

# 젤라틴 기공유도물질과 유리모세관 장치를 이용한 다공성 PLGA 미세섬유의 제조

## Preparation of Porous PLGA Microfibers Using Gelatin Porogen Based on a Glass Capillary Device

김철민<sup>1</sup>, 김규만<sup>1,✉</sup>  
Chul Min Kim<sup>1</sup> and Gyu Man Kim<sup>1,✉</sup>

<sup>1</sup> 경북대학교 기계공학부 (School of Mechanical Engineering, Kyungpook National University)  
✉ Corresponding author: gyuman.kim@knu.ac.kr, Tel: +82-53-950-7570

Manuscript received: 2015.10.30. / Revised: 2015.11.11. / Accepted: 2015.11.14.

*We present a method of fabricating poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) porous microfibers using a pore template. PLGA microfibers were synthesized using a glass capillary tube in a poly-(dimethylsiloxane) (PDMS) microfluidic chip. Gelatin solution was used as a porous template to prepare pores in microfibers. Two phases of PLGA solutions in different solvents-DMSO (dimethyl sulfoxide) and DCM (dichloromethane)-were used to control the porosity and strength of the porous microfibers. The porosity of the PLGA microfibers differed depending on the ratio of flow rates in the two phases. The porous structure was formed in a spiral shape on the microfiber. The porous structure of the microfiber is expected to improve transfer of oxygen and nutrients, which is important for cell viability in tissue engineering.*

KEYWORDS: Glass capillary tube (유리모세관), Gelatin (젤라틴), Porous fiber (다공성 섬유), Microfluidic system (미세유체 시스템), PLGA (피엘지아이)

### 1. 서론

재생의학(regenerative medicine)은 손상 및 손실된 인간의 세포, 조직, 장기를 대체 또는 재생하여 본래의 기능을 수행할 수 있도록 복원하는 분야이며, 현재 활발한 연구가 진행되고 있다.<sup>1</sup> 이러한 분야에서 손실된 조직의 복원 및 재생을 위하여 세포를 이식하는 연구가 진행되고 있으나, 지지체 없이 세포만을 조직에 주입했을 경우 이식되는 효율이 감소되는 것을 확인하였다.<sup>2</sup> 따라서 이식된

조직이 증식하는 동안 물리적으로 지탱해줄 수 있는 지지체에 대한 연구가 부각되고 있으며, 그와 관련된 생분해성 고분자로 구성된 구조체에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>3</sup>

조직공학에 쓰이는 대표적인 생체고분자로서, PLGA(poly lactic-co-glycolic acid)가 사용되고 있다.<sup>4</sup> PLGA는 PLA(poly lactic acid)와 PGA(poly glycolic acid)로 구성되어 있는 공중합체이며, 생체적합성 및 생분해성의 특징을 가진다. 또한 PGA 및 PLA 같은 단위체의 구성비를 조절함으로써 분해 속도

를 일주일에서 두 달까지 정밀하게 조절할 수 있는 장점을 가진다.<sup>5</sup> PLGA는 FDA로부터 그 안정성을 승인받았으며, 현재 수술용 봉합사, 보형물, 약물담지체 등 의학, 약학, 생물학 등 다양한 분야에서 사용되고 있으며, 지지체의 재료도 사용되고 있다.<sup>6</sup>

지지체의 형태는 크게 입자(microparticle), 섬유(microfiber) 그리고 3차원 구조체(implant)로 나눌 수 있다.<sup>7-9</sup> 입자는 휴대성이 용이하고 주사로 주입이 가능하기 때문에 추가적인 수술이 필요하지 않은 장점을 가지고 있다. 그러나 입자의 크기가 작기 때문에, 요구되는 지지체의 크기가 클 경우 지지체로서의 강도가 다른 형태보다 약하다는 단점이 있다. 이러한 문제를 해결하기 위하여, 입자 간의 결합력을 강화시키기 위한 표면처리에 대한 연구도 진행되고 있는 실정이다.<sup>10</sup> 3차원 구조체 형태는 강도가 우수한 장점을 가지고 있으나 구조체 삽입을 위한 추가적인 수술의 번거로움과 크기 대비 표면적의 감소로 인한 세포 이식의 효율 감소라는 단점을 가지고 있다.<sup>11</sup> 이와 대조적으로 섬유 형태는 대량생산에 용이하고, 세포의 방향성을 제어할 수 있는 장점을 가지고 있으며, 섬유 간의 결합을 통하여 시트 형태 등 다양한 형태로 제작이 가능하여 현재 많은 연구가 진행되고 있다.<sup>12</sup>

