

◆특집◆ 산학연계형 선도산업기술

생체조직공학적 응용을 위한 폴리감마글루탐산 다공성 지지체의 제조

전현애*, 이승욱*, 권오형*,#

(#,* 금오공과대학교 고분자공학과)

Fabrication of Poly(γ -glutamic acid) Porous Scaffold for Tissue Engineering Applications

Hyeon Ae Jeon*, Seung Wook Lee*, Oh Hyeong Kwon*#

(Received 9 June 2014; accepted 27 June 2014)

ABSTRACT

Poly(γ -glutamic acid) (g-PGA) is a very promising biodegradable polymer that is produced by microorganism of *Bacillus subtilis*. Because g-PGA is water-soluble, anionic, biodegradable, and even edible, its potential applications have been studied from an industrial standpoint. In this study, we fabricated porous g-PGA foams by means of a freeze-solvent extraction method for tissue-engineering applications. Porous g-PGA foams were chemically cross-linked using a hexamethylene diisocyanate solution. An aqueous basic solution was used to neutralize g-PGA foam for cell culturing. During an *in vitro* cell culture study, it was observed that primary rabbit ear chondrocytes were well attached and spread over the surface of three-dimensional cross-linked g-PGA foam. From these results, it is concluded that cross-linked g-PGA foam is a promising material for tissue-engineering applications, especially those pertaining to the regeneration of human cartilage.

Key Words : Poly(γ -glutamic acid)(폴리감마글루탐산), Porous Scaffold(다공성 지지체), Freeze-Solvent Extraction method(동결-용매추출법), Tissue Engineering(생체조직공학), Chondrocyte(연골세포)

1. 서 론

생체조직공학의 성공적인 개발을 위해서는 체 내에서 분리된 조직세포를 체외에서 삼차원구조를 가진 조직의 형태로 재구성하기 위한 지지체가 필수적인 요소이다.^[1,2] 이를 위하여 종래에는 정형화되어 있지 않은 손상된 조직에 직접 주입하여 쉽게 성형화 할 수 있다는 장점 때문에 기능성 장기 조직이나 췌장세포를 칼슘-알지네이트 등의 하이드로젤에 고정화하여 체내에 이식하는 방법을 취

* Department of Polymer Science and Engineering,
Kumoh National Institute of Technology

Corresponding Author :

Department of Polymer Science and Engineering,
Kumoh National Institute of Technology

E-mail : ohkwon@kumoh.ac.kr

하여 왔으나 기계적 안정성이 약하여 뼈나 연골과 같이 하중을 받는 조직 등에는 사용할 수 없다는 단점을 가지고 있다.^[3,4]

최근에는 생체적합성의 생분해성 고분자를 사용하여 스펀지형태의 다공성 지지체(porous scaffold)를 제조하여 조직 세포를 지지체에 포집하여 삼차원 구조의 세포/지지체 복합체를 체내에 이식하고자 하는 연구가 진행되고 있다.[1,2] 이렇게 생체분해성 다공성 지지체를 사용하여 만든 삼차원의 인공 조직을 체내에 이식할 시 예상되는 장점은 체내 이식 초기에는 이식된 조직 세포들이 신체내에서 사멸하지 않고 본래의 기능을 유지하는 기반을 제공하고, 형태의 다양성에 있어서는 약간의 제약이 있지만 기계적 안정성과 세포의 부착과 조직 재생의 측면에서 커다란 이점들이 있다. 그리고 시간이 경과함에 따라서 생분해성 고분자는 점차 소멸하고 신체 내부에 충분히 적응한 이식 세포만으로 구성된 자연 조직과 동일한 형태와 기능을 지닌 인공 조직을 형성할 수 있게 된다.

조직공학용 지지체의 기준으로 가장 고려해야 할 요소 중의 하나로서 재료의 선택에 있다. 일반적으로 조직공학용 재료로는 천연고분자, 합성고분자, 세라믹, 금속, 그리고 이들 복합체를 포함한다. 금속 재료는 정형외과용 이식 재료로 100여년 전부터 널리 사용되어 왔지만, 생분해성이 없다는 점과 가공성이 취약하다는 점에서 조직공학용 재료로서 부적합하다. 이러한 이유 때문에 천연 및 합성 고분자가 조직공학용 재료로서 주목을 받게 되었다.

