

신경세포 재생을 위한 고배열성 Poly(ϵ -caprolactone) 마이크로/나노섬유 제조 공정에 관한 연구

윤 현* · 이행남** · 박길문** · 김근형*,**,*†

*조선대학교 치의공학과, **조선대학교 기계공학과, 바이오/나노유체실험실
(2009년 8월 10일 접수, 2009년 10월 1일 수정, 2009년 10월 1일 채택)

Fabricating Highly Aligned Electrospun Poly(ϵ -caprolactone) Micro/Nanofibers for Nerve Tissue Regeneration

Hyeon Yoon*, Haengnam Lee**, Gil-Moon Park**, and GeunHyung Kim***,†

*Department of Dental Engineering, School of Dentistry,
Chosun University, Gwang-ju 501-759, Korea

**Bio/Nanofluidics Lab, Department of Mechanical Engineering,
Chosun University, Gwang-ju 501-759, Korea

(Received August 10, 2009; Revised October 1, 2009; Accepted October 1, 2009)

초록: 전기방사공정에 의해 고분자의 나노 크기의 섬유를 만드는 기술로 널리 사용되어졌으며, 제작된 나노섬유는 그 높은 표면적과 형태학적 특성때문에 조직재생 공학분야에서 많이 사용되어져 왔다. 본 연구에서는 기존의 전기방사공정을 개선한 복합전기장을 이용하여 생분해성/생체적합성 poly(ϵ -caprolactone) (PCL) 마이크로/나노섬유를 제작하였고, 기존의 나노섬유의 배열성보다 제어가 가능한 배열성을 갖는 공정시스템을 통하여 보다 우수한 배열성을 갖는 PCL 나노섬유를 제작하였다. 고배열된 PCL 나노섬유는 신경세포 재생을 위한 세포담체로서의 가능성을 확인하고자 신경세포(PC-12)를 배양하였으며 그 결과 높은 배열성을 갖은 PCL 나노섬유 매트에서 신경세포의 배열성이 언어짐을 확인하였다.

Abstract: Recently, an electrospinning process, which is one of various nanotechnologies, has been used in fabricating micro/nanosized fibers. The fabricated electrospun micro/nanofibers has been widely applied in biomedical applications, specially in tissue regeneration. In this study, we fabricated highly aligned electrospun biodegradable and biocompatible poly(ϵ -caprolactone) (PCL) micro/nanofibers by using a modified electrospinning process supplemented with a complex electric field. From this process, we can attain highly aligned electrospun nanofibers compared to that fabricated with the normal electrospinning process. To observe the feasibility of the highly aligned electrospun mat as a biomedical scaffold, nerve cells(PC-12) was cultured and it was found that the cells those were well oriented to the direction of aligned fibers.

Keywords: a complex field electrospinning process, micro/nanofiber, poly(ϵ -caprolactone), nerve cells.

서 론

나노기술에 대한 연구가 전 세계적으로 활발히 진행되고 있는 가운데, 나노기술의 한 응용분야로서 나노섬유를 만들어 낼 수 있는 전기방사기술은 1934년과 1944년 사이에 독일 공학자 Formals가 정전기력을 이용한 고분자 필라멘트 생산기술에 관한 특허를 출원한 이후 1970년대부터 본격적인 연구가 시작되었다. 그리고 2000년 이후, 전기방사 공정 자체에 대한 이론적 해석과 모사에 관하여 활발히 연구되고 있다.¹⁻⁸ 일반적으로 나노섬유를 제작하는 전기방사의 원리는 표면장력(surface tension)에 의해 방사노즐 끝에 있는 고분자 용액에

수 kV 이상의 고전압을 가하여, 고분자 용액은 테일러 콘(Taylor cone)으로 변형된다. 이때 전기적 반발력(electrostatic force)이 표면장력보다 강해지면 고분자용액은 whipping zone을 형성하며 나노섬유를 만든다. 이렇게 제작된 나노섬유는 직경이 약 수나노에서 수마이크론 크기의 섬유로서 부피에 비해 표면적이 크기 때문에 필터로 사용하였을 때 탁월한 여과 효과를 볼 수 있으며, 호흡성이 있어 세균 등의 침투를 막는 방어복이나, 약물 전달 시스템 등 다양한 분야에서 활용되어져 왔다.⁹⁻¹² 이러한 나노섬유는 또한 바이오메디칼 용도로서도 사용되어져 왔는데, 특히 세포를 재생시키는 분야에 적용되어 왔다. 최근 이러한 연구는 조직의 비등방성적인 기계적인 특성을 모사할 수 있는 배열성이 우수한 나노섬유의 제작에 많은 관심을 가져 왔다. 최근 Shin 등은 배열성을 조절한 나노섬유에 세포실험을 하였

