

◆특집◆ 기능성 생체 재료의 제작 및 응용

조직공학을 위한 생체고분자 임프린팅 기술

김필남\*, 서갑양\*

Imprinting Technology of Biopolymers for Tissue Engineering

Pilnam Kim\* and Kahp-Yang Suh\*

**Key Words:** Imprinting (임프린팅), Biopolymers (생체고분자), Tissue Engineering (생체공학), Scaffold (스캐폴드)

1. 서론

조직공학은 생체 내의 특정한 세포를 추출하여 실험실 조건 하에서 배양하고, 궁극적으로 유용한 조직이나 장기로 분화시켜 필요한 사람에게 공급해주는 역할을 한다. 이때 외부의 배양 조건을 생체 내부(in vitro)와 동일하게 해 주는 것이 가장 중요한 요건이다. 보통 사용되는 배양 조건은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 를 유지해 주면서 세포의 대사에 필요한 양분이 포함된 배지로 배양을 하는 것이다. 이외에도 생체와 비슷한 기계적 물성과 기하학적 형상을 가지고 있는 고분자 스캐폴드를 사용하는 것도 매우 중요하다. 이번 논문에서는 대표적으로 많이 사용하는 생체고분자인 폴리에틸렌 글리콜(Polyethylene Glycol, PEG) 고분자와 임프린팅 방법을 이용하여 박막 형태의 3 차원 형상을 지닌 고분자 스캐폴드를 제작하는 방법을 살펴보고, 이러한 스캐폴드가 세포의 배양과 활성에 어떠한 영향을 끼치는지 간단히 고찰하고자 한다. 사용한 세포는 쥐의 심장세포이며 세포의 성장을 전자현미경으로 관찰하였고 전기적 활성은 패치클램프를

통한 전기화학 포텐셜을 측정하였다.

폴리에틸렌 글리콜(이하 PEG)는 중성을 띠는 선형 혹은 사슬형 고분자로서 양 끝단에 수산화기(-OH)가 포함된 고분자이다. PEG 는 미국식약청(FDA)의 허가를 받은 대표적인 고분자라고 생체 내에서 독성이 없고 면역 반응 및 항원 반응을 일으키지 않는다.<sup>1,2</sup>

PEG 고분자는 오래 전부터 재생 및 치료를 위한 세포 배양용 스캐폴드로 널리 사용한 하이드로젤이다. 그 응용분야만 해도 연골, 뼈, 혈관 등 다양하다.<sup>3-5</sup> 사용되는 PEG 의 종류는 자외선에 경화 되는 PEG diacrylate (PEG-DA), PEG dimethacrylate (PEG-DMA), star PEG multiple acrylate 등이 있으며 이외에도 생분해성 하이드로젤도 있다.<sup>6-8</sup> 이렇게 PEG 가 광범위하게 사용되는 이유는 기계적 물성이 적당하며 생체 내부와 같이 물이 있는 환경에서 물을 흡수, 팽창하여 생체 내부의 부드러운 조직과 비슷해 지며, 결과적으로 양분이나 세포의 배설물 등을 쉽게 확산시켜주기 때문이다.<sup>9</sup>

최근 연구를 통해 스캐폴드로 사용하는 물질 이외에도 나노 스케일로 표면 형상을 조절하는 것이 매우 중요함을 알게 되었다. 전자현미경 사진으로 많은 조직의 연결 부위를 찍게 되면 나노미터 수준의 기공이나 섬유구조, 라인 구조 등이 발견되며,<sup>10</sup> 특히 세포와 세포를 연결시켜 주는 extra cellular matrix (ECM) 물질에서 가장 풍부한 콜라겐의 경우 약 66nm 정도의 규칙적인

\* 서울대학교 기계항공공학부  
Tel. 02-880-9103, Fax. 02-883-0179  
Email sky4u@snu.ac.kr  
나노구조를 경제적이고 신속하게 대면적으로 제작하여 조직공학, 바이오소자, 디스플레이 소자에 응용하려는 연구를 하고 있다.

구조를 가진 미세섬유의 다발로 형성됨을 최근 발견하였다.<sup>11</sup> 이 외에도 세포가 기관과 달라붙게 되는 단위 접촉의 크기가 대략 50nm 수준이므로 만약 표면의 형상을 나노스케일로 조절할 수 있게 된다면 단위 세포의 접촉 및 나아가 세포의 군집체인 조직 및 장기의 성장과 기능성을 최적화시킬 수 있게 된다. 최근 이러한 일련의 학문을 조직공학과 차별화하여 세포공학(cell engineering)이라 통칭하여 부르고 있으며, 지금까지 조직공학이 겪은 수많은 시행착오를 통해 볼 때 세포공학의 중요성이 점차 중요해질 것으로 예상된다.