이러한 구조체의 특성과 앞에서 언급된 재료의 생체적합성에도 불구하고, 지지체를 인체에 삽입하였을 경우 지지체에 이식된 세포들과 외부환경 간의 영양소 및 산소 공급이 원활히 이루어지지 않아 낮은 세포 생존율 및 세포 괴사 등이 해결해야 될 숙제로 남아 있다.<sup>13</sup> 이러한 문제를 해결하기 위하여 다공성 구조체에 대한 연구가 요구된다. 다공성 구조체는 다공성의 특성으로 인하여 구조체에 이식된 세포와 외부환경 간의 대사물질, 영양분, 산소의 순환을 촉진시켜주며, 이식하고자 하는 세포를 물리적인 충격으로부터 지켜주는 역할을 한다.<sup>13,14</sup> 또한 표면적이 증가되기 때문에 이식시키고자 하는 세포의 전달량도 증가하는 장점이 있어 현재 조직공학 분야에서 활발히 연구가 진행되고 있다.<sup>15</sup>

다공성 구조체는 주로 기공유도물질을 이용하여 제작된다. 기공유도물질은 상태에 따라 크게 기체, 액체 그리고 고체 등이 사용된다.<sup>16-18</sup> 그러나 미세섬유의 경우, 구조체 내부에 기공으로 인한 강도 저하로 인하여 제작의 한계를 가지고 있기 때문에 국내외적으로 관련 연구가 미비한 실정이

다.<sup>10</sup> 또한 세포 및 조직 등 여러 가지 변수에 따라서 다양한 다공성의 미세섬유가 사용되어야 하기 때문에 수요에 따라서 다공성을 제어할 수 있는 제조 기술이 필요하다.

이를 위하여, 미세유체시스템이 대안으로 사용될 수 있다. 미세유체시스템은 소량의 유체를 정밀하고 신속하게 제어할 수 있기 때문에 사용되는 시약의 최소화, 신속한 반응성, 다양한 기능이 집적화된 랩온어칩 등 다양한 장점을 가지고 있다. 따라서, 생물, 의학, 약학 등 다양한 분야에서 관심을 가지고 연구를 진행하고 있다.<sup>19-21</sup>

본 연구에서는 미세섬유의 제조를 위하여 유리모세관 장치를 제작하고, 젤라틴 기공유도물질을 이용하여 다공성 PLGA 미세섬유를 제조하고자 하였다. 기공유도물질이 포함된 폴리머 용액과 순수 폴리머 용액을 동시에 미세유체채널에 주입하여 미세섬유가 다공성을 지니면서도 강도를 유지할 수 있도록 하였다. 또한 주입되는 폴리머 용액의 유속제어를 통하여 미세섬유의 기공률(Porosity)을 변화시킬 수 있었다. 또한 광학현미경과 전자 주사현미경(SEM)을 사용하여 제조된 미세섬유의 표면 및 기공특성을 관찰하였다.

## 2. 실험방법

### 2.1 PDMS 캐스팅을 이용한 유리모세관 장치 제작

Fig. 1은 PDMS(Polydimethylsiloxane)기반 유리모세관 장치의 제작과정을 나타내는 개략도이다. 유리모세관 장치의 제작과정은 다음과 같다. 사각패트리 디쉬 안에 두개의 PDMS 지지체를 놓고 유리모세관 (inner diameter: 1.1-1.2mm, outer diameter: 1.5-1.6mm, Marienfeld, Germany)을 그 위에 올려놓는다(Fig. 1(a)). PDMS 엘라스토머와 경화제를 10:1의 비율로 혼합한 용액을 사각패트리 디쉬 안에 조심스럽게 부어 유리모세관이 움직이지 않도록 한다(Fig. 1(b)). 혼합 도중 발생한 기포들은 진공펌프를 이용하여 30분 이상 제거한다. 기포가 제거된 PDMS 혼합용액이 들어 있는 패트리 디쉬는 90°C의 오븐에서 2시간 이상 경화한다. 경화된 PDMS 블록을 패트리 디쉬와 분리하고(Fig. 1(c)), PDMS 블록 안에 삽입되어 있던 유리모세관은 분리하는 과정에서 깨어지지 않도록 이소프로필알코올(isopropyl alcohol) 용액을 주입하면서 제거한다. 앞선 과정을 통하여 만들어진 구멍과 수직한