천연 고분자로서는 콜라겐, 키토산 등이 신경, 피부, 연골, 뼈의 재생 연구를 위한 조직공학용 재료로 널리 사용되어 왔다.^[5-7] 이들 천연 고분자는 주로 생체 조직에 존재하기 때문에 생체 환경과 가장 친화적이라는 장점이 있지만, 생체로부터 직접 추출해야 한다는 대량생산의 제약성 때문에 광범위한 사용이 불가능하다는 단점과 기계적인 물성이 약하다는 단점을 가지고 있다.

생분해성 고분자를 간, 연골, 뼈 등의 생체조직 재생용 재료로 사용하여야 하는 경우, 재료의 생분해성, 생체적합성 이외에도, 각각 hepatocytes,

chondrocytes, osteoblasts의 점착과 분화가 원활히 이루어질 수 있는 최대의 공극률과 상호연결성이 우수한 공극 구조를 지닌 다공성의 삼차원 고분자 지지체의 제조가 필요하다. 이는 세포의 점착에 필요한 표면적을 제공할 뿐만 아니라 세포외기질의 재생을 위한 공간의 확보, 그리고 체외 배양에서 원활한 산소와 영양소의 공급과 같은 효과적인 물질전달을 위하여 필요하다.

일정 수준의 기계적 강도를 유지하도록 일정 범위의 크기를 갖는 공극이 골고루 분포하는 구조의 다공성 지지체가 바람직하며 이러한 다공성 지지체의 공극율과 공극의 크기는 조직 세포의 공극 내부로의 침투와 성장에 큰 영향을 미친다. 뼈의 재생의 경우 조직의 침투는 지름 150 μm 이상의 공극에서 일어나는 것으로 알려져 있다. 더욱이 생체이식시 조직의 재생에 필요 불가결한 혈관의 형성 (vascularization)도 공극의 크기에 따라 영향을 받는다.

종래 다공성 지지체를 제조하는 기술로는 섬유형태로 기공이 형성된 파이버 메쉬(fiber mesh), 전기방사(electrospinning)와 스펀지 형태로 기공이 형성된 포로젠 리칭(porogen leaching), CO₂의 포화/제거법, 3D 프린팅(3D-printing), 상분리(phase separation) 등이 알려져 있다.^[8-11] 본 연구에서 사용된 방법은 상분리의 일종으로 용매추출법을 사용하였다. 용매추출법은 동결건조법에 비해 시간과 에너지가 절약될 뿐 아니라 물이 아닌 유기용매를 이용할 수 있는 장점이 있다. 용매추출법은 어느점이 높은 용매에 고분자를 녹인 후 용액을 일린 다음 용질은 용해되지 않고 용매만 용해되는 제 3의 용매를 사용하여 녹여냄으로써 용매가 녹아나온 부분에 기공이 형성되는 방법이다.

폴리감마글루탐산은 D, L-글루탐산이 감마결합으로 연결된 중합체인 점액성 물질로서, 바실러스 속 균주로부터 생산되는 폴리감마글루탐산은 식용, 수용성, 음이온성, 생분해성 고분자물질로 흡습제, 보습제 및 화장품의 원료, 에스테르 유도체의 합성에 의한 자연분해성 플라스틱의 제조를 위한 소재 물질로 이용이 가능하며, 분해되어 생성되는 물질이 글루탐산으로 체내에서도 거부반응이 없어 조직공학용 지지체로도 이용할 수 있

다.^[12-14]

본 연구에서는 이러한 폴리감마글루탐산을 이용하여 삼차원적인 가교된 다공성 폼을 제조한 다음 토끼의 귀로부터 채취한 연골세포를 배양하여 연골조직재생용 지지체로서의 가능성을 조사하고자 하였다.

2. 실험

2.1 원료

폴리감마글루탐산(분자량: 500~11,500 kDa)은 바이오리더스사로부터 제공받았으며, 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide), 아세톤(acetone), 헥사메틸렌 디이소시아네이트(hexamethylene diisocyanate)는 Sigma-Aldrich사로부터 구매하여 사용하였다. 세포 배양에 사용한 연골세포는 토끼의 귀에서 채취하여 사용하였으며, 세포배양에 사용된 DMEM 배지와, 항생제는 Gibco사 제품을 사용하였다.

