

Chitosan과 N^{ϵ} -carbobenzoxy-L-lysine의 공중합체로부터 인공피부의 제조와 평가

김계용 · 이선용 · 민동선 · 조양자* · 정용훈* · 김정목* · 박장환* · 성용길** · 조종수***
한양대학교 공과대학 공업화학과 · *한양대학교 의과대학 미생물학교실
(1990년 5월 24일 접수)

Synthesis and Evaluation of Copoly(chitosan-g- N^{ϵ} -carbobenzoxy-L-lysine) for Wound Covering Material

K. Y. Kim, S. Y. Lee, D. S. Min, Y. J. Cho,* Y. H. Chung,*
J. M. Kim,* J. H. Park,* Y. K. Sung,** and C. S. Cho***

Dept. of Industrial Chem., College of Eng., Hanyang Univ., Seoul 133-791 Korea

*Dept. of Microbiology, College of Medicine, Hanyang Univ., Seoul 133-791 Korea

**Department of Chemistry, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

***Department of Polymer Engineering, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea
(Received May 24, 1990)

요약 : 의약품재료로 응용되는 chitosan과 생체단백질구성 물질인 L-lysine을 공중합하여 생체적합성이 우수한 인공피부를 제조하였다. 공중합체의 합성시 70% 이상의 전환율을 보이며 합성한 copoly(chitosan-g- N^{ϵ} -carbobenzoxy-L-lysine)는 dichloroacetic acid에 용해하였다. 그러나 공중합체중의 L-lysine 잔기로부터 보호기를 제거하였을 경우에는 양용매를 찾을 수 없었다. 기계적 성질은 습윤시 인장강도가 0.3~0.5 kg/mm², 신장율은 약 10%를 나타내었다. 수분투과도는 500 g/mm² · day의 값을 나타내었으며 단백질 분해효소에 의한 분해율은 15%/10day 정도의 값을 보였다. 임계표면장력 값은 30 dyn/cm 었다. 결합조직 세포인 fibroblast를 사용하여 세포배양 실험을 한 결과 48시간 경과 후에 control의 80% 이상, 초기 세포밀도의 2배 이상의 세포가 증식되었으며 세포의 모폴로지에서도 fibroblast의 특징적인 형태를 잘 관찰할 수 있었다.

Abstract : Chitosan have been often applied as medical polymer and L-lysine is a protein component of natural tissue. Artificial skin having good biocompatibility was prepared by the graft copolymerization of N^{ϵ} -carbobenzoxy-L-lysine NCA onto chitosan. Copolymerization was carried out with the conversion of about 70%. Synthesized copolymers were dissolved in dichloroacetic acid, however the decarboxylated ones had no good solvent. Their tensile strength and elongation under wet state showed 0.3~0.5 kg/mm² and 10~13%, respectively. Water vapor transmittance rate, however, was about 500 g/m² · day and the degree of biodegradation by protease was ca. 15%. Critical surface tension value was 30 dyn/cm. Biocompatibility was evaluated by studying human skin fibroblast cell culture on the prepared membrane surface. After 48 hours, cells were proliferated twice as many as initial cell density. In view of morphological changes, the distinctive features of fibroblast were observed well.

서 론

인공피부를 사용하는 목적은 화상부위에서 수분이 나 체액의 손실을 억제하여 심한 탈수증세로 인한 생명의 위협과 세균감염을 방지하고 화상부위를 보호하면서 새로운 조직의 재생을 촉진시키는데 있다. 따라서 인공피부는 상처부위의 분비액을 잘 흡수하여 체액이 고이지 않도록 흡수성과 유연성을 가지고 있어야 하며 또한 분비액에 의하여 사용중에 강도의 손실이나 형태의 변형이 없는 기계적 성질을 가지고 있어야 한다.

본 연구에서는 천연고분자인 chitosan과 생체단백질 구성 성분인 *L*-lysine을 그라프트 공중합하여 인장강도와 신장율, 함수율 및 수분투과도 등의 물리화학적 성질과 접촉각에 의한 임계표면장력 측정과 단백질 분해효소에 의한 생분해도를 조사함으로써 인공피부로서의 기본적인 물성을 검토하였으며, 생체조직과의 적합성을 검토하기 위하여 *in vitro* 실험으로 제조한 고분자 표면에서의 human skin fibroblast cell의 점착 및 증식 거동을 관찰하여 인공피부의 세포점착 및 증식 가능성을 평가하였다.