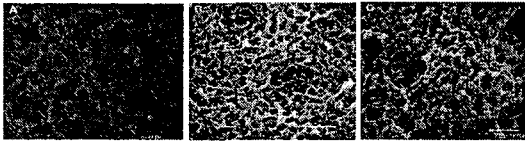


Fig.1 SEM images of regular nanostructures (20-200nm) that are found in basement membrane, a connective tissue between the adjacent cells

## 2. 실험 방법 및 결과 고찰

### 2.1 실험 방법

실험 방법이 아래의 fig. 2 에 개략적으로 나와 있다. 실험에 사용한 고분자는 자외선에 경화되는 단위분자량 550 를 갖는 PEG dimethacrylate (PEG-DMA)이고, 나노패턴을 갖고 있는 polyurethane acrylate (PUA) 몰드를 사용하였다. 자세한 실험 과정은 문헌에 나와 있다.<sup>12</sup> 그림에서 알 수 있듯이 몰드가 경화되기 전 상태의 PEG 고분자와 접촉을 하면 모세관 현상에 의해 빨려 올라가고 자외선을 수 분 정도 쬐이면 경화가 되어 몰드와 상보적인 구조가 유리 기판 위에 형성된다. 결과적으로 형성된 구조는 밀면의 지름이 150 nm, 꼭대기가 50 nm, 높이가 400 nm 정도인 원뿔 형태의 나노 필라 구조물이다. SEM 과 AFM 으로 정밀 측정을 해 보면 원래의 PUA 몰드와 정확히 동일한 구조를 가지고 있음을 확인할 수 있다. fig. 3 은 이러한 임프린팅 방법으로 제조한 나노구조를 보여준다.

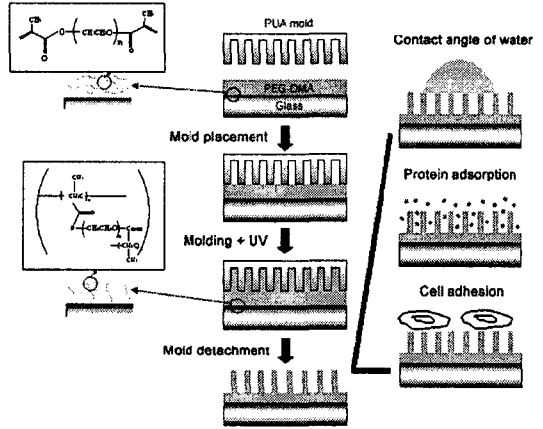


Fig.2 A schematic diagram of the experimental procedure. Initially, a uniform PEG-DMA film is prepared by drop dispensing followed by the placement of a PUA mold and then patterned by capillary lithography mediated by UV crosslinking

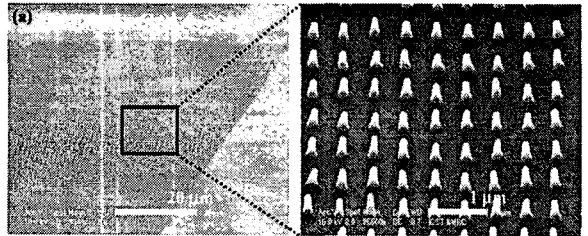


Fig.3 SEM images of uniform PEG nanopillars for protein adsorption and cell adhesion study: (a) a large area view showing both patterned dark (box) and non-patterned light regions and (b) a magnified view of individual nanopillars within the boxed area. The diameter of a nanopillar is about 150 nm at base and about 50 nm at top and aspect ratio is about 2.5

### 2.2 실험 결과

#### 2.2.1 표면 접촉각 측정

제작된 박막형 스펙폴드의 표면 성질을 파악하기 위해 먼저 물의 접촉각을 측정하였다. 유리 기판에서는 약 10°, 나노 구조가 없는 PEG 기판에서는 20 ~ 25° 정도로 예상한 대로 친수성의 특징을 나타내었다. PEG 는 수산화기(-OH)가 풍부하여 보통 친수성을 나타낸다. 하지만 나노구조가 있는 PEG 의 경우 접촉각이 무려 90~100 로 급

격하게 상승하였고 이 결과를 fig. 4 에 나타내었다. 이러한 접촉각 증가는 연꽃잎 표면에 있는 계층적 마이크로/나노 구조에서도 나타나는 “Cassie 상태” 에 기인하며 간단하게 설명하면 나노구조 사이에 공기가 갇혀 표면이 소수성으로 변하는 것이다. 이렇게 소수성으로 변한 표면은 세포가 잘 달라붙을 수 있는 환경을 제공하게 된다.