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: gkim@chosun.ac.kr

으며 그 결과 배열성이 우수할수록 ECM이 증가하는 것을 확인하였으며 이는 세포 증식이 향상되었다는 것을 의미한다.¹³ 또한, Banker 등에 의하면 신경세포의 성장 및 부착을 조절하기 위하여 미세가공 기술을 사용하였으며,¹⁴ Knoll 등은 쥐 뇌간과 피질의 신경원들이 부착된 후 신경돌기는 미세패턴화된 홈을 따라 신경 세포가 성장하는 것을 확인하였다.^{15,16} 또한, 분리된 신경원들과 뇌절편에서 선 또는 격자형태의 패턴을 따라 세포 부착 및 신경돌기의 성장이 관찰되었다.¹⁵ 또한, P. Yilgor에¹⁷ 의하면 3차원 세포 담체의 탄성률의 변화에 대한 세포의 증식영향을 관찰하였다. 결과에 따르면, 탄성저장계수가 감소할수록 줄기세포가 증식됨을 보였다. 그러나, 이러한 구조는 세포담체의 표면적에 의해서도 영향을 받을 수 있기 때문에 순수한 탄성계수 변화에 따른 세포접착 및 증식의 효과는 알 수 없었다.

이러한 배열성이 우수한 나노섬유는 일반적으로 전기방사장치의 롤러 회전 속도에 밀접하게 관련되어 있다. 그러나 기계적으로 나노섬유를 배열시키는 방식은 롤러의 속도의 한계성 때문에, 새로운 방식이 요구되고 있다. 이러한 문제점들을 극복하기 위하여 Xia 등은 타겟전극을 분리하여 분리된 영역과 전극과의 유전율상수 차이를 이용한 섬유배열성을 연구하였고,¹⁸ Yarin과 Ramakrishna 등은 날카로운 회전 롤러를 제작하여 섬유의 배열성을 촉진하는 연구를 진행하였다.^{19,20} 또한, Kim은 타겟에 교류전기장을 추가하여 램던화된 섬유를 배열하는 방식을 채택하기도 하였다.²¹

이렇게 배열된 나노섬유에 신경 세포를 배양하였을 경우 기존의 미세가공패턴에 신경세포를 배양할 경우와 마찬가지로 신경세포의 성장을 유도할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 기존의 본 그룹에서 제작하는 방식인 교류전기장을 이용한 복합전기장을 이용하여, 기존의 평판 타겟에 가하던 복합전기장을 롤러 타겟에 적용하여 배열성이 우수한 나노섬유를 제작하였다. 또한, 제작한 나노섬유에 신경세포를 배양하였으며, 그 결과 세포의 배양 방향이 나노섬유의 배열 방향과 유사한 방향으로 성장하는 것을 확인하였다.

실 험

재료. 본 연구에서는 17 wt%의 PCL($M_n=60000$, Aldrich)을 재료로 사용하였으며, 용매로는 DMF(*N,N*-dimethyl formamide, junsei chemical co.)와 MC(methylene chloride, junsei chemical co.)를 8:2로 혼합하여 사용하였다.

분석. 나노섬유의 초기 jet과 stretching motions를 분석하기 위하여 사진촬영을 하였으며 초기 jet의 길이와 stretching zone의 영역 등을 분석하였다. 전기 방사된 나노섬유의 직경을 측정, 분석하기 위하여 주사전자현미경(SEM, S-4800, Hitachi)을 이용하였으며, 마이크로/나노섬유의 저장탄성률(storage modulus)을 측정하기 위해 나노섬유 매트 시편을 가로×세로 각각 3 mm×10 mm로 만들었으며 현미경을 이용하여 두께를 측정하였고, 동적기계측정기(DMA-Q800, TA instrument)를 이용하여 저장탄성률을 측정하였다.