실 험

시약 및 정제

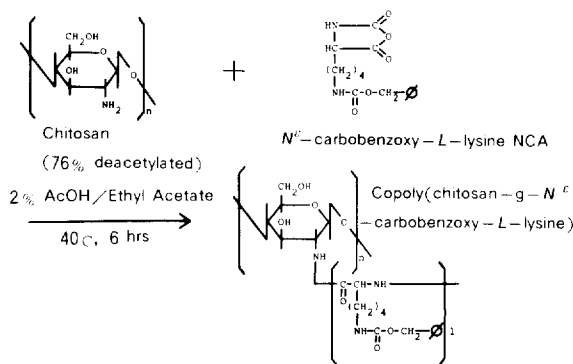
Chitosan은 탈아세틸화도 76%인 일본 Tokyo Kasei 제품을 산과 알칼리로 정제하여 사용하였다. *L*-lysine · HCl(일본 이화학약품<주> 제품)과 carbobenzoxychloride(일본 화광순약공업<주> 제품)는 특급시약을 그대로 사용하였다. *n*-Hexane, 1,4-dioxane 및 ethylacetate 등은 탈수를 위하여 금속나트륨 또는 수소화칼슘을 투입하여 환류하고 증류하여 사용하였다. 효소(Protease IV, Sigma Co., LTD.)와 그 외의 시약은 그대로 사용하였다.

공중합체의 합성

N^ε-carbobenzoxy-*L*-lysine NCA의 합성 : *N*^ε-carbobenzoxy-*L*-lysine NCA는 *L*-lysine의 측쇄에 있는 아민기를 benzyloxycarbonyl기로 보호하고 포스젠법

으로 합성하여 전보¹와 같은 방법으로 정제하여 사용하였다.

Copoly(chitosan-*g*-*N*^ε-carbobenzoxy-*L*-lysine)의 합성 : Chitosan과 NCA를 각각 2% 초산수용액과 ethylacetate에 0.1% (wt/v)로 용해시킨 다음 불균일계 중합법으로 40°C에서 6시간 반응시켜 공중합체를 합성하였다.² 이 때 chitosan의 아민기가 반응개시점이 되어 공중합 반응을 진행하게 된다.³ 공중합체의 합성식을 Scheme 1에 나타내었으며 Table 1에 공중합체의 조성을 나타내었다. Chitosan의 아민기의 몰수에 대한 NCA의 몰수를 10.4에서 100까지 변화시켜 공중합체를 합성하였다. 반응이 진행되어 형성된 백색의 침전물을 여과하여 디옥산과 초산수용액으로 수회 세척하고 감압건조하여 순수한 copoly(chitosan-*g*-*N*^ε-carbobenzoxy-*L*-lysine)을 합성하였다. 이렇게 합성한 공중합체로부터 보호기인 benzyloxycarbonyl기를 제거하기 위하여 상온에서 초산용액(AcOH)에 팽윤시킨 후에 30% HBr/AcOH용액을 부가하여 30분간 반응시켜 copoly(chitosan-*g*-*L*-lysine)을 합성하였다.⁴



Scheme 1. Synthetic diagram.

공중합체의 특성 측정

합성한 물질을 유사체액(pseudo-extracellular fluid, PECE⁵)에 37°C에서 팽윤시킨 다음 습윤 및 건조상태의 무게를 측정하여 다음 식으로 함수율을 측정하였다.