2.2 γ -PGA 폼의 제조

분자량 500~11,500 kDa의 폴리감마글루탐산을 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO)에 넣고 완전히 용해될 때까지 교반기에서 교반시켰다. 이때 고분자용액의 농도를 5~9 wt%로 균일하게 녹이고 유리용기에 넣는다. 유리 용기에 담긴 용액은 냉동실 (-20°C)에서 충분히 얼린 후 -20°C의 아세톤에 넣고 주기적으로 흔들며 줌으로써 용매만 녹여낸다. 용매를 충분히 녹여낼 수 있도록 수 회 실시한다. 이때 아세톤의 온도를 -20°C로 유지함으로써 용액을 언 상태로 유지할 수 있으며, 주기적으로 흔들며 줌으로써 기공을 3차원적으로 형성할 수 있다. (Fig. 1)

상기 용매추출법에 의해 제조된 다공성 지지체를 진공오븐에 넣고 진공 상태에서 약 24시간 정도 방치하여 아세톤을 완전히 제거한 다음 가교제인 1% 헥사메틸렌 디이소시아네이트(hexamethylene diisocyanate, HMDI) 용액에 침적시켜 5시간이상 가교반응을 진행시켰다. 이때, 가교 방법은 가교제를 폴리감마글루탐산이 용해되지 않는 트리플루오로에탄올(trifluoroethanol, TFE)에 녹인 후 다공성 지지체를 5

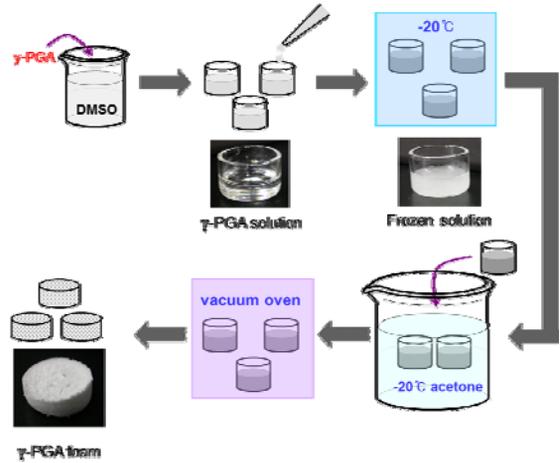


Fig. 1 Fabrication procedure of γ -PGA foam.

시간이상 침적시켰다. 다공성 지지체는 가교제의 농도 및 가교 시간에 따라 분해 속도가 다르므로 용도에 따라 가교 정도를 달리할 수 있다. 가교 후에는 3차수로 충분히 세척하여 불필요한 가교제를 세척하고 건조시킨 후 약염기인 탄산나트륨 수용액으로 중화시켜, 폴리감마글루탐산 다공성 지지체를 제조하였다.

2.3 γ -PGA 폼의 기계적물성 측정

제조한 가교된 폴리감마글루탐산 폼의 압축강도는 UTM(Instron 4477)을 이용하여 측정하였다. 측정에 사용한 샘플의 사이즈는 직경 16 mm, 높이 6 mm의 디스크형이며 압축속도는 2.54 mm/min으로 측정하였다.

2.4 세포배양실험

본 연구에 이용된 연골세포는 1.5 ~ 2 kg의 뉴질랜드 화이트종 토끼의 귀에서 분리하였다. 간단하게 그 방법을 정리하면, 토끼를 마취시킨 후 토끼의 귀를 소독하고 절취부위를 면도한 후 한쪽 귀를 적출하여 헤파린 수용액에 담근다. 적출한 귀는 수술도구를 이용하여 표피를 벗겨낸 후 연골을 감싸고 있는 연골막을 면도날을 이용하여 긁어내고 메스를 이용해 작게 슬라이스한 후, 3시간동안 콜라게나아제 수용액에 담귀 세포외기질을 분해하여 연골세포를 얻었다. 얻어진 연골세포는

10% FBS를 함유하는 DMEM배지에서 계대배양하여 실험에 사용하였다. 멸균처리한 폴리감마글루탐산 폼을 12-well에 넣고 배지에 현탁시킨 5x10⁵ cell/well의 연골세포를 파종하고 37°C, 5% CO₂ 환경에서 배양하였다. 세포의 침착 및 스프레딩 정도를 확인하기 위하여 4, 8, 12시간 후 각각 글루탈알데히드로 고정한 후 건조하여 SEM을 이용하여 분석하였다.

