

Polyurethane과 Poly(Ethylene Oxide)를 이용한 hybrid 나노섬유 지지체의 제작

신지원¹, 신호준², 허수진¹, 김지희¹, 황영미¹, 김동화¹, 신정욱^{1*}

¹인제대학교 의용공학과 BK 21 사업단

²일본 자이스트 재료과학과

(Received August 1, 2006. September 26, 2006)

Dual Electrospinning to Manufacture Hybrid Nanofibrous Scaffold using Polyurethane and Poly(Ethylene Oxide)

Ji Won Shin¹, Ho Jun Shin², Su Jin Heo¹, Ji Hee Kim¹, Young Mi Hwang¹, Dong Hwa Kim¹, Jung-Woog Shin¹

¹Team of BK21 / Dept. of Biomedical engineering, Inje University, Korea

²School of Material Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology, Japan

Abstract

The object of this study is to investigate the potential of dual-electrospun polymer based structure for vascular tissue engineering, especially for the medium or small size blood vessels. Polyurethane(PU), which is known to be biocompatible in this area, was electrospun with poly(ethylene oxide) (PEO). Concentration of PU was fixed at 20wt%, while that of PEO was set from 15 to 35wt%. Morphological features were observed by SEM image and measurement of porosity and cellular responses were tested before and after extracting PEO from the hybrid scaffolds by immersing the scaffolds into distilled water. The diameter of PEO fibers were ranged from 200nm to 500nm. The lower concentration of PEO tended to show beads. The porosity of the scaffolds after extracting PEO was highly increased with higher concentration of PEO as expected. Also, higher proliferation rate of smooth muscle cells was observed at higher concentration of PEO than at the lower concentration and without PEO. As conclusions, this dual electrospinning technique combined with PU and PEO is expected to overcome the current barrier of cell penetration by providing more space for cells to proliferation.

Key words : electrospinning, polyurethane, poly(ethylene oxide), smooth muscle cell, vascular tissue engineering

1. 서 론

심혈관계 질환은 세계적으로 중요한 사망원인중의 하나이며, 특히 관상동맥 질환은 해마다 증가하고 있는 추세이다[1]. 이러한 질환을 해결하기 위한 방법에는 관상동맥우회술 등의 여러 방법이 행해지고 있으나 소구경 혈관을 필요로 하는 질환 같은 경우, 환자에게 맞는 혈관을 찾기 어려우며, 수술을 하기 위한 혈관의 충분한 길이 확보와 혈관을 채취하기 위한 방법 등에서 어려움이 있다[2]. 이러한 문제점을 극복하기 위하여, 많은 연구자들이

인공혈관을 만들기 위해 노력을 기울이고 있다[3].

혈관 조직과 유사한 지지체를 제작하기 위해 particle leaching, freeze drying, fiber bonding, phase separation, or rapid prototyping 등의 많은 방법들이 사용되고 있다[4]. 이 중에서, 전기 방사법을 이용한 나노 섬유 제작은 방법은 최근 들어 주목받고 있는 방법이다. 먼저, 전기 방사된 나노 섬유는 구조적으로 생체 내에서 조직의 재생에 중요한 역할을 하는 세포외기질과 유사하다 [5-8]. 또한, 나노 방사된 지지체의 두께는 여러 가지의 변수를 조정함으로써 쉽게 조절될 수 있다. 그러나 아직 나노 방사된 지지체는 여러 한계점을 가지고 있다. 그 중 하나는 세포가 지지체 안으로 침투하기가 어렵다는 것이다[4, 5, 9]. 지지체의 공극율은 세포의 성장에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[10]. 이러한 문제를 해결하기 위하여, 본 연구에서는 PU와 PEO를 이용한 동시 전기 방사를 실시한 후, 동시 방사된 지지체를 증류수에 담가 PEO를 적출해 냄으

본 연구는 한국과학재단 특장기초연구 (R01-2004-000-10164-0)에 의해 지원되었음.

