

# 조직공학용 3차원 나노섬유 지지체의 제조 및 생물학적 특성 평가

박영환

서울대학교 바이오시스템·소재학부

## Preparation and Biological Properties of Three-dimensional Nanofibrous Scaffold for Tissue Engineering

Young Hwan Park

Department of Biosystems and Biomaterials Science and Engineering,  
Seoul National University, Seoul, Korea

### 1. 서론

전기방사에 의해 제조된 나노섬유 집합체는 구조적으로 세포의 기질(extracellular matrix)와 유사하고 큰 표면적을 제공할 수 있기 때문에 조직공학용 지지체(scaffold)로의 응용 가능성이 큰 소재이다. 그러나 대부분의 경우 2차원 부직포 형태로 제조되는 나노섬유 집합체는 섬유 사이의 공극의 크기가 매우 작고 입체적인 형태로 제조할 수 없기 때문에 3차원적인 조직을 배양하는 데에 어려움이 따른다. 따라서 실질적인 응용에 있어서 기존의 나노섬유 지지체는 큰 한계를 지니고 있다.

본 연구에서는 전기방사법을 기본으로 새로운 방법의 공정을 도입하여 나노섬유를 3차원 입체 구조로 제조하고 특정 세포 배양에 적합한 공극 구조가 부여된 지지체를 제조할 수 있었다. 또한 다양한 세포를 이용한 배양 실험 및 동물 실험을 통하여 3차원 나노섬유 지지체의 응용 가능성을 평가하고 활용 방안을 모색해 보았다.

### 2. 실험재료 및 방법

#### 2.1. 재료준비

정련 공정을 통해 가잠 고치의 세리신을 제거하고 얻은 피브로인을  $\text{CaCl}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$  혼합용매에 용해한 후 투석을 통하여 실크 피브로인 수용액을 얻었다. 수용액을 동결건조하여 재생 실크 피브로인 스펀지를 얻었다. 양모 슬라이버를 유기용매를 이용하여 표면의 지질을 제거하고 과포름산을 사용하여 산화시켰다. 용해된 부분을 여과하여 얻고 건조 후 양모 케라토즈 필름을 얻을 수 있었다.

#### 2.2. 3차원 나노섬유 지지체의 제조

실크 피브로인 및 양모 케라토즈 블렌드 방사원액을 제조하기 위해 적정 농도로 실크 피브로인 및 양모 케라토즈를 포름산에 용해하였다. 방사원액을 10 ml 주사기에 담고 직류전원공급장치를 이용하여 10-18 kV의 전압을 인가하였다. 방사된 나노섬유를 용고육을 이용하여 수집하여 나노섬유 분산을 얻은 후 공극을 형성하기 위해 다양한 크기의 염화나트륨 입자를 첨가하였다. 이후 나노섬유 분산을 특정한 크기와 형태의 용기에 담고 동결건조하여 3차원 나노섬유 지지체를 제조할 수 있었다.

#### 2.3. 지지체 특성 및 세포 배양

다양한 제조 조건에 따라 제조된 3차원 나노섬유 지지체를 구성하는 나노섬유 형태학적 구조를 관찰하였으며 지지체의 공극도 및 공극 크기, 기계적 성질 등을 측정하였다. 지지체로써의 세포 배양능

을 평가하기 위해 다양한 종류의 세포를 지지체에 배양하여 세포 종류에 따른 지지체의 적합성을 평가하였다. 또한 체내에서 지지체의 역할 및 성능을 살펴보기 위하여 실험용 쥐에 이식 후 조직의 재생 과정을 살펴보았다.

### 3. 결과 및 고찰

제조된 3차원 나노섬유 지지체를 구성하고 있는 실크 피브로인 및 블렌드 나노섬유는 200-600 nm 범위의 단면 지름을 지니고 있는 것으로 나타났다. 3차원 지지체의 나노섬유는 부직포 형태의 그것과 비교해서 섬유 사이의 간격이 넓고 입체적으로 얽혀 있는 채로 구성되어 있는 것을 알 수 있었다. 지지체의 공극도는 90-95% 범위의 값을 나타내었고 공극의 크기는 나노섬유 분산에 첨가한 염화나트륨 입자의 크기에 따라 10~1,000  $\mu\text{m}$  범위에서 조절할 수 있었다. 지지체의 압축 강도는 공극도와 공극의 크기가 증가할수록 감소하는 경향을 나타내었다.