기존의 이론을 가지고 접촉각의 증가를 설명할 수 있는데 물방울이 나노구조와 접촉하는 분율을  $f_1$ , 공기와 접촉하는 분율을  $f_2$  라 하면

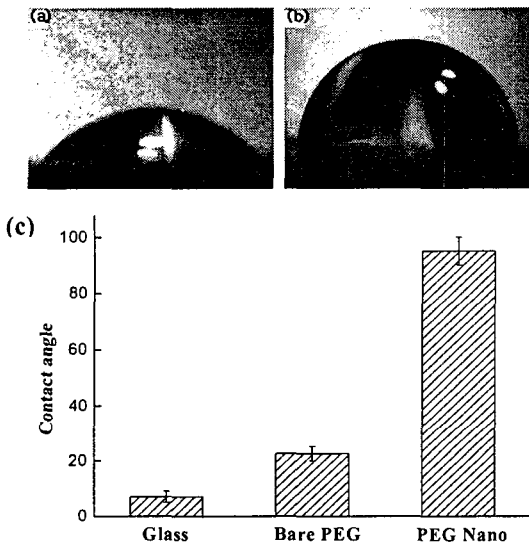


Fig. 4 Measurements of contact angle of water on (a) a bare PEG surface (~ 22.5°) and (b) a PEG nanostructure (~ 95°). (c) Contact angles on the three different surfaces

( $f_1 + f_2 = 1$ ), 나노구조가 있는 표면에서의 접촉각  $\theta_1$ 은 다음과 같은 선형식으로 주어진다.<sup>12</sup>

$$\cos \theta_1 = f_1 \cos \theta - f_2 \quad (1)$$

여기서  $\theta$ 는 나노구조가 없을 때 PEG 표면 위에서의 접촉각이다. 실험에서 측정된  $f_1 = 0.07$ ,  $f_2 = 0.93$ ,  $\theta = 22.5^\circ$  을 대입하면  $\theta_1$  은 약  $149^\circ$ 가 되는데 이는 실제로 측정된 값( $\theta_1 \sim 95^\circ$ )보다 매우 작은 값이며 아마도 PEG 의 평창에 의한 차이가 아닌가 판단된다.

### 2.2.2 단백질/세포 흡착 분석

스캐폴드의 구조적인 특성을 파악한 다음 단백질 흡착 실험을 하였다. 이렇게 단백질을 흡착 시키는 이유는 세포가 반드시 표면에 있는 collagen, fibronectin, laminin 등의 ECM 단백질을 인식하여 붙기 때문이다. 이번 연구에서는 단백질의 흡착 정도를 파악하기 위해 rhodamine 이 붙은 bovine serum albumin (BSA), fibronectin (FN), 그리고 rhodamine 이 붙은 immunoglobulin (IgG)를 이용하여 유리 기판, 나노구조가 없는 PEG 기판, 나노구조가 있는 PEG 기판에 각각 흡착 실험을 하였다. 여기서 FN 의 경우는 형광을 파악하기 위해 2 차의 항체로 다시 염색해야 한다. 구체적인 과정은 문헌에서 찾을 수 있다.<sup>12</sup>

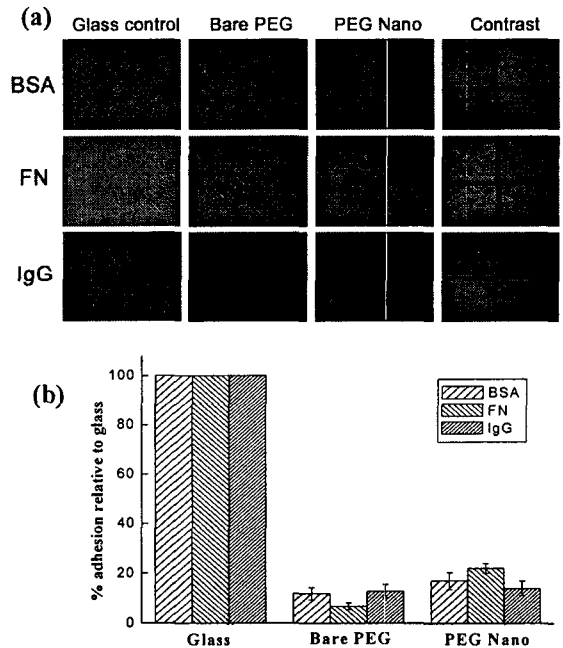


Fig.5 (a) Fluorescent micrographs of rhodamine-BSA, FN, rhodamine-IgG on the surfaces of glass, bare PEG, and PEG nanostructure (contrast enhancement included). The nanostructures are located within the boxes. (b) The graph summarizes the protein adsorption on the three different surfaces. The intensities were normalized using the glass control (100 %). Note that the intensity was slightly increased on the nanostructure by 1.2 to 3 times depending on the type of protein