실험 조건 및 분석. 전기방사장치의 구성요소로 고전압 전원 공급장치(high voltage power supply, HVPS, SHV200 40 kV/5 mA, convertch), 실린지 펌프(syringe pump, model 781100, KD Science), 컬렉터, 보조전극(auxiliary electrode), 노즐을 이

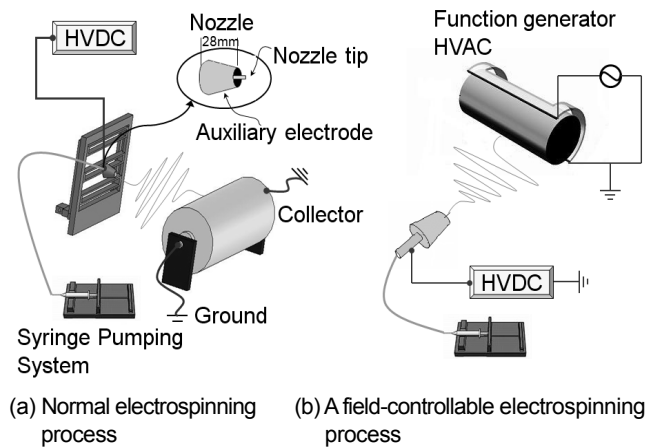


Figure 1. Schematics of (a) a normal electrospinning process; (b) an AC-Field-controllable electrospinning process.

용하였다.

교류전압 및 주파수를 조절하기 위하여 function generator(model WF 1944B, NF Corporation)를 사용하였으며 발생된 교류전압을 증폭시키기 위하여 high voltage amplifier(610E, Trek)를 사용하였다. 이렇게 만들어진 교류 전압 및 주파수를 확인하기 위하여 오실로스코프를 사용하였다.

Figure 1(a)에서와 같이 노즐의 위치는 컬렉터(collector)부터 140 mm 떨어진 곳에 있으며 노즐은 보조전극으로부터 4 mm 돌출시켜 고전압을 걸어주어 전기장에 의해 방사하였다. 전기 방사시 노즐에 고전압, 시간, 거리 등의 동일한 조건에 의해 방사하였다. 방사의 고전압은 20 kV로 설정하였으며 PCL-용액은 20 G의 노즐을 장착한 10 mL 주사기에 넣은 후 실린지 펌프를 이용하여 3 mL/h의 속도로 주입하여 10분간 전기방사하였다. 또한, 컬렉터의 회전속도는 각각 3.1 m/sec(300 rpm)과 8.4 m/sec(1300 rpm)으로 고정하였다. 교류전압을 사용한 경우 직류전압을 20 kV로 고정된 후 교류의 전압은 5 kV, 주파수를 20 Hz에서 500 Hz로 변경하여 실험하였다. 각각 동일한 직류 전압의 방사 조건과 교류 전압 및 주파수에 의해 제작된 나노섬유는 SEM을 이용하여 관찰하였다.

세포배양 세포는 PC 12 세포(Pheochromocytoma, CRL-1721, ATCC)를 사용하였다. 세포배양을 위한 배지는 F-12 K(Kaighn's Modification of Han's F-12, ATCC)에 10% FBS(Fatal Bovine Serum, Hyclone)과 1% antibiotics(Penicillin-Streptomycin, 10000 unit/mL, Hyclone)를 혼합하여 사용하였다. PC-12세포의 성장을 증진시키고자 베타신경성장인자(beta nerve growth factor)(rhβ-NGF, R&D)를 사용하였다. 세포 배양을 위한 나노섬유는 직경 1.6 cm의 원형 매트 사용하였으며 각 매트에는 약 1×10^5 cell/50 μ L의 세포를 사용하였고 7일후 세포의 성장 결과를 SEM(S-4800, Hitachi)을 이용하여 확인하였다.

결과 및 토론

본 연구에서 사용된 컬렉터부분에 적용된 복합전기장은 Kim에 의해서 자세히 설명되어져 있으며, 다음은 이를 간단히 요약한 내용이다.²¹ 복합전기장을 타겟에 적용하였을 때, 다음과 같은 메커니즘에 의해

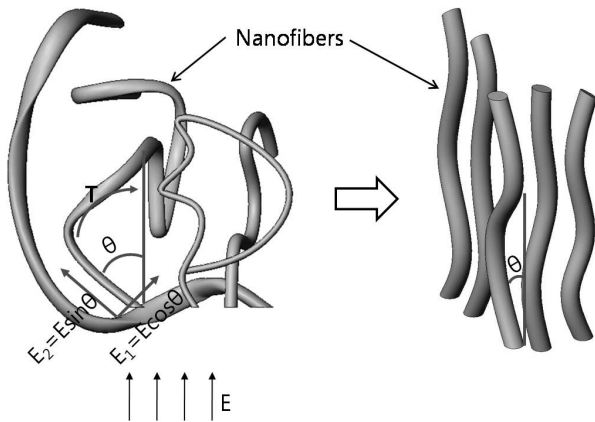


Figure 2. Schematic description of the alignment of electrospun fibers in an electric field.