다양한 세포를 이용하여 세포 증식능을 평가한 결과 3차원 나노섬유 지지체는 2차원 지지체의 경우 보다 동일한 시간 동안 배양했을 때 세포의 양이 상대적으로 많은 것으로 관찰되었다. 이와 같은 결과는 3차원 나노섬유 지지체가 더 많은 세포 부착(adhesion) 면적을 지니고 있을 뿐만 아니라 세포가 증식할 때 입체적으로 퍼지며 증식할 수 있는 공간을 지니고 있기 때문으로 생각된다. 실크 3차원 나노섬유 지지체는 다양한 세포에 대해 우수한 적합성을 나타내었다. 나노섬유의 구조적 특징, 즉 큰 표면적이 세포와 기질(substrate)과의 유착에 효과적으로 작용하고 있는 것으로 생각된다. 이는 나노섬유에 부착된 세포에서 관찰되는 세포 유착에 관련된 단백질을 검출한 결과에서도 3차원 나노섬유의 경우 세포 유착이 강하게 일어나고 있음을 알 수 있었다. 또한 대부분의 경우에 모든 세포 종류에서 지속적인 세포 증식이 관찰되었다.

특히 실크 나노섬유 지지체는 골아세포(osteoblast)와 연골세포(chondrocyte)에 대해 상대적으로 우수한 세포 배양능을 지니고 있음을 알 수 있었다. 양모 케라토지를 혼합하여 제조한 블렌드 나노섬유 지지체의 경우에는 그 효과가 더욱 크게 나타났다. 상대적으로 친수성이 큰 양모 케라토지가 혼합되어 전체적인 지지체의 친수성이 증가되어 세포 부착 및 증식이 우월하게 진행된 것으로 생각된다.

또한 블렌드 지지체에 배양된 연골세포의 활성이 실크 피브로인 나노섬유 지지체에 배양된 경우에 비해 크게 나타났다. 동일한 세포 수일 때 연골세포가 생성하는 Glycosaminoglycan (GAG)의 양이 훨씬 큰 것으로 측정되었는데 이는 양모 케라토지의 큰 친수성과 더불어 양모 케라토지가 함유하고 있는 특정한 아미노산 서열이 세포의 생리작용에 영향을 미친 것으로 생각된다.

동물실험을 통해 실크 피브로인 3차원 나노섬유 지지체의 생체적합성을 평가하고자 실험용 쥐의 두개골을 천공하고 빈 공간을 지지체로 채워 골조직의 재생 여부를 확인하였다. 그 결과 배양 기간 동안 우려할만한 면역 및 염증 반응은 관찰되지 않았으며 지지체 이식 후 시간이 경과함에 따라 골조직이 주변 정상 조직으로부터 지지체 내부로 재생되어 빈 공간을 채우고 있음을 확인하였다. 공극도 및 공극의 크기가 큰 경우에 그렇지 않은 경우와 비교하여 조직이 잘 재생됨을 알 수 있었다. 따라서 3차원 나노섬유 지지체를 제조함에 있어서 공극도를 적절히 조절하는 것이 매우 중요한 요소임을 확인하였다. 또한 3주간 배양 후 실크 피브로인 나노섬유 지지체를 이식한 실험군 중 일부에서 외견상 지지체의 모습이 사라진 것을 확인하였다. 재생과정을 거쳐 제조된 실크 피브로인 나노섬유는 천연의 실크와 비교해서 낮은 분자량과 결정화도, 큰 표면적으로 인해 상대적으로 체내에서 가수분해가 빠른 속도로 진행되는 것으로 생각된다. 지지체의 생분해성은 조직의 재생에 매우 중요한 성질이다. 조직이 재생됨에 따라 적절한 속도로 분해가 되어 재생되는 조직이 차지할 수 있는 공간이 확보되어야만 원활하게 조직이 복구될 수 있기 때문이다. 이러한 관점에서 3차원 나노섬유 지지체는 골조직에 대해 우수한 조직공학용 지지체로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