3. 실험결과 및 고찰

3.1 γ -PGA 폼의 제조

일반적으로 폴리감마글루탐산은 유기용매에 대한 용해성이 높지 않은 것으로 알려져 있다. 폴리감마글루탐산을 용해시키는 용매로는 알칼리수, 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid, TFA), 디메틸포름아마이드(dimethylformamide, DMF) 및 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO) 등이 있으나, 본 연구에서는 디메틸설폭사이드(DMSO)를 사용하였다. TFA는 산성을 띄며 폴리감마글루탐산을 쉽게 분해하여 분자량저하를 초래할 수 있으며, DMF의 어는점은 -61°C로 매우 낮아 용액을 얼리기가 쉽지 않아 용매추출법을 사용하기가 힘든 반면, DMSO는 어는점이 16 ~ 19°C로 쉽게 얼릴 수 있다. 또한, 이들의 공용매를 이용함으로써 기공의 크기를 조절할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

DMSO에 용해된 폴리감마글루탐산 용액을 아세톤을 용매로 한 용매추출법을 이용하여 스폰지 형태의 다공성 지지체를 제조하였다. 본 연구에 사용된 용매추출법은 용매와 용질이 균일하게 섞인 용액을 얼린 후 용질이 녹지 않는 제 3의 용매를 이용하여 용액내의 용매만 녹여냄으로써 기공을 형성하는 방법이다. 용매추출법으로 수득한 폴리감마글루탐산 폼에서 잔류 용매를 제거한 다음 HMDI를 이용하여 가교반응을 진행하고 가교 후 잔류 가교제를 세척하고 건조시킨 후 중화시켜 폴리감마글루탐산폼을 제조하였다.

3.2 제조한 γ -PGA 폼의 물폴로지 분석

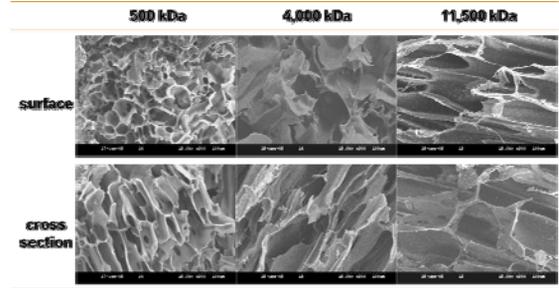


Fig. 2 Surface and cross-section images of γ -PGA foams fabricated from different molecular weights.

Fig. 2에서는 서로 다른 분자량의 폴리감마글루탐산 5 wt% DMSO 용액으로부터 동결-용매추출법으로 제조 및 가교한 폴리감마글루탐산 폼의 표면과 단면 물폴로지를 SEM으로 분석한 결과를 나타내었다. 그 결과 용매추출법으로 수득한 폴리감마글루탐산 폼의 기공사이즈는 50~300 μ m 정도였으며, 기공들이 서로 연결된 삼차원적인 기공구조를 나타내었다. 삼차원적인 세포배양을 위해서는 세포가 기공안으로 잘 들어가 접촉하여 성장할 수 있어야 한다. 500 kDa의 폴리감마글루탐산으로 제조한 폼은 표면의 조밀한 기공사이즈로 인하여 삼차원적인 세포배양이 원활하지 않을 것으로 보이며, 11,500 kDa의 폴리감마글루탐산으로 제조한 폼은 그 사이즈가 300 μ m에 이르는 기공들이 존재하여 세포가 접촉하지 않고 기공사이로 빠져 흘러내리는 문제가 발생할 수 있을 것으로 보여 앞으로의 실험에서는 분자량 4,000 kDa의 폴리감마글루탐산을 이용하여 폼을 제조하였다.

한편 4,000 kDa의 폴리감마글루탐산의 농도변화에 따른 기공의 형태를 분석한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 9 wt%의 폴리감마글루탐산 용액으로 제조한 폼은 너무 조밀하고 기공사이즈가 작아 세포의 삼차원적인 배양이 이루어질 수 없을 정도임을 알 수 있었다. 5 wt%와 7 wt% 용액으로 제조한 폼의 경우에도 다소 유사한 결과를 보이나 7 wt%로 제조한 폼의 경우, 표면과 내부 기공의 연결이 원활해 보이지 않고 내부의 기공이 상대적으로 5 wt%의 폼보다 작은 것으로 보여 폴리감마글루탐산 폼 제조에는 4,000 kDa, 5 wt% DMSO 용

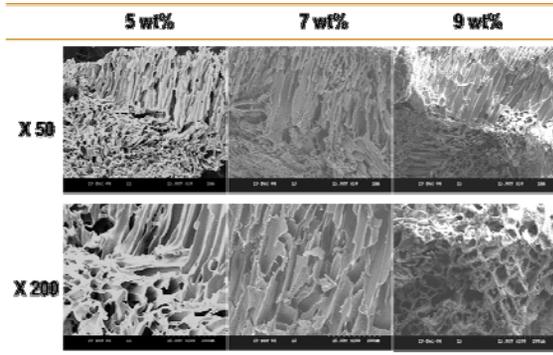


Fig. 3 Cross-section images of cross-linked γ -PGA foams fabricated from different γ -PGA concentrations.