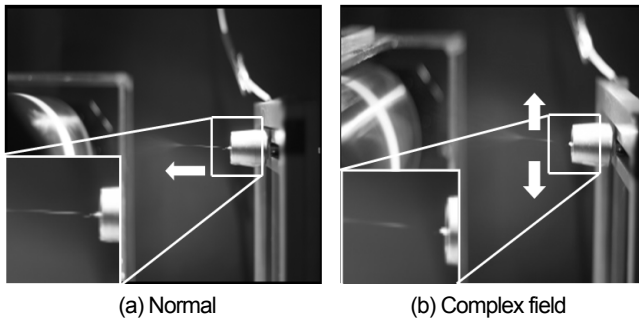


Figure 3. Initial jets for (a) a normal electrospinning process; (b) a complex field electrospinning process.

서 나노섬유를 전기장의 방향으로 배열시키게 한다. 일반적으로 섬유모양의 파티클이 전기장하에 놓이게 되었을 때 Figure 2와 같은 쌍극자 모멘트(dipole moment, μ)가 발생하게 된다. 이렇게 발생된 쌍극자 모멘트는 전기장의 방향으로 토크(T)가 발생되어 이러한 토크를 최소화하기 위하여 전기장의 방향으로 배열을 하게 된다. Figure 2는 이러한 전기장에 의해 배열되는 섬유들의 배열 방향을 나타낸 모식도이다. 이러한 토크는 다음 식으로 표현될 수 있다.^{21,22}

$$T = \mu \times E = 0.5 V \epsilon_0 K_T(\omega) E^2 \sin 2\theta$$

위 식에서 V 는 섬유의 부피, $\epsilon_0 (=8.854 \times 10^{-12} \text{ F/m})$ 는 자유공간에서의 유전율상수, 무차원 파라미터 $K_T(\omega)$ 는 섬유의 유전율상수와 전기전도성으로 구성된 상수값, E 는 전기장, θ 는 각도, ω 는 주파수이다. 섬유의 분극에 기인하는 토크는 전기장의 방향으로 섬유를 정렬시키고 최대 토크(maximum torque)의 θ 값은 45° 가 될때 최대가 된다.²¹

이러한 이론적인 내용에 근거하여 본 연구에서는 컬렉터부분에 교류전기장을 가하여 PCL 섬유의 배열성을 유도하였다. Figure 3은 컬렉터 부분의 전기장을 가하였을 때 노즐부분의 변화에 대하여 도시한 그림이다. Figure 3(a)는 노즐에 직류 전압만을 가하였을 때 얻어진 노즐의 초기 jet을 도시한 그림이며, Figure 3(b)는 노즐에 직류 전압과 컬렉터부위에 교류 전압을 가하였을 때의 초기 jet을 찍은 사진

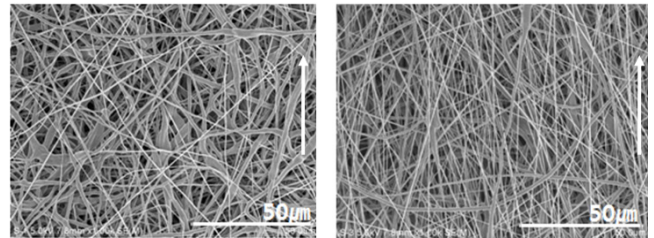


Figure 4. SEM photographs of (a) nanofibers electrospun with a normal electrospinning; (b) with an AC field controllable electrospinning process.