2.2.3 세포 접착 및 활성화 분석

앞의 실험 결과에서 알 수 있듯이 나노 필라 구조가 있는 경우 1.2 배에서 3 배까지 단백질 흡착이 증가함을 알 수 있다. 나노 구조가 있으면 표면적이 늘어나게 되므로 간단하게 면적 증가의 효과로 볼 수 있으나, 나노 구조는 단순히 단백질 흡착 정도를 증가시키는 것 외에 세포가 표면에 고착이 잘 되도록 돕는 역할을 한다. 쥐의 심장세포를 이용하여 4 일이 지난 후 각각의 표면에 붙은 세포의 형상을 측정하면 fig. 6 와 같다. fig. 6a 에서 보듯이 보통 유리 기판에서 세포를 키우면 납작하게 성장하면서 2 차원적인 네트워크를 형성한다. 이에 비해 나노구조가 없는 PEG 기판에 키우면 세포가 약간 볼록한 형태로 자라며 세포 간의 네트워크도 매우 불량함을 알 수 있다 (fig. 6b).

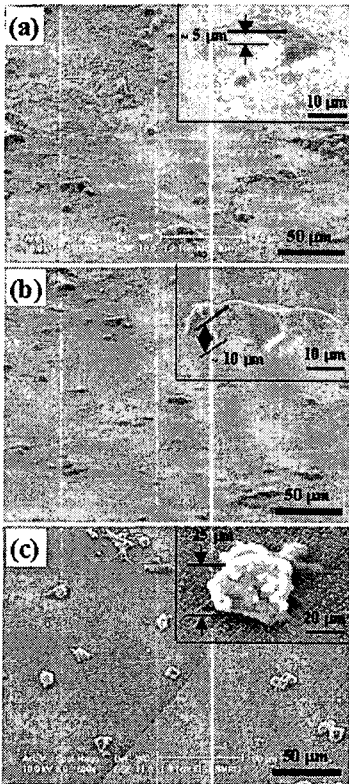


Fig.6 SEM images of aggregated cardiomyocytes cultured on (a) the glass coverslip, (b) the bare PEG surface and (c) the PEG nanopillars

실제로 심장세포는 4 일 정도 지나면 서로 연동

하여 고동을 하게 되는데 나노구조가 없는 PEG 패턴 위에서 키운 세포는 고동을 전혀 관찰할 수 없다. 이에 비하여 나노 구조가 있는 PEG 기판의 경우 세포가 공 형태의 3 차원 형상을 지닌 것을 알 수 있고 눈에 덜 정도의 고동을 관찰할 수 있게 된다 (fig. 6c).<sup>13</sup>

마지막으로 세포의 활성도를 측정하기 위해 패치클램프 방법을 이용하였다. fig. 7 에 나와 있듯이 전체적인 개형이나 반너비, 상승 시간 상수, 소멸 시간 상수 등은 매우 유사하나 활동전위의 크기는 PEG 나노 구조가 있는 기판에서 키운 심장 세포에서 크게 나타남을 볼 수 있다. 이러한 결과는 3 차원적으로 자란 심장세포가 일반 기판보다 훨씬 활동성이 좋고 잠재적으로 조직 공학에 적용될 수 있는 가능성이 높음을 보여준다.<sup>13</sup>

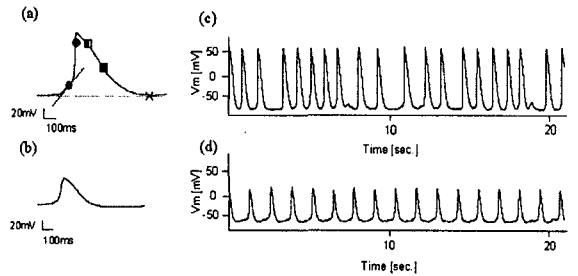


Fig. 7 Electric properties of rat cardiomyocytes cultured on nanopillars. Average trace of an action potential recorded on (a) the PEG nanostructured substrate (646 action potentials from 10 cells) and (b) the glass control (658 action potentials from 6 cells) using whole-cell patch-clamp technique (scale bars: 20mV/100ms). Representative trace of action potentials recorded on (c) the PEG nanostructured substrate and (d) the glass control (scale bars: 20mV/2seconds)