Corresponding Author : 신정욱
(621-749) 김해시 어방동 607 인제대학교 의용공학과
Tel: 055)320-3841 / Fax : 055)327-3292
E-mail : sjw@bme.inje.ac.kr

로써 다공성을 높이고자 하였다. 본 연구의 기본 개념을 그림 1에 나타내었다.

II. 재료 및 방법

A. PEO 나노 섬유 지지체 제작

PEO를 증류수에 녹여 15, 20, 25, 30, 35wt%의 농도로 용액을 만든 뒤 전기방사를 실시하였다. 각 용액들을 18-G의 10-ml 주사기에 넣은 뒤 시린지 펌프(KD scientific, 781100, USA)에 장착하여 1ml/h의 속도로 방사하였다. 콜렉터와 주사기 간의 방사거리는 15cm으로 고정된 후 15kV의 전압을 가하였다.

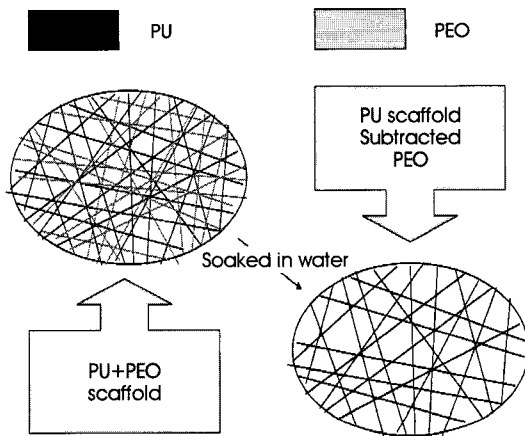


그림 1. 본 연구의 기본 개념
Fig. 1. Concept of this study

B. PU와 PEO의 동시 전기방사법

동시 전기 방사를 위해서 PEO 용액은 25wt%와 35wt%를 준비하였으며 PU (Pellethane 2102-75A; DOW Chemical Corp., MI, USA) 용액의 경우 N,N-dimethylformamide (DMF; Junsei Chemical Co., Japan)에 20wt%의 고정된 농도로 준비하여 방사하였다. 방사 방법은 위에서 언급된 PEO 나노 섬유 방사과 같은 시스템을 이용하여 같은 방법으로 방사하였으며, 콜렉터의 크기는 약 15 cm × 15 cm 였다[그림 2]. 전기방사법에 의한 deposition area와 deposition rate의 차이를 최소화하는 균일한 시편을 얻기 위하여 동시에 방사된 PU와 PEO 섬유가 겹쳐지는 부분 중 가운데 부분만을 선택하여 실험에 사용하였다.

C. 형태학적 분석

전기 방사된 나노섬유의 구조를 살펴보기 위하여 주사전자현미경 (JSM-6700F; JEOL, Japan)을 사용하였다. 시편을 관찰하기 위해 동시 방사된 지지체를 일부는 물에 12시간 동안 담가 PEO를 적출해 낸 후 진공 건조기에 넣어 24동안 말린 후 백금으로 코팅한 후 5kV로 가속하여 관찰하였다. 이를 통해 얻어진 사진을 통해 섬유의 직경을 알아보기 위하여 미국 국립보건원에서 제공하는 이미

지 분석 프로그램(Image J; <http://rsb.infor.nih.gov/ij/docs/index.html>)을 이용하였다.