이다. Figure 3(a)에서와 같이 직류전압만을 사용하였을 때는 Taylor cone이 움직이지 않으며 방사됨을 알 수 있었다. 반면, 컬렉터에 교류 전기장을 사용하였을 때 초기 방사점이 교류전압의 Coulomb force와 electrostatic force의 영향으로, 전기장의 방향에 따라 상하로 움직이는 현상을 관찰할 수 있었다(Figure 3(b)). 이러한 두 가지 정전기적인 힘으로 인하여 일반적인 직류 전기장에 의해 제작된 나노섬유보다 훨씬 높은 배열성을 갖는 나노섬유를 얻을 수 있을 것으로 예상되었다.

Figure 4는 직류 전압과 교류 전압의 변수를 이용하여 제작한 나노섬유의 SEM 결과를 비교한 것이다. Figure 4(a)는 직류 전압만을 사용한 일반적인 전기방사공정을 통하여 얻어진 결과이며, Figure 4(b)는 직류와 교류를 동시에 사용한 복합전기장을 통하여 얻어진 결과이다.

Figure 4(a)는 롤러의 회전이 3.1 m/s 임에도 불구하고(화살표는 회전 방향), 나노섬유의 배열이 매우 불규칙적이며 섬유의 배열이 롤러의 회전방향으로 이루어지지 않은 것을 알 수 있었다. 반면, Figure 4(b)에서 확인할 수 있듯이 롤러에 교류전기장을 사용하였을 경우 일반 전기장만을 사용한 나노섬유보다 우수한 나노섬유의 배열성이 얻어짐을 알 수 있었다. 즉, 교류를 이용한 복합전기장을 사용함으로써 초기 jet의 움직임을 조절하고, 롤러에서 발생하는 torque에 의해서 방향성이 없는 섬유를 배열시킬 수 있었다. 롤러의 회전 속도를 8.4 m/s로 하였을 때 롤러에 교류전기장을 가할 때와 가하지 않을 때의 배열성은 아주 높게 나타났으며, 이들 간 배열성의 차이는 거의 없음을 알 수 있었다. 이러한 원인은 높은 롤러의 속도로 인하여 외부전기장이 주는 영향이 낮아짐 때문으로 예상할 수 있었다.

Figures 5와 6의 결과 분석은 Figure 4의 SEM 이미지를 각각 4등분하여 각 구역에서 50곳, 총 200곳의 나노섬유 직경 및 방향을 측정하였다. 측정된 결과는 origin software를 이용하여 분석하였으며 도표화한 결과이다.

Figure 5의 결과처럼 롤러의 회전방향과 일치할 때의 각도를 90° 로 설정하여 나노섬유가 분포되어 있는 각도를 측정하였다. 그 결과 좋은 배열성을 보인 것은 롤러에 교류전기장을 사용하였을 때임을 알 수 있었다.

Figure 6은 나노섬유의 SEM 이미지를 두께별 분포도로 표시한 그림이다.

Table 1과 같이 컬렉터의 회전속도가 증가할수록 섬유의 평균직경은 작아짐을 알 수 있었으며, 복합전기장을 사용하였을 때 그 크기

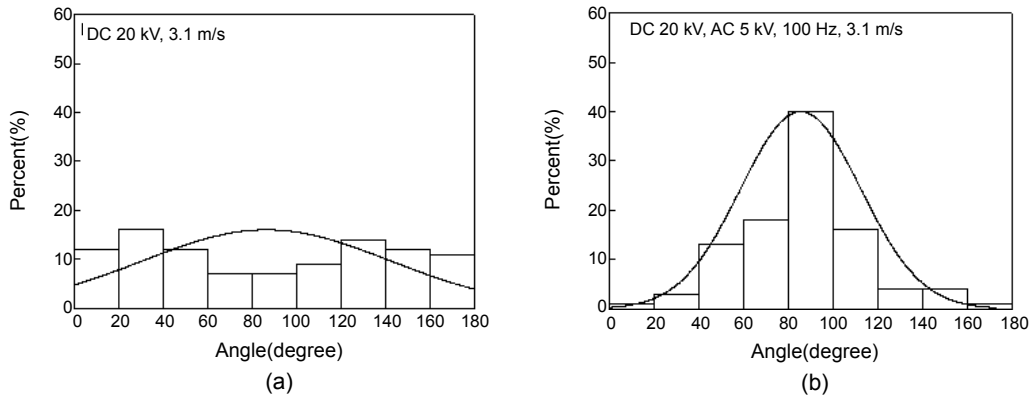


Figure 5. Alignment of nanofibers electrospun with a normal electrospinning (a); AC field controllable electrospinning (b).

