

전기방사를 이용한 조직공학용 실크 피브로인 나노 섬유 지지체의 기공 크기 조절

조세연 · 박현호 · 진형준[†]

인하대학교 나노시스템공학부 고분자신소재공학전공
(2012년 3월 27일 접수, 2012년 5월 1일 수정, 2012년 5월 15일 채택)

Controlling Pore Size of Electrospun Silk Fibroin Scaffold for Tissue Engineering

Se Youn Cho, Hyun Ho Park, and Hyoung-Joon Jin[†]

Department of Polymer Science and Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
(Received March 27, 2012; Revised May 1, 2012; Accepted May 15, 2012)

초록: 인체의 여러 조직 및 장기를 재생하고자 하는 조직공학에 있어 중요한 요소 중의 하나인 지지체는 세포외기질을 모방한 것으로 손상된 조직을 재생하는데 있어 기본 형틀의 역할을 수행하며, 세포의 분화와 성장 그리고 영양분과 산소의 원활한 공급을 위한 상호 연결된 다공성 구조가 필요하다. 본 연구에서는 실크 피브로인의 조직공학용 지지체로의 응용가능성 향상을 위하여 폴리에틸렌옥사이드를 사용한 보다 넓은 기공과 다공의 연결성을 가지는 실크 피브로인 나노 섬유 지지체를 제조하였다.

Abstract: Considerable effort has been directed toward the use of silk fibroin as a biotechnological material in biomedical applications on account of its excellent biodegradability, biocompatibility, and unique mechanical properties. For use in tissue engineering, it is very important to design and control the pore architecture of polymeric scaffolds, which provide the vital framework for seeded cells to organize into functioning tissue. In the present study, a silk fibroin scaffold with controlled interconnectivity and pore size was prepared using an electrospinning method with poly(ethylene oxide).

Keywords: silk fibroin, tissue engineering, 3D porous scaffolds, pore architecture, electrospinning.

서 론

일반적으로 곤충류의 생물들에 의하여 방사되는 단백질 분비물인 실크는 섬유형태의 실크 피브로인과 이를 둘러싸고 있는 세리신으로 구성되어 있으며, 누에고치에서 추출되는 누에실크는 우수한 촉감과 고급스러운 색상으로 인하여 오랫동안 고급 의류용 섬유로 이용되어 왔다. 그러나 최근 방사 조건(연신 속도)에 따라 거미실크에 견줄만한 높은 기계적 물성을 기대할 수 있다는 연구 결과와 함께,¹ 실크 피브로인의 다양한 생리활성 및 생체 적합성이 밝혀지면서 이를 조직공학용 재료로 활용하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다.²⁻⁴

조직공학이란 생물학적인 기능을 하는 세포와 세포의 주변 환경을 조절할 수 있는 공학적인 기술을 이용하여 세포의 기능을 조절하고 궁극적으로 환자의 손상된 조직에 이식하여 원하는 기능을 구현할 수 있는 모든 과정 및 방법을 포함하는 포괄적인 의미로 사용될 수 있으며, 이러한 조직공학을 이용하여 인체의 여러 조직 및 장기를 재생하고자 하는 연구가

오래 전부터 시도되어 왔다.^{5,6} 조직공학의 기초가 되는 조직공학용 지지체는 천연의 세포외기질(extracellular matrix, ECM)을 모방한 것으로 손상된 조직을 재생하는데 있어 기본 형틀의 역할을 수행한다. 이상적인 조직공학용 지지체로 사용되기 위해선 기본적으로 우수한 생체적합성, 무독성, 그리고 낮은 면역반응성 등이 필요하며, 세포성장을 위한 상호 연결된 다공성 구조와 조직이 재생된 후 체내에서 서서히 분해되는 특성이 요구된다.⁷ 특히 상호 연결된 다공성 구조와 기공의 크기는 세포의 분화와 성장, 그리고 영양분과 산소의 원활한 공급에 결정적 영향을 주어 조직의 형성에 있어 매우 중요한 역할을 하기 때문에 재생하고자 하는 조직에 따라 적절한 다공성 구조와 기공의 크기를 갖는 지지체를 제조하는 것이 매우 중요하다.⁸ 최근 혈관 형성에 있어 5 μm , 섬유모세포의 성장에 있어 5~15 μm , 피부 재생에 있어 20~125 μm , 그리고 골 재생의 경우 100~350 μm 의 기공 크기를 가지고 있는 3차원 다공성 지지체가 각각 조직의 재생에 있어 최적의 결과를 보였다는 실험 결과들이 보고된 바 있다.^{8,9}