3. 결론

이번 연구에서는 임프린팅 방법을 이용하여 대표적인 생체고분자인 PEG 표면에 나노형상을 제작할 수 있고 이를 통해 세포의 접착과 성장, 활성도를 조절할 수 있음을 보였다. 제작된 박막 형태의 PEG 스캐폴드는 물과 접촉하였을 때 팽창되지만 적어도 2 주 정도 안정함을 보여주었으며 단백질의 흡착을 1.2 배내지 3 배까지 증가시킬 수

있음을 발견하였다. 또한 쥐의 심장세포를 배양하였을 때 유리 기판이나 나노 구조가 없는 PEG 기판에 비해 세포의 성장을 3 차원적으로 유도하였으며 결과적으로 세포의 활동 전위를 상승시켰다. 이러한 사실을 바탕으로 좀더 PEG 고분자의 구조를 최적화시키고 고밀도로 세포를 배양시킬 경우 심장 이식이나 치료 등의 조직공학에 응용될 수 있을 것으로 예상된다.

### 후 기

본 연구는 서울대학교의 마이크로 열 시스템 연구 센터의 지원으로 수행되었습니다.

### 참고문헌

- Hubbell, J. A., "Bioactive biomaterials," *Current Opinion in Biotechnology*, Vol.10, No. 2, pp.123-129, 1999.
- Langer, R. and Peppas, N. A., "Advances in biomaterials, drug delivery and bionanotechnology," *AICHE Journal*, Vol.49, No. 12, pp.2990-3006, 2003.
- Hoffman, A. S., "Hydrogels for biomedical applications," *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol.54, No. 1, pp.3-12, 2002.
- Halstenberg, S., Panitch, A., Rizzi, S., Hall, H. and Hubbell, J. A., "Biologically engineered protein-graft-poly(ethylene glycol) hydrogels: A cell adhesive and plasm in-degradable biosynthetic material for tissue repair," *Biomacromolecules*, Vol.3, No. 4, pp.710-723, 2002.
- Bryant, S. J., Durand, K. L. and Anseth, K. S., "Manipulations in hydrogel chemistry control photoencapsulated chondrocyte behavior and their extracellular matrix production," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 67A, No. 4, pp.1430-1436, 2003.
- Han, D. K. and Hubbell, J. A., "Synthesis of polymer network scaffolds from L-lactide and poly(ethylene glycol) and their interaction with cells," *Macromolecules*, Vol.30, No. 20, pp.6077-6083, 1997.
- Keys, K. B., Andreopoulos, F. M. and Peppas, N. A., "Poly(ethylene glycol) star polymer hydrogels," *Macromolecules*, Vol.31, No. 23, pp.8149-8156, 1998.
- Mann, B. K., Gobin, A. S., Tsai, A. T., Schmedlen, R. H. and West, J. L., "Smooth muscle cell growth in photopolymerized hydrogels with cell adhesive and proteolytically degradable domains: synthetic ECM analogs for tissue engineering," *Biomaterials*, Vol.22, No. 4, pp.3045-3051, 2001.
- Watkins, A. W. and Anseth, K. S., "Investigation of molecular transport and distributions in poly(ethylene glycol) hydrogels with confocal laser scanning microscopy," *Macromolecules*, Vol.38, No. 4, pp.1326-1334, 2005.
- Abrams, G. A., Goodman, S. L., Nealey, P. F., Franco, M. and Murphy, C. J., "Nanoscale topography of the basement membrane underlying the corneal epithelium of the rhesus macaque," *Cell and Tissue Research*, Vol.299, No. 1, pp.39-46, 2000.
- Curtis, A. and Wilkinson, C., "Nanotechniques and approaches in biotechnology," *Trends in Biotechnology*, Vol.19, No. 3, pp.97-101, 2001.
- Kim, P., Kim, D. H., Kim, B., Choi, S. K., Khademhosseini, A., Langer, R. and Suh, K. Y., "Fabrication of nanostructures of polyethylene glycol for applications to protein adsorption and cell adhesion," *Nanotechnology*, Vol.16, No. 10, pp.2420-2426, 2005.
- Kim, D. H., Kim, P., Song, I., Cha, J. M., Lee, S. H., Kim, B. and Suh, K. Y., "Guided three-dimensional growth of functional cardiomyocytes on polyethylene glycol nanostructures," *Langmuir*, Vol.22, No. 12, pp.5419-5426, 2006.