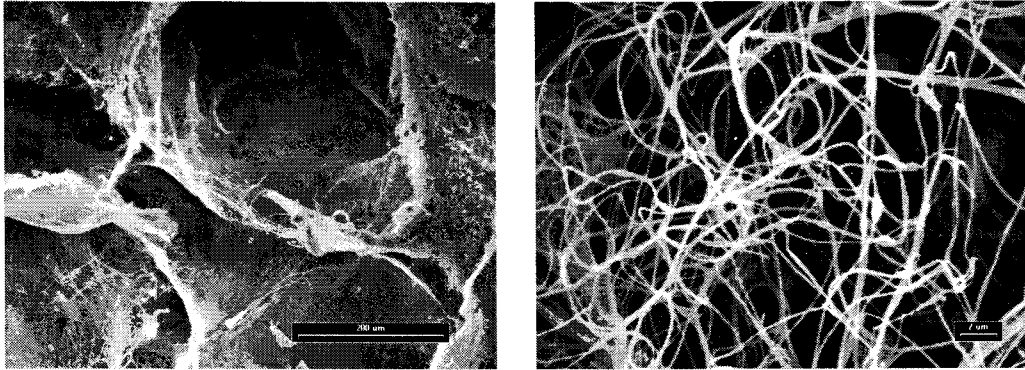
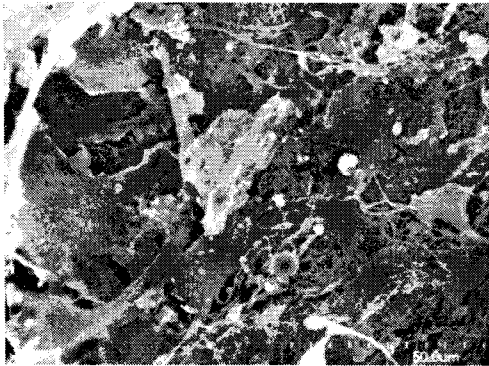
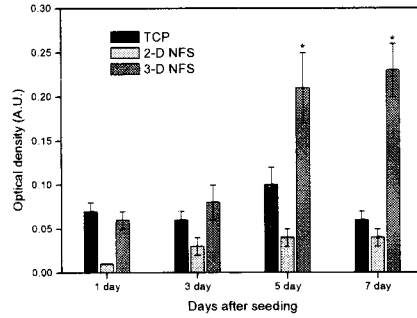


Fig. 1. 3차원 실크 나노섬유 지지체의 형태학적 구조.



(a)



(b)

Fig. 2. 3차원 실크 나노섬유 지지체에 증식하고 있는 MC3T3-E1 모습(배양 30일 후) (a) 및 배양일수에 따른 세포 증식량 변화 (b).

#### 4. 결론

3차원 나노섬유 지지체는 동결건조나 상분리법에 의해 제조된 스펀지 형 지지체에 비해 넓은 표면적을 지닐 뿐만 아니라 섬유 사이에 존재하는 무수한 간극에 의해 영양분 및 기체의 교환이 활발하게 일어나서 세포 배양에 유리하다. 또한 기존 전기방사법에 의해 제조된 2차원 형태의 나노섬유 부직포와 비교하여서도 입체적인 조직을 배양할 수 있다는 점에서 보다 조직공학용 지지체로서 적합하다고 생각된다. 실크 피브로인 및 양모 케라토즈 블렌드 나노섬유 지지체는 전반적으로 다양한 세포에 대한 적합성을 지니고 있어 범용적으로 사용할 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 골세포 및 연골세포에 대해 더욱 우수한 결과를 나타내었고 따라서 이들 세포 및 관련 조직에 대한 적합성이 상대적으로 우월한 것으로 생각되며 골조직 및 연골조직 재생을 위한 나노섬유 지지체 개발을 위해 이후 보다 구체적인 실질적인 응용 연구가 요구된다.

#### 감사의 글

이 연구는 한국과학재단의 SRC/ERC 프로그램(R11-2005-065)의 재정적 지원 하에 이루어졌음을 밝힙니다.

## 5. 참고 문헌

1. H. J. Jin, J. Chen, V. Karageorgiou, G. H. Altman, D. L. Kaplan, *Biomaterials*, **25**, 1039-1047 (2004).
2. B. M. Min, G. Lee, S. H. Kim, Y. S. Nam, T. S. Lee, W. H. Park, *Biomaterials*, **25**, 1289-1297 (2004).
3. C. S. Ki, J. W. Kim, J. H. Hyun, K. H. Lee, M. Hattori, D. K. Rah, Y. H. Park, *J Appl Polym Sci*, **106**, 3922-3928 (2007).
4. K. Azuma, M. Tanaka, T. Uekita, S. Inoue, J. Yokota, T. Ouchi, R. Sakai, *Oncogene*, **24**, 4754-4764 (2005).
5. I. Delon, N. H. Brown, *Curr Opin Cell Biol*, **19**, 43-50 (2007).
6. X. Liu, P. X. Ma, *Ann Biomed Eng*, **32**, 477-486 (2004).
7. D. D. Schlaepfer, S. K. Hanks, T. Hunter, P. Vandergeer, *Nature*, **372**, 786-791 (1994).