조직공학용 3차원 다공성 지지체를 만드는 방법으로는 동결건조법(freeze drying), 가스발포법(gas forming), 침염법(salt leaching), 그리고 전기방사법(electrospinning) 등이 알려

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: hjjin@inha.ac.kr

져 있다. 이 중에서 전기방사법은 고분자 용액을 주사기에 넣고 높은 전압 하에서 콜렉터에 방사하여 수십 나노에서 수 마이크로미터 크기의 직경을 갖는 초극세사를 제조하는 방법이다. 이러한 전기방사법으로 제조된 나노 섬유 지지체의 경우, 부착세포가 자신이 생존할 수 있도록 생성하는 세포외기질 섬유와 유사한 굵기를 가지며, 작은 기공과 높은 비표면적을 제공하여 수분 및 통기성이 우수하고 세균으로부터 상처를 보호하는 기능이 있는 것으로 알려져 있다.^{10,11} 또한 고분자 용액의 점도, 극성, 전도성 등의 재료상의 요소와 전기장장의 세기, 온도, 습도 등의 주변 환경을 조절하여 섬유의 직경과 직경 분포, 섬유 표면 물성 그리고 다공성 등을 조절할 수 있기 때문에 조직공학용 지지체 제조법으로 많은 관심을 받고 있다.^{12,13} 그러나 전기방사에 의한 나노 섬유 지지체는 생성되는 기공의 크기가 매우 작고 상호 연결성이 낮아 세포가 지지체 내부로 성장하기 어렵다는 단점이 있어, 세포가 침윤, 생육할 수 있는 보다 높은 기공률의 전기방사 나노 섬유 지지체를 제조하기 위한 연구가 필요하다.

본 연구에서는 천연고분자인 실크 피브로인을 이용한 조직공학용 3차원 다공성 나노 섬유 지지체를 전기방사법을 통하여 제조하였으며, 수용성 고분자인 폴리에틸렌옥사이드를 사용하여 보다 향상된 상호 연결성과 넓은 기공을 가지는 섬유 지지체를 제조하였다.

실 험

전기방사 용액의 제조. 누에고치(*Bombyx mori*)를 0.02 M의 탄산나트륨 수용액(sodium carbonate solution)에 넣고 100 °C에서 30분 동안 가열하여 세리신 단백질 및 불순물 등을 제거하고 증류수로 세척하여 순수한 실크 피브로인을 얻어내었다. 추출한 실크 피브로인을 9.3 M 브롬화리튬용액(lithium bromide solution)에 60 °C에서 4시간 동안 가열 용해시킨 후, 48시간 동안 증류수로 투석하여 순수한 실크 피브로인 수용액을 얻어내었다. 제조된 실크 피브로인 수용액은 약 8 중량%였다. 제조된 실크 피브로인 수용액의 점도와 방사성을 증가시키기 위하여 분자량이 900000 g/mol인 폴리에틸렌옥사이드를 증류수에 5 중량%로 용해시킨 후, 실크 피브로인 수용액과 교반하여 실크 피브로인/폴리에틸렌옥사이드 수용액을 제조하였다. 이때 폴리에틸렌옥사이드와 실크 피브로인의 중량비는 약 1:4였다. 또한 폴리에틸렌옥사이드의 전기방사를 위하여 분자량이 900000 g/mol인 폴리에틸렌옥사이드를 에탄올에 4 중량%로 용해시켜 방사 용액을 제조하였다.

실크 피브로인 나노 섬유 지지체의 제조. 실크 피브로인 나노 섬유 지지체는 전기방사 방식을 사용하여 제조하였으며, Figure 1에 개략도를 나타내었다. 두 기의 전기방사 기기를 사용하여 앞에서 제조한 실크 피브로인/폴리에틸렌옥사이드 수용액과 폴리에틸렌옥사이드 용액을 각각 전기방사하였으며