액의 조건에서 실시한 후 세포배양에 사용하였다.

또한 가교시킨 폴리감마글루탐산 폼이 물에 쉽게 용해되는지를 알아보기 위해 물에 침지시킨 결과, 물에 용해되지 않았으며 기공의 형태를 유지하고 있어 조직세포배양에 적합함을 확인하였다

3.3 제조한 γ -PGA 폼의 압축강도

Fig. 4에서는 제조한 폴리감마글루탐산폼의 압축강도를 나타내었으며 폼을 제조할 때 가교전, 가교후 및 중화처리 후의 압축강도를 비교하였다.

제조한 폴리감마글루탐산 폼의 압축강도는 약 0.35 MPa로 나타났다. 또한 가교전과 후, 중화처리후의 폴리감마글루탐산 폼의 압축강도는 큰 변화를 보이지 않았다. 제조한 폼의 압축강도는 세포를 배양하기전의 폼의 강도를 나타낸 것이며 그 강도가 충분하지는 않지만 연골세포를 배양함에 따라 강도는 크게 증가하는 것이 일반적이다. 또한 간헐적 수압을 가하며 세포를 배양할 경우에 그 강도는 더욱 더 증가할 것으로 예상된다.

3.4 연골세포배양

뉴질랜드 화이트종 토끼의 귀로부터 채취한 초대배양 연골세포를 제조한 폴리감마글루탐산 폼에 파종한 후 세포의 정착 및 스프레딩 정도를 조사한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. SEM 사진에서 알 수 있는 바와 같이 폴리감마글루탐산 폼의 표

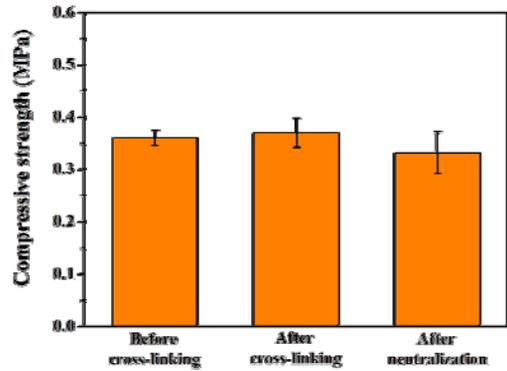


Fig. 4 Compressive strength of fabricated γ -PGA foams.

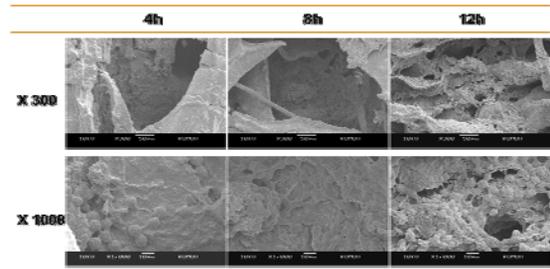


Fig. 5 SEM microphotographs of cultured chondrocytes on γ -PGA foams as a function of culture time.

면에 많은 양의 초대배양 연골세포가 정착하였으며, 12시간 배양한 결과 세포의 괴사가 없이 원활하게 성장하여 거의 대부분의 매트릭스 표면이 세포로 덮여 있는 것을 확인 할 수 있었다. 이는 폴리감마글루탐산 폼이 세포독성이 없으며, 조직적합성이 뛰어난 것을 의미한다고 할 수 있다.

폴리감마글루탐산은 식용, 수용성, 음이온성, 생분해성 고분자물질로 흡습제, 보습제 및 화장품의 원료 등으로 사용되며, 체내에 이식하였을 경우 체내에서 생분해되어 생성되는 물질이 글루탐산으로서 체내에서도 거부반응이 없어 조직공학용 지지체 제조에 적합한 소재임을 알 수 있다.