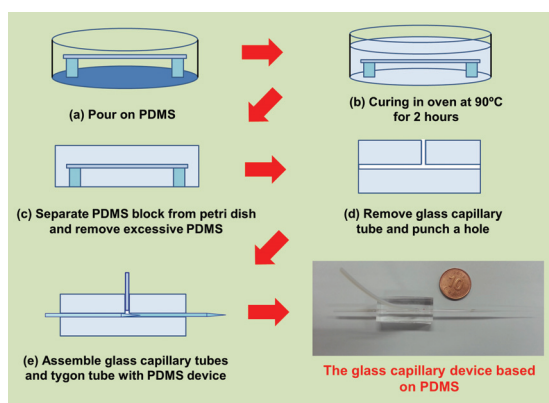


Fig. 1 Fabrication of glass capillary device using PDMS casting

방향으로 타공기를 이용하여 구멍을 만들어 테플론 튜브로 연결시킨다(Fig. 1(d)). 유리모세관에 의하여 만들어진 구멍에는 마이크로 폴러(P-97, Sutter instrument, USA)를 이용하여 가공된 두 개의 유리모세관(inner tube diameter: 10-20  $\mu\text{m}$ , outer tube diameter: 40-50  $\mu\text{m}$ )을 삽입시키고 고정한다(Fig. 1(e)).

## 2.2 미세유체시스템을 이용한 다공성 미세섬유의 제조

외측상(outer phase)의 용액은 0.4g의 PLGA를 유기용매인 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO)에 10% 농도로 상온에서 초음파 세척기를 이용하여 30분간 용해시켜서 제조한다. 내측상(inner phase) 용액을 제조하기 위하여 먼저 0.075g의 젤라틴을 0.925g의 1% 폴리 비닐알코올 (poly vinyl alcohol) 용액에 넣고 40°C로 가열하여 용해시킨다. 용해된 용액은 PLGA를 유기용매인 디클로로메탄(dichloromethane, DCM)에 2% 농도로 용해한 용액과 같이 넣고 호모게나이저(homogenizer)를 이용하여 2000rpm에서 3분간 혼합하여 제조한다. 외측상과 내측상 용액을 두 개의 실린지 펌프를 이용하여 제작된 유리모세관 장치에 주입한다. 사용된 유기용매들은 반응성이 높기 때문에 내화학성이 뛰어난 테플론 튜브를 사용하여 연결한다. 유리모세관 장치는 안정적인 미세섬유의 제조를 위하여 수직방향으로 설치한다. Fig. 2는 제작된 유리모세관 장치를 이용하여 다공성 PLGA 미세섬유를 제조하는 과정을 나타낸 개략도이다. 내측상에는 젤라틴 기공유도물질이 포함된 PLGA 용액을 주입하