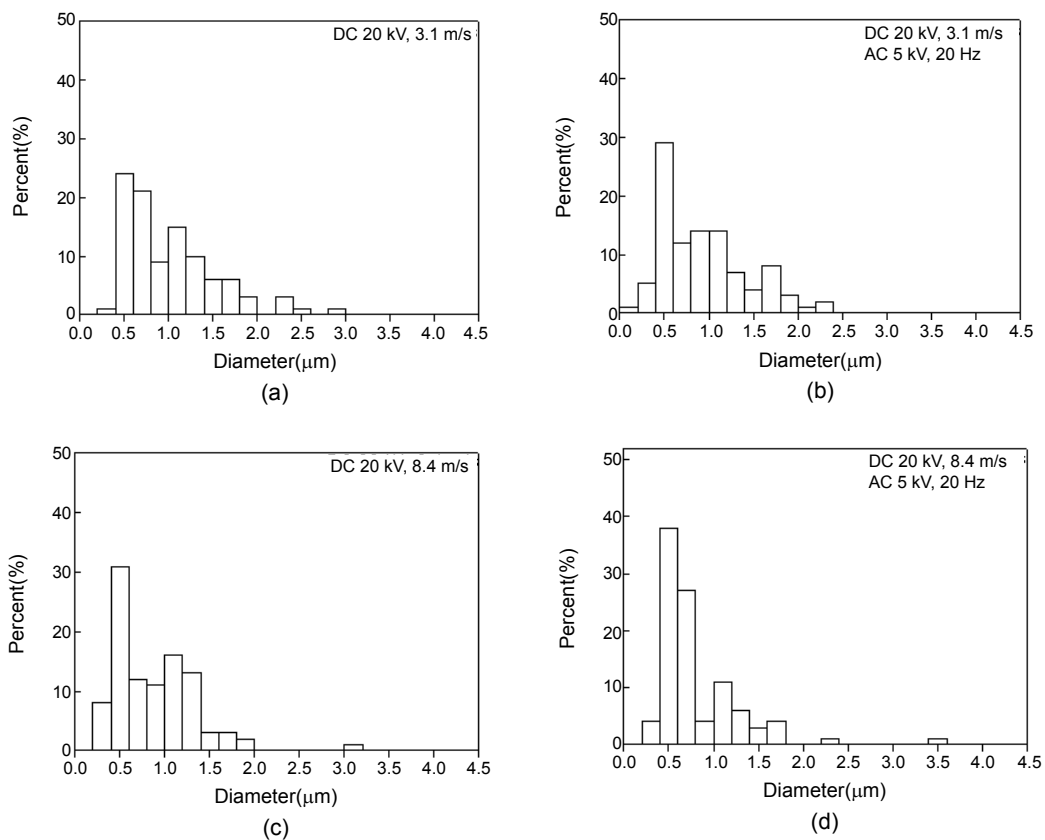


Figure 6. The average diameter distribution of electrospun fibers for a normal electrospinning process ((a) and (c)) and for a modified electrospinning process ((b) and (d)).

는 더 작아지는 경향을 보임을 알 수 있었다.

이러한 특성은 복합전기장을 사용함으로써 인하여 컬렉터부분에서 나노섬유의 stretching 현상이 발생하여 얻어진 결과로 예상된다. 하지만, 이러한 결과는 좀 더 많은 실험적인 결과를 통하여 검증이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

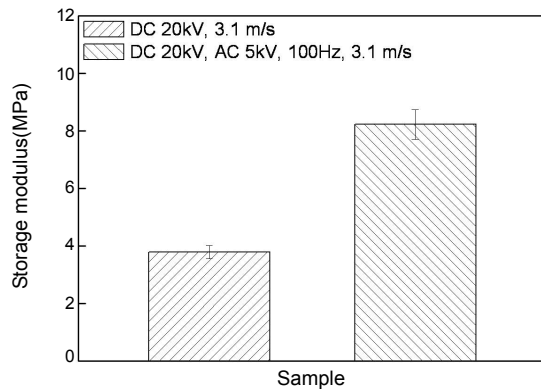
Figure 7은 나노섬유매트의 저장탄성률(측정조건 : 변형률=2%, 온도=30 ℃)을 측정된 것으로, 회전 컬렉터의 속도는 3.1 m/s이며 교류전압은 5 kV, 주파수는 각각 100 Hz에서 얻어진 시료를 통하여 얻어진 결과이다. 시료는 컬렉터의 회전방향을 기준으로 직사각형 형태