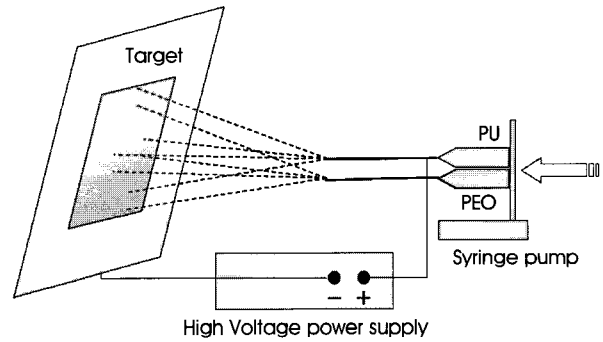


그림 2. 동시 방사의 간략도
Fig. 2. Schemes of dual-electrospinning

D. 세포의 분리 및 배양

실험에 필요한 평활근 세포는 4주된 New Zealand White Rabbit의 대퇴정맥에서 분리하였다[11]. 간단히 요약하여 말하면, 먼저 토기에서 얻어진 대퇴정맥을 PBS용액으로 세척한 다음 0.2% collagenase type I(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA),와 0.1% elastase (Sigma, USA)를 혈관 내에 주입하여 30분동안 37°C에서 반응시킨 뒤 세포 부유액은 버리고, 다시 0.2% collagenase type I(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)을 주입하여 12시간동안 37°C에서 반응시켰다. 이렇게 얻어진 세포 부유액을 1700rpm에서 3분간 원심 분리하여 평활근 세포를 얻었다. 분리된 평활근 세포는 T-75 세포 배양용기에서 10% fetal bovine serum 와 1% penicillin/streptomycin(100U/ml)가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle medium with high glucose (DMEM-HG, Gibco BRL) 배양액에서 배양되었다.

E. 세포 증식 비교 시험

지지체에 대한 세포의 증식을 알아보기 위하여 Cell Proliferation Kit (MTT; Roche Diagnosis Corp., IN, USA)를 사용하였다. 실험을 진행하기 위해서 먼저 동시 방사된 지지체를 물에 12시간 동안 충분히 담가 PEO를 적출해 낸 후, 진공 건조기에서 24시간동안 건조하였다. 그 후, 지지체를 1cm×1cm×200μm로 재단하여 시편을 준비한 뒤, 멸균처리 하여 24-well 세포 배양 용기에 각 시편을 담아두었다. 세포 배양은 단층 배양 했던 평활근 세포를 트립신 처리하여 떼어낸 후 5×10⁴ cells/cm²의 농도로 seeding 하여 7일간 관찰하였다. 세포 배양액은 평활근 세포를 분리할 때와 동일한 조건으로 하였으며, 각 well에 시편이 잠길 수 있도록 200μl의 배지와 20μl의 MTT labeling reagent를 넣은 후 37°C에서 4시간 동안 반응시킨 뒤, MTT solubilization buffer를 200μl를 넣고 12시간 후 96-well에 200μl씩 옮겨 담아 595nm에서 흡광도를 측정하였다. 본 연구에서는 2번까지 계대 배양된 세포를 사용하였으며, 시편은 각각 1, 3, 7일에 분석하였다.

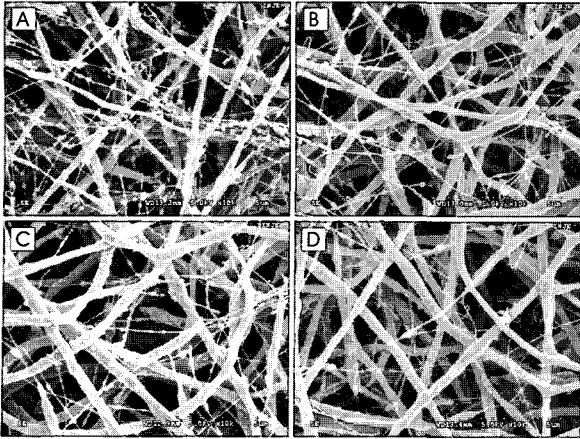


그림 3. PEO 나노 섬유 (A)20wt% (B)25wt% (C)30wt% (D)35wt%
Fig. 3. PEO fibers (A)20wt% (B)25wt% (C)30wt% (D)35wt%

F. 다공성 분석

지지체의 다공성은 한국화학시험연구원에 시험 의뢰하였으며, 수은 침투법에 의해 측정되었다.

G. 통계 분석

본 연구에서 사용된 모든 통계적 분석은 SPSS(Ver.11.0. SPSS INC., USA)를 이용하여 일원배치 분산분석을 실시하였으며, 다중분산 비교는 least significant difference (LSD) 방식을 이용하였다.