Table 1. Graft Copolymerization of *N*^c-carbobenzoxy-*L*-lysine NCA onto Chitosan

	Chitosan(g)	NCA(g)	NCA(mol)/ NH ₂ (mol)	Yield(g)	DP of polypep- tide side chains	Conversion** (%)
GC-1	0.1	1.5	10.4	1.16	7.5	72.5
GC-2	0.1	3.0	20.8	2.14	14.4	69.2
GC-3	0.1	6.0	41.6	4.62	31.6	76.0
GC-4	0.1	7.2	50	5.14	40.9	81.9
GC-5	0.1	14.4	100	9.87	79.4	79.4

* Determined from weight increase

** Amount of NCA polymerized/Amount of NCA added

$$\text{흡수율}(\%) = \frac{W_s - W_d}{W_s} \times 100$$

W_s : 습윤시 시료무게, W_d : 건조시 시료무게

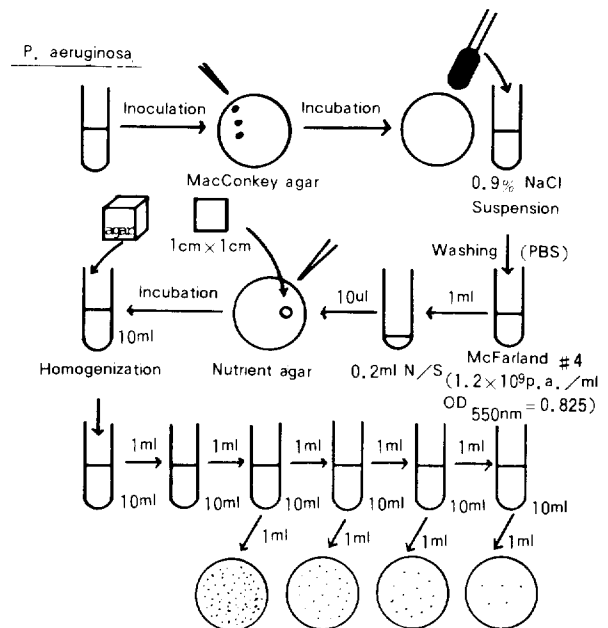
각각의 시료를 필름상태로 만들어서 건조상태와 습윤상태에서의 인장강도와 신장율을 Instron type의 Universal testing machine(Toyo Baldwin UTM-400)을 사용하여 측정하였다. 수분투과도의 측정은 유효막면적 $7.65 \times 10^{-4} \text{ m}^2$ 인 투과장치를 사용하여 전보⁶와 같은 방법으로 측정하였다. 또한 일본 Erma광학사의 Model G-1 Goniometer를 사용하여 접촉각을 측정하고 Zisman법⁷으로 임계표면장력을 측정하였다.

효소에 의한 분해실험

동일 조건에서 제막건조된 동일 시료를 일정한 무게로하여 단백질 분해효소인 Protease IV가 1 mg/ml로 용해된 효소용액에 담긴 후 37°C 항온실에 방치하고 24시간 마다 시료를 꺼내어 물로 세척하고 건조시킨 다음 무게를 측정하여 무게감소로부터 분해율을 구하였으며 10일 간 분해 후의 시료의 상태를 검토하였다.

세포배양실험

합성한 공중합체의 생체적합성을 평가하기 위하여 결합조직세포 (human skin fibroblast)를 사용하여 세포배양실험을 행하였다. Scheme 2에 세포배양실험 과정을 나타내었다. 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, Australia)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle medium과 Ham-F12 (DMF/Ham-F12, Sigma, U.S.A) 혼합용액에 세포농도가 1×10^5



Scheme 2. Method for the count of the number of bacteria on agar surface.

cells/ml이 되도록 세포현탁액을 제조하였다. 합성한 공중합체가 코팅된 cover glass를 EO(ethylene oxide)가스로 멸균시킨 후 세포배양용 dish에 놓고 제조한 세포현탁액의 세포밀도가 $1 \times 10^4 \text{ cell/cm}^2$ 이 되도록 조절하여 37°C에서 5% CO₂ 기류하에 세포 배양을 하였다. 일정기간 후의 세포의 점착상태, 세포의 모폴로지 변화, 세포의 증식 정도를 역상현미경 (phase contrast inverted microscope)으로 관찰하였으며 0.05% trypsin으로 처리하여 hemacytome-

ter로 증식된 세포 수를 계산하였다. 비교를 위하여 세포배양용 dish에서 증식된 세포를 control로 사용하였다.