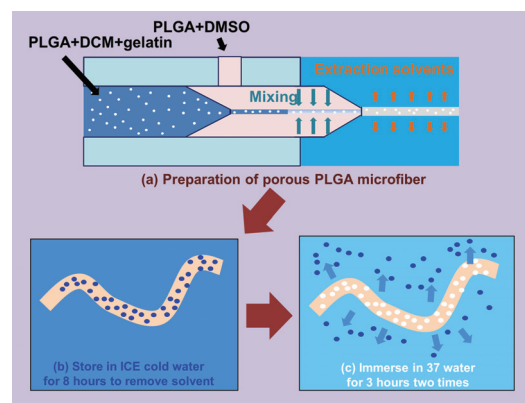


Fig. 2 Schematic images of preparation process for porous PLGA microfiber

고, 외측상에는 기공유도물질이 없는 PLGA 용액을 주입한다(Fig. 2(a)). 용액들이 혼합되는 과정에서 내측상 용액은 미세섬유 내에 기공을 발생시키며, 외측상 용액은 미세섬유의 강도를 보완하는 역할을 하게 된다. 혼합된 용액이 외부의 수분과 접촉하게 되면 외측상의 유기용매인 디메틸설폭사이드가 빠르게 외부의 수분으로 흡수되면서 미세섬유가 빠르게 경화된다. 폴리머상에 잔류되어 있는 유기용매인 디클로로메탄이 증발되는 과정에서 젤라틴 기공유도물질이 빠져나가는 것을 방지하기 위하여 제조된 미세섬유는 얼음이 담겨 있는 차가운 물에서 수집한다(Fig. 2(b)). 수집된 미세섬유는 잔류유기용매의 제거를 위하여 8시간 동안 탈이온수 상에서 보관한다. 유기용매가 제거된 미세섬유상의 젤라틴 기공유도물질을 제거하기 위하여, 37°C의 탈이온수에서 3시간 동안 담그고, 탈이온수로 2회 이상 세척한다(Fig. 2(c)).

## 3. 실험 결과 및 고찰

### 3.1 다공성 PLGA 미세섬유의 형태학

Fig. 3은 제작된 미세유체시스템 기반의 유리모세관 장치를 이용하여 제조한 기공이 형성되지 않은 일반적인 PLGA 미세섬유의 사진들이다. 외측상으로 1% 폴리비닐 알코올 용액이 사용되었으며, 내측상으로 디메틸설폭사이드상에 10%의 농도로 용해된 PLGA 용액이 사용되었다. 내측상과 외측상의 유속의 비율을 조절함으로써, 수십 마이크로부터 밀리미터 두께의 지름까지 다양한 지름의 미세섬유를 정밀하게 제작할 수 있었다. Fig. 4는 젤

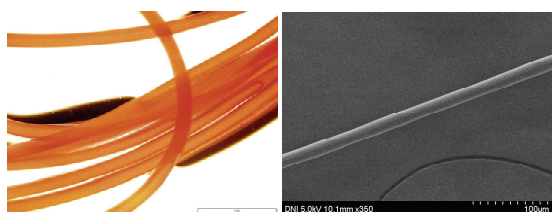


Fig. 3 Optical image and FE-SEM image of non porous PLGA microfiber prepared by glass capillary device

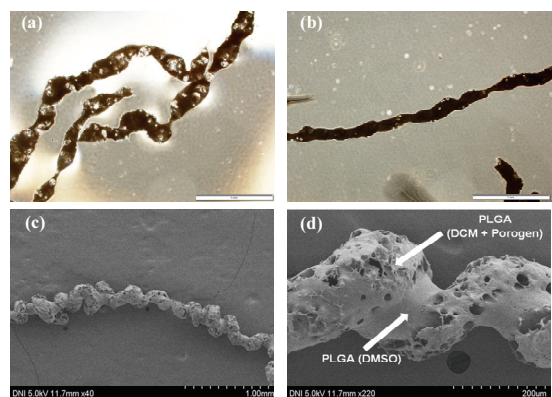


Fig. 4 Optical images and FE-SEM image of porous PLGA microfiber prepared by glass capillary device

라틴 기공유도물질을 이용하여 다공성 PLGA 미세섬유를 제조한 사진들이다. 제조된 미세섬유 표면에 기공들이 관찰되었으며, 일반미세섬유보다 거친 표면을 가지고 있었다(Figs. 4(a) and 4(b)). 그리고 내측상과 외측상이 유리모세관 장치로부터 나오면서, 외측상이 내측상을 나선형으로 타고 흐르면서 기공들이 형성되는 것을 확인하였다(Figs. 4(c) and 4(d)).

### 3.2 미세유체시스템을 이용한 다공성의 제어

Fig. 5는 외측상과 내측상의 유속 변화에 따른 미세섬유 표면에서 형성되는 기공의 변화를 관찰한 사진들이다. 기공유도물질이 함유된 내측상의 유속이 증가할수록 미세섬유 표면에 형성되는 기공들이 점차적으로 증가하는 것을 관찰하였다.