III. 결 과

A. PEO나노 섬유의 형태학적 분석

방사된 PEO 나노섬유의 형태가 그림 3 에 나타나 있다. 낮은 농도의 PEO에서는 표면에 비드 형태를 포함한 섬유 모양을 보였으나, PEO의 농도가 높아질수록 비드 형태가 감소하였다. 그리고 섬유의 직경 또한 농도가 증가함에 따라 굵기가 증가하였다. 섬유의 직경은 200-500nm 정도로 나타났으나, 25wt%이상의 농도에서는 형태로만 보았을 때는 차이를 알 수 없었다[그림 4]. 따라서 세포의 증식을 위한 공간을 형성을 비교하기 위하여 25wt%와 35wt%가 채택되었다.

B. 동시 방사된 지지체 특성 분석

동시 방사된 하이브리드 지지체를 12시간 동안 증류수에 담그어 PEO를 적출해 내었다. PEO 나노 섬유가 사라지는 것을 SEM 사진을 통하여 관찰 할 수 있었다[그림 5]. 적출 후 지지체 자체의 모양이 수축되거나 찌그러짐은 거의 보이지 않았으나, SEM 관찰 결과 PEO를 적출하기 전의 PU 섬유의 직경은 평균 420±151nm 였으나, PEO 적출 후 PU의 직경이 591±188nm 정도로 커졌다. 그러나 PEO를 지지체로부터 적출해 냄으로써 다공성이 매우 증가함을 볼 수 있었다[표 1].

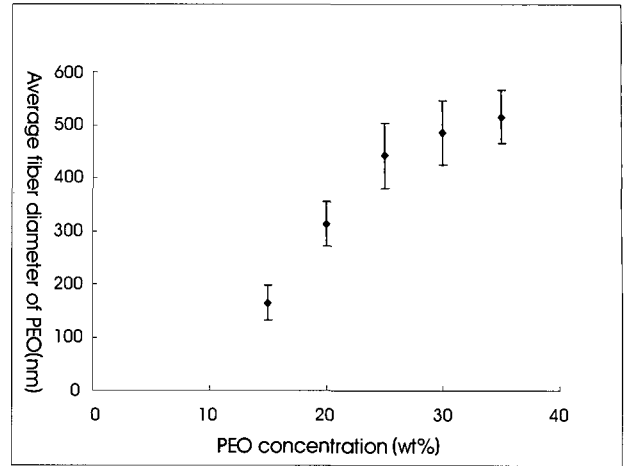


그림 4. PEO 농도에 따른 나노 섬유 직경
Fig. 4. PEO fiber diameter along with its concentration

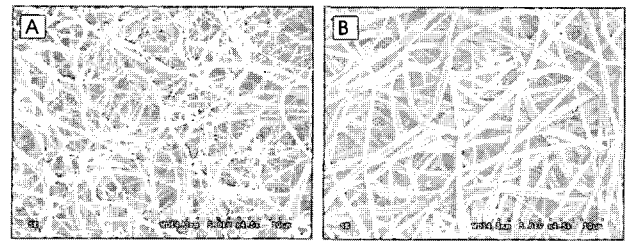


그림 5. PU 와 25wt% PEO로 구성된 하이브리드 지지체 (A) PEO 적출 전 (B) PEO 적출 후
Fig. 5. Hybrid scaffolds of PU and 25wt% PEO (A) Before the PEO extraction (B) After the PEO extraction in distilled water

표 1. 지지체의 다공성 측정

Table 1. Porosity of scaffolds

Group	PU only	PU(PEO) : 20(35) (not extracted PEO)	PU(PEO) : 20(35) (extracted PEO)
Porosity (%)	19.87	26.49	76.40

C. 평활근 세포의 증식 평가

지지체에 seeding된 SMC는 시간이 지남에 따라 증식하였다. 전체적으로 PEO를 사용하여 만든 지지체가 PU만을 이용하여 만든 지지체에 비해 높은 증식률을 보였으며, 특히 35wt%의 PEO를 사용하여 만든 지지체가 25wt%의 PEO를 사용하여 만든 지지체에 비해 7일째에 유의한 증식률을 보였다[Fig. 6].