결과 및 고찰

공중합체의 확인

본 연구에서 행한 불균일계 중합법으로 반응이 진행될 때 수분에 예민한 NCA가 수분에 의해 가수분해될 것이 염려되나 chitosan의 amine기가 NCA를 공격하는 반응속도가 물에 의한 NCA의 분해속도보다 빠르기 때문에 펩티드가 chitosan에 그래프트된 공중합체가 합성된다.² 합성한 공중합체는 FT-IR (Nicolet 5DX)에 의하여 구조를 확인하였으며 그 결과를 Fig. 1, Fig. 2에 나타내었다. Fig. 1은 *L*-lysine · HCl과 측쇄의 아민기를 보호한 *N*^ε-carbobenzoxyl-lysine의 IR spectra로서 1691 cm⁻¹에서 보호기인 benzyloxycarbonyl기의 ester 결합에 해당하는 특성피크를 확인함으로써 아민기의 보호가 잘 이루어졌음을 알 수 있다. Fig. 2는 공중합체의 IR spectra로 1691 cm⁻¹이 보호기의 특성피크, 1650 cm⁻¹에서 수소결합을 한 C=O 결합의 신축진동에 귀속하는 amide I band 특성피크와 1536 cm⁻¹에서 N-H 결합의 굽힘진동에 귀속하는 amide II band 특성피크가 잘 나타난 것으로 보아 공중합 반응이 순조롭게 진행되었음을 알 수 있었으며 합성한 공중합체로부터 보호기를 제거한 copoly(chitosan-g-*L*-lysine)의

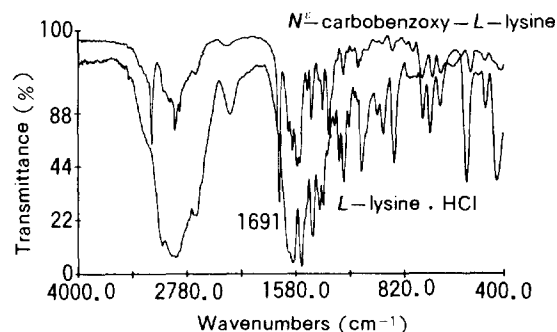


Fig. 1. IR spectra of *L*-lysine · HCl and *N*^ε-carbobenzoxyl-*L*-lysine.

경우에는 1650 cm⁻¹와 1536 cm⁻¹의 펩티드 특성피크는 여전히 관찰되나 보호기에 해당하는 1691 cm⁻¹의 특성피크는 거의 없어진 것을 확인할 수 있었다.

공중합체의 용해성

Table 2에 합성한 공중합체의 용해성을 나타내었다. 합성한 모든 공중합체는 poly(*N*^ε-carbobenzoxyl-*L*-lysine)의 용매인 디옥산에 불용성이었으며, 펩티드 함량이 상대적으로 적은 GC-1, GC-2, GC-3의 경우에는 대부분의 유기용매에 용해하지 않았으며 양용매를 찾을 수 없었다. 반면에 GC-4와 GC-5는 dichloroacetic acid, *m*-cresol, *N,N*-dimethyl acetamide와 초산의 1 : 1 혼합 용매에 용해되었다. 합성

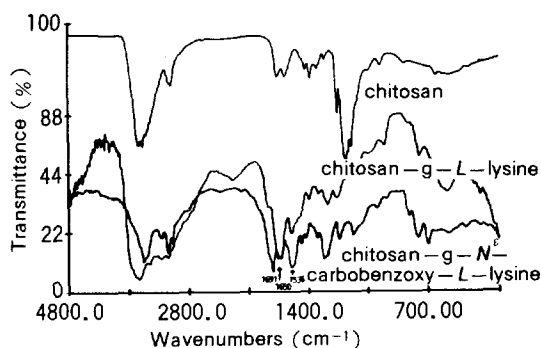


Fig. 2. IR spectra of chitosan and copolymers.

