pp. 573-588.
- (9) Oh, S. H., Kang, S. G., Kim, E. S., Cho, S. H. and Lee, J. H., 2003, "Fabrication and characterization of hydrophilic poly(lactic-co-glycolic acid) / poly(vinyl alcohol) blend cell scaffold by melt-molding particulate-leaching method," *Biomaterials*, Vol. 24, pp. 4011-4021.
- (10) Buchko, C. J., Chen, L. C., Shen, Y. and Dartin, D. C., 1999. "Processing and microstructural characterization porous biocompatible protein polymer thin film", *Polymer*, Vol. 40, pp. 7397-7407.
- (11) Kim, J. S. and Reneker, D. H., 1999, "Polybenzimidazole nanofiber produced by Electrospinning", *Polymer Eng. & Sci.*, Vol. 39, pp. 849-854.
- (12) Ara, M., Watanabe, M. and Imai, Y., 2002, "Effect of blending calcium compounds on hydrolytic degradation of poly(DL-lactic acid-co-glycolic acid). *Biomaterials*," Vol. 23, pp. 2479-2483.