IV. 고 찰

세포외기질이 세포의 형태나 증식, 기능, 세포간의 상호작용에 영향을 준다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다. 생체 조직에서 세포는 수백 나노에서 수 마이크로 크기의 물리적인 구조를 가지는 세

포외기질에 둘러싸여 있으며, 이러한 나노미터 크기의 세포 외기질의 구조는 조직공학 분야에 많은 적용 가능성을 가지고 있다. 나노 섬유구조를 가지는 지지체를 합성하기 위한 방법으로 최근에 도입된 전기방사법은 그 방법이 간단하여 널리 사용되고 있는 방법이다.

조직공학의 주요 목적중의 하나는 생체조직과 유사한 3차원 구조를 생체에 제공하는 것이다. 혈관벽은 크게 내막, 중막, 외막의 층 구조로 이루어져 있다. 이 층들은 서로 다른 세포로 이루어져 있는데, 내막의 경우에는 주로 내피세포로 이루어져 있고, 중막의 경우에는 평활근세포, 외막의 경우에는 결합조직으로 각각 이루어져 있다. 세포는 성장 및 분화를 위해 다공성의 구조를 필요로 한다. 그러나 PU만으로 방사된 지지체의 경우에는 나노 섬유가 다른 종류의 표면에 비해 상대적으로 개선된 표면을 제공함에도 불구하고, 세포가 지지체 안으로 침투할 수 있는 공간이 충분하지 않다. 그러므로 세포가 지지체 안으로 침투할 수 있도록 적출해 낼 수 있는 재료를 사용하여 3차원적으로 충분한 공간을 만들어 줄 수 있는 방법이 필요하다. 그러나 너무 높은 다공성은 혈액의 누설을 야기할 수 있으므로 이를 방지할 수 있도록 적절하게 조절되어야 한다.

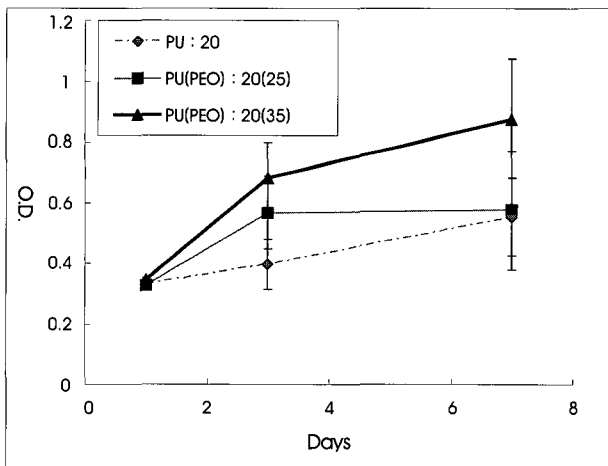


그림 6. 하이브리드 지지체에서의 평활근 세포의 증식
Fig. 6. Proliferation of SMCs with various scaffolds

이러한 조건을 충족시키기 위해서 동시 전기 방사시스템이 도입되었다. 먼저 PEO의 농도가 섬유의 형태에 영향을 주는 지를 알아보기 위해 PEO용액을 농도 별로 방사하였다. 방사된 나노 섬유는 낮은 농도에서는 일정한 형태를 보이지 않았다. 이것에 기초하여 동시방사에서는 25wt%와 35wt%의 두 가지 농도가 선택되었다. PEO를 동시 방사된 지지체에서 적출해낸 후 놀랄만한 다공성의 증가가 확인되었다. 또한 MTT assay에서, 35wt%의 PEO를 사용한 군이 PU만 사용한 군보다 유의하게 높은 증식률을 보인 것은 물론, 25wt%의 PEO를 사용한 군에 비해서도 더 높은 증식률을 보였다[Fig. 6]. 이러한 결과는 농도가 증가함에 따라 PEO 섬유의 직경이 커지면서 pore size의 증가와 다공성의 증가에 따른 결과

라고 예상할 수도 있겠으나 농도에 따른 flow rate의 차이나 샘플의 채택 지역에 따른 차이일 가능성 또한 크다. 용액의 flow rate의 경우, 본 실험에서는 시린지 펌프가 아닌 중력을 이용하였기 때문에 값을 측정하는 데에 어려움이 있었으며, 공극률에 의한 차이는 추후 각 군별과 샘플 채택 지역에 따른 공극률의 차이가 있는지가 확인 되어야 할 것이다.