Table 2. Solubility of Copoly(chitosan-g-*L*-lysine) in Various Solvent at Room Temperature

Solvent	Sample						
	Chitosan	GC-1	GC-2	GC-3	GC-4	GC-5	PCLL ^a
1,4-Dioxane	I	I	I	I	I	I	S
Ethanolamine	I	I	I	I	I	I	I
DMF	I	I	I	I	I	I	I
DMSO	I	I	I	I	I	I	I
DCA ^b	I	P	P	P	S	S	I
<i>m</i> -Cresol	I	P	P	P	S	S	I
DMAc ^c /AcOH [*]	I	I	I	I	S	S	I
AcOH(2%)	S	I	I	I	I	I	I

I ; insoluble, P ; partially soluble, S ; soluble, ^a ; poly (carbobenzoxyl-*L*-lysine), ^b ; dichloroacetic acid, ^c ; *N,N*-dimethyl acetamide, * ; DMAc : AcOH = 1 : 1

Table 3. The Physical Properties of Polymer Membranes

	Tensile Strength (kg/mm ²)		Elongation (%)		WC(%)*	WVTR**
	Dry	Wet	Dry	Wet		
GC-4	0.6	0.3	10	13.2	8.1	448
GC-5	1.0	0.5	2.2	10.4	8.8	502

*water content

**water vapor transmittance (g/m² · day)

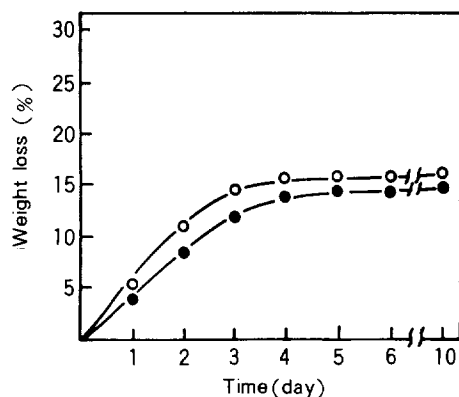
한 공중합체로부터 보호기를 제거하게 되면 모든 공중합체의 경우에 양용매를 발견할 수 없었으며, 단 이 때에는 dimethylsulfoxide와 물에 상당히 팽윤되는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서 GC-4와 GC-5를 시료로 사용하여 물성측정 및 세포배양실험을 하였다.

물리화학적 성질

Table 3에 GC-4와 GC-5막의 기계적 성질, 함수율과 수분투과도를 나타내었다. 인장강도는 습윤시에 각각 0.3 kg/mm², 0.5 kg/mm²의 값을 나타내었으며 신장율은 약 10%의 값을 나타내었다. 각 시료들의 함수율은 매우 낮았으며 수분투과도는 약 500 g/mm² · day의 값으로 정상피부가 갖는 수분투과도 200~500g/mm² · day와 유사한 값을 가짐으로써 상처부위에서의 체액의 과다증발을 막을 수 있다고 생각된다.

생분해성과 표면성질

인공피부는 환부를 피복 보호하기 위하여 새로운 표피 및 육아조직이 형성될 때까지 그 재료의 기능과 형태를 유지하는 것이 좋다. 본 연구에서는 체액에 존재하는 단백질 분해효소인 Protease IV를 사용하여 재료들의 분해성도를 측정하였으며 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 초기의 3일까지 분해가 빠르게 진행되어 약 15%의 분해율을 나타내었으나 시간이 경과한 후에도 막의 형태는 그대로 유지하고 있는 것을 관찰할 수 있었다. Table 4에는 Zisman plot로 구한 시료의 임계표면장력을 나타내었다. DZ-4와 DZ-5는 각각 GC-4와 GC-5를 HBr/AcOH혼합용액으로 처리하여 보호기인 benzyloxycarbonyl기를 제거

**Fig. 3.** Biodegradation of polymer membranes by protease at 36°C : (●) GC-4, (○) GC-5.**Table 4.** Surface Property of Polymer Membranes

Sample	γ_c^a	θ^b	$\cos \theta$	$\Delta \gamma^c$	γ_c^d
GC-4	72.5	78.5	0.199	14.4	31
DZ-4*	72.5	66.1	0.405	29.4	30
GC-5	72.5	75.5	0.250	18.1	31
DZ-5*	72.5	63.3	0.449	32.6	31

* surface treated by HBr/AcOH

^a surface tension of water(dyn/cm)^b contact angle of water^c energy deviation around wetting^d critical surface tension of polymer membranes

한 시료의 표면이다. 각 표면의 임계표면장력 값은 30~31dyn/cm의 값을 가지고 있었다. 물과의 접촉각을 측정하여 비교해 본 결과 DZ-4와 DZ-5가 GC-4와 GC-5에 비해 물과의 접촉각이 작아지는 것으로 보아서 표면의 benzyloxycarbonyl기를 제거하게 되면 친수성이 증가하게 되는 것을 알 수 있었다.