내측상의 유속이 외측상의 유속보다 크거나 같을 경우에는 미세섬유 전반에 걸쳐 기공이 형성되었다(Fig. 5(d)). 그러나 이러한 유속조건에서는 수집하는 과정에서 미세섬유가 규칙적으로 절단되는 현

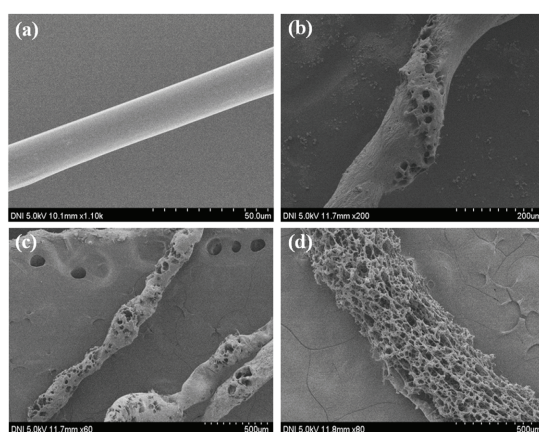


Fig. 5 Effect of solvent for porosity on microfibers; (a) Normal PLGA microfiber (1ml/h/10ml/h), (b)  $Q_{OUT} > Q_{IN}$  (4:1) (8ml/h/2ml/h), (c)  $Q_{OUT} > Q_{IN}$  (2:1) (8ml/h/4ml/h), (d)  $Q_{OUT} \leq Q_{IN}$  (1:1) (5ml/h/5ml/h)

상을 확인하였다. 이는 미세섬유에서 기공이 차지하는 공간이 증가함에 따른 미세섬유의 강도 저하에 기인하는 것으로 판단된다. 따라서 미세섬유 제조시 기공률과 강성에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

### 4. 결론

본 연구에서는 유리모세관 장치기반으로 젤라틴기공유도물질을 이용하여 다공성 PLGA 미세섬유를 제조하였다. PDMS 캐스팅을 통해서 유리모세관 장치를 제작하였으며, 제작된 장치를 미세유체 시스템에 결합하였다. PLGA 미세섬유의 강도와 섬유 내부의 기공을 동시에 확보하기 위하여 두 가지 다른 용매를 혼합하는 방법을 선택하였다. 내측상과 외측상의 유속비율을 조정함으로써 미세섬유에서 형성되는 기공률이 변화하는 것을 확인하였다. 본 연구에서 제시된 다공성 조절이 용이한 미세섬유의 제조는 의학, 약학, 생물학 등 다양한 분야에서 유용한 연구의 도구로써 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

### 후 기

본 연구는 미래창조과학부의 재원으로 한국연구재단의 지원(NRF-2012M3A9C6050112, NRF-2013R1A1A2060944)을 받아 수행되었음.