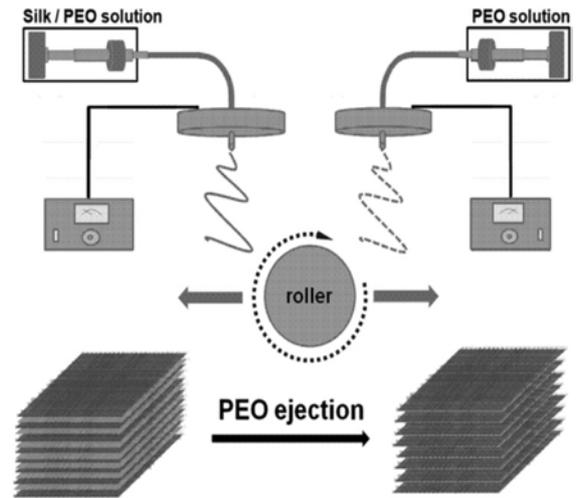


Figure 1. Scheme diagram of controlling pore size of electrospun silk fibroin scaffold.

실크 피브로인/폴리에틸렌옥사이드 수용액을 30분간 방사하고 콜렉터의 위치를 교환하여 폴리에틸렌옥사이드 나노 섬유를 15분(폴리에틸렌옥사이드-15), 30분(폴리에틸렌옥사이드-30)간 방사한 후 다시 실크 피브로인/폴리에틸렌옥사이드 용액을 방사하는 방식으로 6시간 동안 전기방사하였다. 이때 사용된 주사기 바늘의 직경은 0.86 mm, 분사구와 집속부 사이에 인가된 전압은 16 kV, 주사기 바늘과 콜렉터간 방사거리는 15 cm, 그리고 방사속도는 0.03 mL/min이었다.

실크 피브로인의 결정화와 폴리에틸렌옥사이드의 제거. 제조된 섬유 지지체를 에탄올과 증류수를 85:15의 중량비율로 혼합한 용액에 10분 동안 담가두어 실크 피브로인의 결정화를 유도한 후, 증류수를 사용한 세척을 통하여 폴리에틸렌옥사이드를 제거하여 순수한 실크 피브로인 섬유 지지체를 제조하였다. 실크 피브로인 섬유간 간격을 넓히기 위하여 섬유 지지체를 증류수에 충분히 팽윤시킨 후 동결시키는 과정을 3회 반복하였다.

특성 분석. 형태학적 구조에 관한 분석은 일본 Hitachi사의 전계방출 주사전자현미경(FESEM, S-4300SE)을 사용하여 수행하였으며 용이한 관찰을 위하여 carbon tape를 사용하여 시료를 알루미늄 원판에 고정한 후, platinum 입자로 sputtering을 하였다. 관찰한 images는 15 kV의 가속 전압의 조건에서 얻어졌다. 나노 섬유의 직경과 분포 그리고 기공의 크기는 영상분석 프로그램(ImageJ 1.43 u, Wayne Rasband, USA)을 사용한 FESEM 이미지 분석을 통하여 조사하였다. 적외선 분광분석(FTIR, Bruker, VERTEX 80 V, Germany)을 사용하여 나노 섬유의 분자구조 및 특성을 분석하였다. 제조된 섬유 지지체의 기공 특성을 확인하기 위하여 액체 displacement 방법이 사용되었으며, 실크 피브로인 섬유의 팽윤과 수축을 방지하기 위하여 hexane이 사용되었다. 일정 부피의

hexane(V_1)에 섬유 지지체를 10분간 충분히 침지시킨 후의 부피(V_2)와 섬유 지지체 제거 후, 남은 hexan의 부피(V_3)를 측정하여 다음과 같은 식을 통하여 공극률을 계산하였다.

$$\varepsilon(\%) = (V_1 - V_3) / (V_2 - V_3) \times 100$$

결과 및 토론

Figure 2의 (a)와 (b)는 제조된 실크 피브로인/폴리에틸렌옥사이드 수용액을 이용하여 전기방사한 나노 섬유 지지체의 FESEM 사진으로, 500~600 nm 사이의 두께를 지닌 섬유들이 3차원 망상 구조를 형성하고 있는 것을 확인할 수 있다. 또한 에탄올을 이용한 폴리에틸렌옥사이드 용액을 이용하여 전기방사를 수행하였으며, 마찬가지로 비드 형태의 결합 형성 없이 300~400 nm의 직경을 지닌 섬유가 형성되었음을 Figure 2의 (c)와 (d)를 통하여 확인할 수 있다.