다른 연구에서는 주로 PEO를 이용한 blending 기법이 소개되었다. 그러나 본 연구에서는 blending 기법이 아닌 동시 방사 방법을 사용함으로써 기존 방법에 비해 구조적인 손상을 최소화하고 PU의 구조를 유지할 수 있도록 하였다. 또한 세포가 seeding 되기 전에 PEO를 적출해 냈음에도 불구하고 세포가 seeding 된 후에도 PEO가 지지체에 남아있을 가능성이 있다. 그러나 본 연구에서는 PEO가 적출되지 않았을 때 세포에 줄 수 있는 영향을 배제하였다. 추후 FT-IR과 같은 실험을 통하여 PEO의 잔류 여부에 대한 확인이 필요할 것이다.

V. 결론

PEO와 PU의 동시 방사가 본 연구에서 성공적으로 수행되었으며, 세포의 형태, 세포 응답, 지지체의 다공성 등을 통해 그 가능성을 확인하였다. 다음 연구에서는 동시 방사된 지지체의 최적조건을 찾아 평가, 확인하고, 세포의 분화나 평활근 세포 위에 내피세포를 seeding 한 후의 세포간의 상호작용에 대한 연구가 추후 진행되어야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

- [1] V. Barron, E. Lyons, C. Stenson-cox, P.E. Mchugh, and A. Pandit, "Bioreactors for cardiovascular cell and tissue growth: a review," *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 31, pp. 1017-1030, 2003.
- [2] C. T. Anita, R. C. Gordon, J. H. Compbell, "Advances in vascular tissue engineering," *Cardiovascular pathology*, vol. 12, pp. 271-276, 2003.
- [3] L. Xue, H. P. Greisler, "Biomaterials in the development and future of vascular grafts," *J. Vasc. Surg.*, vol. 37, pp. 472-480, 2003.
- [4] X. M. Mo, C. Y. Xu, M. Koraki, S. Ramakrishna, "Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation," *Biomaterials*, vol. 25, pp. 1883-1890, 2004.
- [5] C. Xu, R. Inai, M. Kotaki, S. Ramakrishna, "Electrospun nanofiber fabrication as synthetic extracellular matrix and its potential for vascular tissue engineering," *Tissue Engineering*, vol. 10, no. 7/8, pp. 1160-1168, 2004.
- [6] C. H. Lee, H. J. Shin, I. H. Cho, Y. M. Kang, I. A. Kim, K. D. Park, J. W. Shin, "Nanofiber alignment and direction of mechanical strain affect the ECM production of human ACL fibroblast," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 1261-1270, 2005.
- [7] W. He, Z. W. Ma, T. Yong, W. E. Teo, S. Remakrishna, "Fabrication

of collagen-coated biodegradable polymer nanofiber mesh and its potential for endothelial cells growth," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 7606-7615, 2005.

[8] K. S. Haas, S. J. Phillips, A. J. Comerota, J. V. White, "The architecture of adventitial elastin in the canine infrarenal aorta," *The Anatomical Record*, vol. 230, pp. 86-96, 1991.

[9] H. Yoshimoto, Y.M. shin, H. Terai, J. P. Vacanti, "A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 24, pp. 2077-2082, 2004.

[10] S. W. Suh, J. Y. Shin, J. H. Kim, J. G. Kim, K. H. Kil, "Effect of gelatin particles on cell proliferation in polymer scaffolds made using particulate leaching technique," *J. Biomed. Eng. Res.*, vol.25, no.1, pp. 1-4, 2004.

[11] S. H. Lee, B. S. Kim, S. H. Kim, S. W. Choi, S. I. Jeong, I. K. Kwon, S. W. Kang, J. Nikolovski, D. J. Mooney, Y. K. Han, Y. H. Kim, "Elastic biodegradable poly (glycolide-co-caprolactone) scaffold for tissue engineering," *J. Biomed. Mater Res. A*, vol. 66, no.1, pp. 29-37, 2003.