(3 mm×10 mm)을 만든 후 컬렉터의 회전방향과 일치하게 시료를 잘라서 측정하였다. 일반적으로 기계적인 특성은 섬유의 배열성(alignment) 및 배향성(orientation)에 의해서 그 특성이 달라지기 때문에, 배열성이 우수한 나노섬유의 매트가 더 좋은 기계적인 특성을 보임을 예상할 수 있었으며, 이러한 예상은 Figure 7의 실험결과와 일치됨을 알 수 있었다.

Figure 8은 배열된 나노섬유의 인장강도를 배열 방향과 배열 방향의 수직 방향으로 측정한 결과이다. 배열된 나노섬유의 강도를 측정하였으며 그 결과 섬유의 배열 방향으로 탄성계수가 약 10배 이상 증가됨

Table 1. Average Diameter and Standard Deviation of Electrospun Fibers Fabricated by a Normal Electro-Spinning and a Modified Electrospinning Process

	DC field		DC+AC field	
Collector speed(m/s)	3.1	8.4	3.1	8.4
Diameter(μ m)	1.03 ± 0.53	0.89 ± 0.46	0.96 ± 0.49	0.79 ± 0.48

**Figure 7.** Comparison of storage moduli of electrospun nano-fiber mats.**Table 2. Mechanical Properties of Electrospun Mats for Parallel($\parallel$) and Perpendicular($\perp$) Direction to the Rolling Collector**

	Electrospun mat ($\parallel$)	Electrospun mat ($\perp$)
Young's modulus(MPa)	11.6 ± 2.3	0.9 ± 0.1
Maximum stress(MPa)	1.2 ± 0.1	0.4 ± 0.2
Break strain(%)	47.1 ± 4.6	145.5 ± 5.3

을 알 수 있었다.

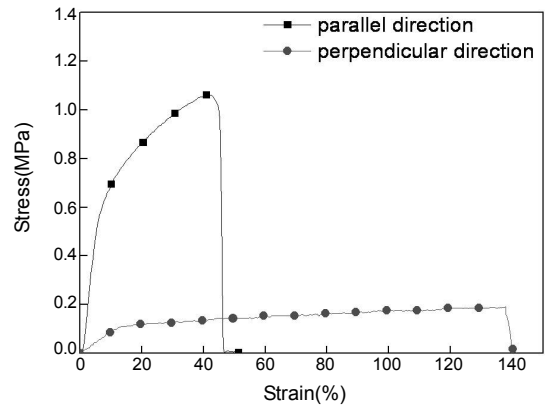
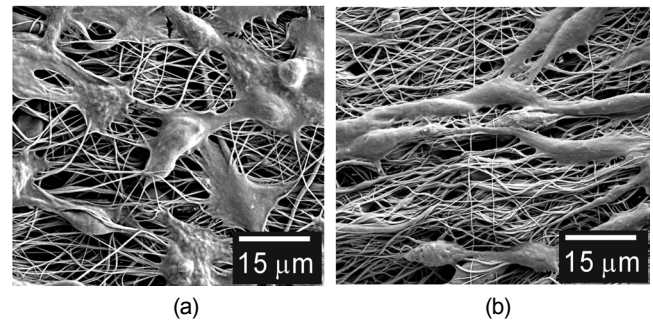
Table 2는 Figure 8의 결과를 정리한 도표로써 그 결과처럼 나노섬유의 배열 방향에 따른 기계적인 강도가 차이가 남을 확인할 수 있었다.

Figure 9는 신경세포가 배열된 PCL 섬유에서 세포와 배열된 섬유 간의 접촉유도특성(contact guidance)에 의해서 섬유의 배열 방향으로 성장된 결과를 나타낸 결과이다.

Figure 9의 결과는 배열된 PCL 마이크로/나노섬유의 매트에 PC-12 세포를 배양한 것으로써, Figure 9(a)는 나노섬유가 배열되지 않은 세포담체로서 세포의 성장 방향이 불규칙적으로 증식된 것을 확인할 수 있었다. 반면, Figure 9(b)는 배열된 마이크로/나노 PCL 섬유 매트로서 세포의 성장 방향이 나노섬유의 배열 방향과 거의 일치하는 것을 알 수 있었다. 일반적으로 신경세포는 한 방향으로 증식하는 것이 특징이며, 본 연구에서는 배열성이 우수한 마이크로/나노섬유매트에서 신경세포가 한 방향으로 배열이 이루어짐을 확인할 수 있었다.