일반적으로 실크 피브로인을 재생하여 사용하는 경우 실크 I과 랜덤 코일 구조의 단백질 2차 구조를 지니게 되며, 이는 물에서의 용해가 가능한 구조이다.^{14,15} 따라서 제조된 실크 피브로인 섬유의 결정화를 유도하여 구조를 안정시킴으로써 실크 피브로인이 물에 용해되지 않도록 하는 과정이 필요하며, 그 방법으로는 기계적으로 전단을 가하는 방법, 연신, 가열, 극성 용매의 사용, 그리고 전기장을 가하는 방법 등이 있다.¹⁶ 본 연구에서는 실크 피브로인/폴리에틸렌옥사이드 섬유 지지체를 에탄올과 증류수를 85:15의 중량비로 혼합한 용액에 10분 동안 담가두어 실크 피브로인의 결정화를 유도한 후, 증류수로 세척하여 폴리에틸렌옥사이드가 제거된 실크 피브로인 섬유 지지체를 제조하였고, 이를 확인하기 위하여 FTIR 스펙트럼 분석을 사용하였다. Figure 3(a)는 실크 피브로인/폴리에틸렌옥사이드 수용액을 사용하여 얻어진 섬유 지지체의 스펙

트럼으로 2885 cm^{-1} 영역에서의 methylene band와 1148, 1101 cm^{-1} 그리고 1062 cm^{-1} 에서의 C-O-C 신축진동 피크를 통하여 폴리에틸렌옥사이드의 함유를 확인할 수 있으며,¹⁷ 증류수를 사용한 세척 과정을 통하여 폴리에틸렌옥사이드가 제거된 순수한 실크 피브로인으로 구성된 섬유 지지체가 제조되었음을 Figure 2(c)를 통하여 확인할 수 있다. 또한 결정화 처리 이전의 실크 피브로인/폴리에틸렌옥사이드 섬유 지지체에서 실크 I과 랜덤 코일 구조에서 특징적으로 나타나는 1652 cm^{-1} (amide I), 1538 cm^{-1} (amide II)에서의 신축진동 피크를 확인할 수 있으며, Figure 3(b)와 (c)에서 보이는 1697, 1627 cm^{-1} (amide I), 1528 cm^{-1} (amide II)으로의 신축진동 피크의 이동을 통하여 극성 용매를 사용한 결정화를 통하여 실크 피브로인 섬유 지지체에 실크 II 구조가 형성되었음을 확인할 수 있다.

Table 1에 실크 피브로인과 폴리에틸렌옥사이드 나노 섬유를 교대로 적층한 후, 실크 피브로인을 결정화하고 수용성 고분자인 폴리에틸렌옥사이드를 제거한 실크 피브로인 나노 섬유 지지체의 폴리에틸렌옥사이드 함유량에 따른 기공률의 변화를 정리하였다. 폴리에틸렌옥사이드의 함유는 증류수를 통한 세척 과정 전후의 무게차이를 측정하여 계산하였다. 폴리에틸렌옥사이드의 함유가 많을수록 제조되는 실크 피브로인

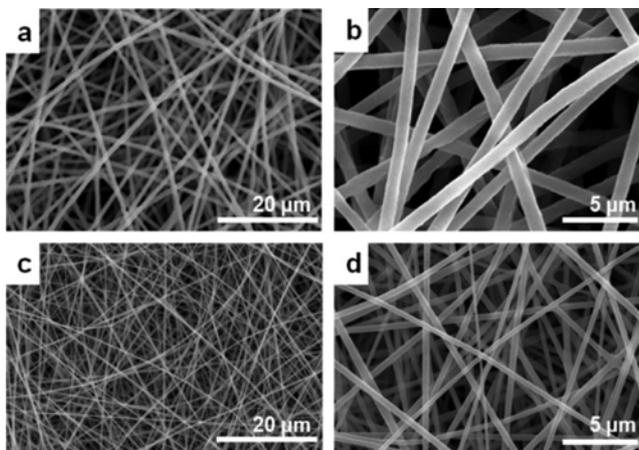


Figure 2. FESEM micrographs of electrospun silk fibroin/PEO(a, b); PEO(c, d) nanofibers.