## REFERENCES

1. Khademhosseini, A., Langer, R., Borenstein, J., and Vacanti, J. P., "Microscale Technologies for Tissue Engineering and Biology," Proc. of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 103, No. 8, pp. 2480-2487, 2006.
2. Mooney, D. J. and Vandenburgh, H., "Cell Delivery Mechanisms for Tissue Repair," Cell Stem Cell, Vol. 2, No. 3, pp. 205-213, 2008.
3. Patrick Jr, C. W., Chauvin, P. B., Hobley, J., and Reece, G. P., "Preadipocyte Seeded PLGA Scaffolds for Adipose Tissue Engineering," Tissue Engineering, Vol. 5, No. 2, pp. 139-151, 1999.
4. Holy, C. E., Cheng, C., Davies, J. E., and Shoichet, M. S., "Optimizing the Sterilization of PLGA Scaffolds for Use in Tissue Engineering," Biomaterials, Vol. 22, No. 1, pp. 25-31, 2000.
5. Astete, C. E. and Sabliov, C. M., "Synthesis and Characterization of PLGA Nanoparticles," Journal of Biomaterials Science, Vol. 17, No. 3, pp. 247-289, 2006.
6. Kim, H. G., Kim, K. M., Kim, Y. H., Lee, S. H., and Kim, G. M., "Preparation of Monodisperse ENX-Loaded PLGA Microspheres Using a Microfluidic Flow-Focusing Device," Journal of Biobased Materials and Bioenergy, Vol. 7, No. 1, pp. 108-114, 2013.
7. Ryu, T.-K., Oh, M.-J., Moon, S.-K., Paik, D.-H., Kim, S.-E., et al., "Uniform Tricalcium Phosphate Beads with an Open Porous Structure for Tissue Engineering," Colloid Surface B: Biointerfaces, Vol. 112, No. 12, pp. 368-373, 2013.
8. Hwang, C. M., Khademhosseini, A., Park, Y., Sun, K., and Lee, S.-H., "Microfluidic Chip-Based Fabrication of PLGA Microfiber Scaffolds for Tissue Engineering," Langmuir, Vol. 24, No. 13, pp. 6845-6851, 2008.
9. Astaneh, R., Erfan, M., Moghimi, H., and Mobedi, H., "Changes in Morphology of in Situ Forming PLGA Implant Prepared by Different Polymer Molecular Weight and Its Effect on Release Behavior," Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 98, No. 1, pp. 135-145, 2009.
10. Qutachi, O., Vetsch, J. R., Gill, D., Cox, H., Scurr, D. J., et al., "Injectable and Porous PLGA Microspheres That Form Highly Porous Scaffolds at Body Temperature," Acta Biomaterialia, Vol. 10, No. 12, pp. 5090-5098, 2014.
11. Kang, S.-W., La, W.-G., and Kim, B.-S., "Open Macroporous Poly (lactic-co-glycolic acid) Microspheres as an Injectable Scaffold for Cartilage Tissue Engineering," Journal of Biomaterials Science, Polymer Ed., Vol. 20, No. 3, pp. 399-409, 2009.
12. Onoe, H., Okitsu, T., Itou, A., Kato-Negishi, M., Gojo, R., et al., "Metre-Long Cell-Laden Microfibres Exhibit Tissue Morphologies and Functions," Nature Materials, Vol. 12, No. 6, pp. 584-590, 2013.
13. Choi, S.-W., Zhang, Y., Yeh, Y.-C., Wooten, A. L., and Xia, Y., "Biodegradable Porous Beads and Their Potential Applications in Regenerative Medicine," Journal of Materials Chemistry, Vol. 22, No. 23, pp. 11442-11451, 2012.
14. Huang, C.-C., Wei, H.-J., Yeh, Y.-C., Wang, J.-J., Lin, W.-W., et al., "Injectable PLGA Porous Beads Cellularized by Hfscs for Cellular Cardiomyoplasty," Biomaterials, Vol. 33, No. 16, pp. 4069-4077, 2012.
15. Kim, C. M., Ullah, A., and Kim, G. M. "Preparation of Highly Porous PLGA Microparticles Using Droplet Fission and Gelatin Porogen," Proc. of 41<sup>st</sup> Micro and Nano Engineering, 2015.
16. Kim, T. K., Yoon, J. J., Lee, D. S., and Park, T. G., "Gas Foamed Open Porous Biodegradable Polymeric Microspheres," Biomaterials, Vol. 27, No. 2, pp. 152-159, 2006.
17. Kim, C. M., Park, S. J., and Kim, G. M., "Applications of PLGA Microcarriers Prepared Using Geometrically Passive Breakup on Microfluidic Chip," Int. J. Precis. Eng. Manuf., Vol. 16, No. 11, 2015.
18. Zhang, Q., Tan, K., Ye, Z., Zhang, Y., Tan, W., et al., "Preparation of Open Porous Polycaprolactone Microspheres and Their Applications as Effective Cell Carriers in Hydrogel System," Materials Science and Engineering: C, Vol. 32, No. 8, pp. 2589-2595, 2012.
19. Teh, S.-Y., Lin, R., Hung, L.-H., and Lee, A. P., "Droplet Microfluidics," Lab on a Chip, Vol. 8, No. 2, pp. 198-220, 2008.
20. Dang, T.-D., Kim, Y. H., Kim, H. G., and Kim, G. M., "Preparation of Monodisperse Peg Hydrogel Microparticles Using a Microfluidic Flow-Focusing Device," Journal of Industrial and Engineering Chemistry, Vol. 18, No. 4, pp. 1308-1313, 2012.
21. Choi, J. H. and Kim, G. M., "Micro-Patterning on Non-Planar Surface Using Flexible Microstencil," Int. J. Precis. Eng. Manuf., Vol. 12, No. 1, pp. 165-168, 2011.