4. 결론

본 연구에서는 생분해성 및 생체적합성을 갖는 폴리감마글루탐산을 동결-용매추출법을 이용하여 다공성 폼을 제조하고 가교 및 중화처리를 하여 조직공학적 지지체로서 응용가능성을 조사하였다. 제조한 폴리감마글루탐산 폼의 기공은 50~300 μm 이었으며 서로 연결된 기공특성을 보였다. 폼 제조시의 사용한 고분자의 분자량 및 용액농도를 조절함으로써 조직공학적 지지체에 적합한 크기의 기공을 갖는 지지체를 제조 할 수 있었다. 얻어진 폼의 압축강도는 약 0.35 MPa 였으며 토끼의 귀에서 채취한 초대 연골세포를 배양한 결과 배양초기에 많은 세포가 매트릭스 표면에 접촉 및 스프레딩되어 있음을 확인 할 수 있었다. 이로서 동결-용매추출법으로 제조한 폴리감마글루탐산 폼이 연골재생을 위한 조직공학적 지지체로서의 응용에 적합하다는 것을 확인 할 수 있었다.

후 기

“본 연구는 ‘산업통상자원부’, ‘한국산업기술진흥원’, ‘대경지역사업평가원’의 ‘광역경제권 선도산업 육성사업’으로 수행된 연구결과입니다.”

REFERENCES

- (1) Puelacher. W. C., Mooney. D., Langer. R., Upton. J., Vacanti. J. P., and Vacanti. C. A., "Design of nasoseptal cartilage replacements synthesized from biodegradable polymers and chondrocytes", *Biomaterials* Vol. 15 No. 10, pp. 774-778, 1994.
- (2) Langer. R., and Vacanti. J. P., "Tissue engineering", *Science* Vol. 260, pp. 920-926, 1993.
- (3) Sakai. S., Ono. T., Ijima. H., and Kawakami. K., "Synthesis and transport characterization of alginate/aminopropyl-silicate/alginate microcapsule: application to bioartificial pancreas", *Biomaterials* Vol. 22 No. 21, pp. 2827-2834, 2001.
- (4) de Vos. Paul., Faas. M. M., Strand. B., and Calafiore. R., "Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets", *Biomaterials* Vol. 27 No. 32, pp. 5603-5617, 2006.
- (5) Matthews. J. A., Wnek. G. E., Simpson. D. G., and Bowlin. G. L., "Electrospinning of collagen nanofibers", *Biomacromolecules* Vol. 3 No. 2, pp. 232-238, 2002.
- (6) Sun. H., Zhu. F., Hu. Q., and Krebsbach. P. H., "Controlling stem cell-mediated bone regeneration through tailored mechanical properties of collagen scaffolds", *Biomaterials* Vol. 35 No 4, pp. 1176-1184, 2014.
- (7) Adekogbe. I., and Ghanem. A., "Fabrication and characterization of DTBP-crosslinked chitosan scaffolds for skin tissue engineering", *Biomaterials* Vol. 26 No 35, pp. 7241-7250, 2005.
- (8) Mikos. A. G., Thorsen. A. J., Czerwonka. L. A., Bao. Y., Langer. R., Winslow. D. N., and Vacanti. J. P., "Preparation and characterization of poly(L-lactic acid) foams", *Polymer* Vol. 35 No. 5, pp. 1068-1077, 1994.
- (9) Kwon. O. H., Lee. I. S., Ko. Y.-G., Meng. W., Jung. K.-H., Kang. I.-K., and Ito. Y., "Electrospinning of microbial polyester for cell culture", *Biomedical Materials* Vol. 2, S52-58, 2007.
- (10) Harris. L. D., Kim. B. S., and Mooney. D. J., "Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming", *J. Biomed. Mater. Res.*, Vol. 42 No. 3, pp. 396-402, 1998.
- (11) Bose. S., Vahabzade. S., and Bandyopadhyay. A., "Bone tissue engineering using 3D printing", *Materials Today* Vol. 16 No. 12, pp. 496-504, 2013.
- (12) Ko. Y.-G., Yoon. K. H., Park. C, Sung. M.-H.,

- Kwon. O. K., Ahn. C. H., Kim. Y.-J., and Kwon. O. H., "Preparation and evaluation of poly(g-glutamic acid)-based anti-adhesion membranes", *Key Eng. Mat.*, Vol. 342-343, pp. 225-228, 2007.
- (13) Sung. M.-H., Park. C., Kim. C.-J., Poo. H., Soda. K., and Ashiuchi. Makoto., "Natural and edible biopolymer poly-g-glutamic acid: Synthesis, production and its applications". *The Chemical Record* Vol. 5, pp. 352-366, 2005.
- (14) Choi. H. J., Yang. R., and Kunioka. M., "Synthesis and characterization of pH-sensitive and biodegradable hydrogels prepared by g-irradiation using microbial poly(g-glutamic acid) and poly(ϵ -lysine)", *J. Appl. Polym. Sci.*, Vol. 58 No. 4, pp. 807-814, 1995.