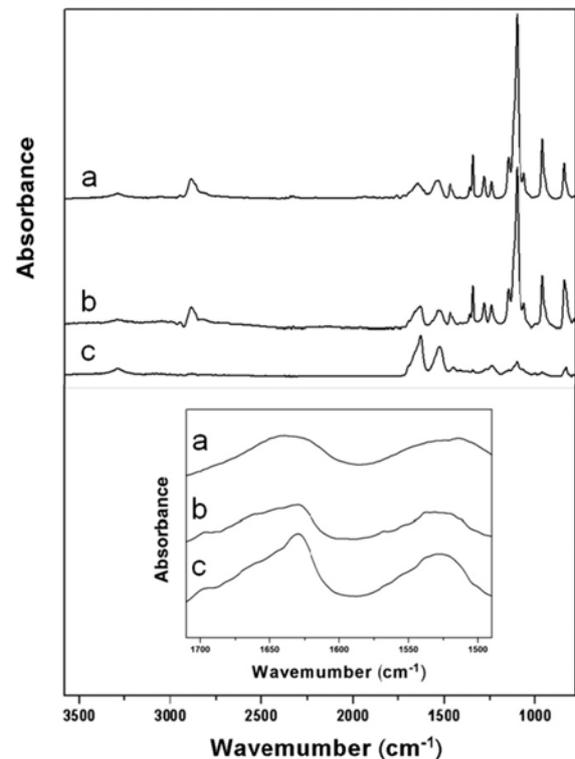


Figure 3. FTIR-ATR spectra of electrospun fibers from silk/PEO solution (a) before; (b) after ethanol treatment; (c) electrospun silk fibroin fibers using PEO extraction after ethanol treatment.

Table 1. Characteristics of Electrospun Fibers

	PEO concentration (%)	Porosity (%)
Silk(30 min)	23.2±0.1	63.9±10.9
Silk(30 min)/PEO(15 min)	36.4±5.1	81.8±5.9
Silk(30 min)/PEO(30 min)	49.6±13.0	86.1±6.9

*The data represent the mean ± standard deviation, n=4.

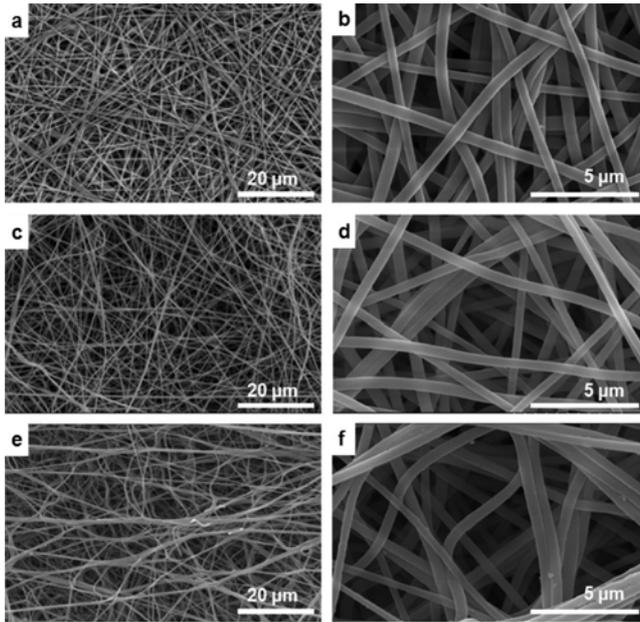


Figure 4. FESEM micrographs of electrospun fibers from (a, b) silk fibroin; (c, d) silk/PEO-15; (e, f) silk/PEO-30.

나노 섬유 지지체의 기공률 또한 증가하게 되는데, 이는 보다 많은 폴리에틸렌옥사이드 나노 섬유가 적층된 후, 증류수에 녹아 제거되면서 지지체에 보다 많은 공간이 생겼기 때문이다. Figure 4의 (a)와 (b)에서 볼 수 있듯이, 실크 피브로인/폴리에틸렌옥사이드 수용액만을 사용하여 전기방사한 경우 섬유간의 간격과 기공의 크기에 별다른 변화가 나타나지 않았다. 그러나 폴리에틸렌옥사이드-15와 폴리에틸렌옥사이드-30의 경우 적층되었던 폴리에틸렌 나노 섬유들이 제거되면서 실크 피브로인 나노 섬유 사이의 간격이 보다 많이 생겨나게 되고 결과적으로 기공의 크기 증가와 보다 향상된 다공성 구조가 형성되었음을 Figure 4(c)~(f)를 통하여 확인할 수 있다. 또한 폴리에틸렌옥사이드-15보다 폴리에틸렌옥사이드-30이 많은 양의 폴리에틸렌옥사이드가 적층된 후, 제거되기 때문에 보다 넓은 섬유간의 간격을 보여주고 있다.