결 론

마이크로/나노섬유를 전기방사공정으로 제작함에 있어서, 기존의 전기방사공정에 복합전기장을 사용함으로써 나노섬유의 배열성을 효과적으로 높일 수 있었으며, 이러한 배열성의 조절로 높은 기계적 특

**Figure 8.** Comparison of stress-strain curves of electrospun mats with parallel($\parallel$) and perpendicular($\perp$) direction to the rolling collector.**Figure 9.** SEM images of cultured PC-12 cells after 7 days on PCL micro/nanofibrous webs fabricated with (a) a normal electrospinning process and (b) the modified electrospinning process under a constant speed of the rotating collector, 3.1 m/s.

성을 얻을 수 있었다. 배열된 마이크로/나노섬유에서 신경세포가 나노섬유의 배열 방향으로 증식이 되는 것을 확인하였으며 이는 배열된 나노섬유가 손상된 신경세포의 재생 및 증식에 도움이 될 것으로 예상되며, 향후 이렇게 만들어진 마이크로/나노섬유는 다양한 이방성 특성을 갖는 tendon 혹은 meniscus 등을 재생하는 효과적인 수단으로 사용될 것으로 예상된다.

참 고 문 헌

1. S. W. Chun, *Fiber Technology and Industry*, **12**, 2 (2008).
2. A. Formhals, US Patent 1, 975, 504 (1934).
3. G. I. Taylor, *Proceedings of Royal Society of London*, **A280**, 383 (1964).
4. D. H. Reneker, A. L. Yarine, H. Fong, and S. Koombhongse, *J. Appl. Phys.*, **87**, 4531 (2009).
5. J. Doshi and D. H. Reneker, *J. Electrostat.*, **35**, 151 (1995).
6. H. Fong, I. Chun, and D. H. Reneker, *Polymer*, **40**, 16, 4585 (1999).
7. J. M. Deizel, J. Kleinmeyer, D. Harris, and N. C. B. Tan, *Polymer*, **42**, 261 (2001).

8. M. M. Hohman, M. Shin, G. C. Rutledge, and M. P. Brenner, *Physics of Fluids*, **13**, 2201 (2001).
9. G. T. Kim, Y. C. Ahn, J. K. Lee, N. Kattamuri, and C. M. Sung, *ILASS-Korea*, **8**, 31 (2003).
10. H. Yoon, G. H. Kim, and W. D. Kim, *Polymer(Korea)*, **32**, 4, 1 (2008).
11. J. M. Deitzel, W. Kosik, S. H. McKnight, N. C. B. Tan, J. M. DeSimone, and S. Crette, *Polymer*, **43**, 1025 (2002).
12. D. H. Reneker and I. Chun, *Nanotechnology*, **7**, 216 (1996).
13. C. H. Lee, H. J. Shin, I. H. Cho, Y. M. Kang, I. A. Kim, K. D. Park, and J. W. Shin, *Biomaterials*, **26**, 1261 (2005).
14. A. A. Oliva, C. D. James, and C. E. Kingman, *Neurochem. Res.*, **28**, 1639 (2003).
15. C. K. Yeung, L. Lauer, and A. Offenhausser, *Neurosci. Lett.*, **301**, 147 (2001).
16. A. K. Vogt, G. Wrobel, and W. Meyer, *Biomaterials*, **26**, 2549 (2005).
17. P. Yilgor, R. A. Sousa, R. L. Reis, N. Hasirci, and V. Hasirci, *Macromol. Symp.*, **269**, 92 (2008).
18. D. Li, Y. Wang, and Y. Xia, *Nano Letters*, **3**, 1167 (2003).
19. E. Zussman, A. Theron, and A. L. Yarin, *Appl. Phys. Lett.*, **82**, 973 (2003).
20. Z.-M. Huang, Y. Z. Zhang, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, *Compos. Sci. Technol.*, **63**, 2223 (2003).
21. G. H. Kim, *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.*, **44**, 1426 (2006).
22. T. B. Jones, *J. Electrostat.*, **6**, 69 (1979).