증류수를 통하여 폴리에틸렌옥사이드를 제거한 실크 피브로인 나노 섬유 지지체의 기계적 물성을 Table 2에 나타내었다. 폴리에틸렌옥사이드 나노 섬유의 적층 시간이 길어질수록

Table 2. Mechanical Properties of the Electrospun Silk Fibroin Nano Fibers

	Young's modulus (MPa)	Tensile strength (MPa)	Elongation at break (%)
Silk(30 min)	287.3±17.4	7.28±0.24	2.6±0.1
Silk(30 min)/PEO(15 min)	229.6±18.2	6.71±0.15	1.9±0.3
Silk(30 min)/PEO(30 min)	201.8±6.9	6.26±0.22	2.0±0.3

*The data represent the mean ± standard deviation, n=5.

영률과 인장강도가 다소 감소되었음을 확인할 수 있다. 이러한 현상은 나노 섬유 지지체의 기계적 물성이 다공성과 기공의 크기 그리고 이들의 연결성에 의해 영향을 받기 때문이다.

결론

본 연구에서는 전기방사법을 사용하여 제조된 실크 피브로인 나노 섬유 지지체의 조직공학용 지지체로의 응용가능성 향상을 위하여 수용성 고분자인 폴리에틸렌옥사이드와 교대로 적층한 후, 실크 피브로인을 결정화하고 폴리에틸렌옥사이드를 제거하여 보다 넓은 기공과 다공의 연결성을 지니는 실크 피브로인 나노 섬유 지지체를 제조하였다.

감사의 글: 이 논문은 2008년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. R11-2005-065).

참고 문헌

1. Z. Shao and F. Vollrath, *Nature*, **418**, 741 (2002).
2. G. H. Altman, F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R. L. Horan, J. S. Chen, H. Lu, J. Richmond, and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, **24**, 401 (2003).
3. H. J. Jin, J. S. Chen, V. Karageorgiou, G. H. Altman, and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, **25**, 1039 (2004).
4. J. S. Chen, G. H. Altman, V. Karageorgiou, R. Horan, A. Collette, V. Volloch, T. Colabro, and D. L. Kaplan, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **67**, 559 (2003).
5. S. Yang, K. F. Leong, and Z. Du, *Tissue Eng.*, **7**, 679 (2001).
6. J. Zeltinger, J. K. Sherwood, and D. A. Graham, *Tissue Eng.*, **7**, 557 (2001).
7. A. G. Mikos and J. S. Temenoff, *Electron. J. Biotechnol.*, **3**, 1 (2000).
8. N. Annabi, J. W. Nichol, X. Zhong, C. Ji, S. Koshy, A. Khademhosseini, and F. Dehghani, *Tissue Eng.*, **16**, 371 (2010).
9. K. Whang, K. E. Healy, D. R. Elenz, E. K. Nam, D. C. Tsai, C. H. Thomas, G. Nuber, R. Glorieux, R. Travers, and S. M. Sprague, *Tissue Eng.*, **5**, 35 (1999).

10. S. M. Jo, W. S. Lee, and S. W. Chun, *Fiber Tech. Ind.*, **6**, 112 (2002).
11. X. M. Mo, C. Y. Xu, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, *Biomaterials*, **25**, 1883 (2004).
12. D. Li and Y. Xia, *Adv. Mater.*, **16**, 1151 (2004).
13. S. Ramakrishna, K. Fujihara, W. E. Tae, T. C. Lim, and Z. Ma, *World Scientific*, **7**, 17 (2005).
14. J. Magoshi, M. Mizuide, and Y. Magoshi, *J. Polym. Sci.*, **17**, 515 (1979).
15. M. Ishida, T. Asakura, M. Yoko, and H. Saito, *Macromolecules*, **23**, 88 (1990).
16. S. H. Yoon, S. J. Myung, M. Kang, and H. J. Jin, *Polymer Science and Technology*, **16**, 577 (2005).
17. B. Duan, C. Dong, X. Yuan, and K. Yao, *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, **15**, 797 (2004).