세포배양실험 및 생체적합성

고분자재료가 체액과 세포조직에 장기간 접촉해서 사용할 수 있는가는 그들의 생체적합성에 의존하게 된다. 고분자재료의 생체적합성을 조사하는 방법으로 이들 물질에 대하여 세포점착 거동을 실험하는 경우가 많은데, 이 세포점착 거동은 고분자구조 및 생체적합성과 연관이 있다고 한다.^{8,9} 세포와 고분자

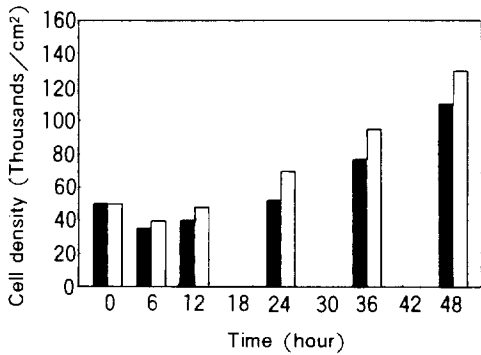
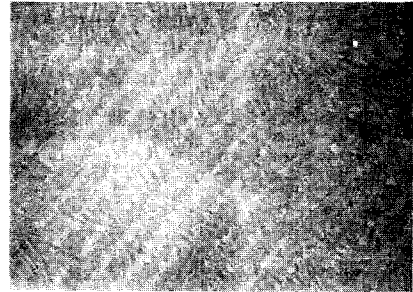


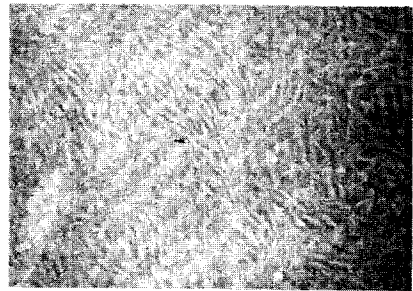
Fig. 4. Proliferation of human fibroblast on the artificial skin : (■) GC-4, (□) control.

기질의 상호작용에 있어서 일반적으로 세포는 점착(adhesion), 위족(filopodia)의 형성, 확산(sprea-ding), 증식(proliferation)의 경로를 거쳐서 증식하게 된다.¹⁰ 따라서 세포가 고분자기질에 대하여 거부반응이 있으면 점착이 일어나지 않게 되며, 점착이 일어나더라도 신장이 되지 않으면 더 이상 증식하지 않는 것이 보통이며 이는 고분자기질의 생체적합성과 관계가 있다. 또한, 고분자기질에 있어서 세포의 증식거동은 고분자 표면의 친수도,⁸ 표면전하,¹¹ 표면 에너지¹² 등과 관계가 있다는 것이 알려져 있다. 섬유아세포(fibroblast)는 생체의 결합조직에서 가장 일반적으로 발견되는 세포로서 생체조직의 섬유와 부정형 내세포 물질을 합성하므로 상처난 조직의 재생에 있어서 중요한 기능을 하고 있다.

본 연구에서는 human skin fibroblast를 사용하여 GC-4에 세포배양실험을 하였으며 Fig. 4에 시간 경과에 따른 세포의 증식도를 나타내었다. 48시간 경과 후에 control의 80% 이상, 초기 세포밀도의 두배 이상의 세포가 증식된 것을 알 수 있다. Fig. 5에 48시간 경과 후의 세포의 모폴로지를 나타내었다. Control의 경우에는 fibroblast가 증식되었을 때의 특징인 spindle-shaped 형태를 하고 있었으며 전체적인 모폴로지는 평행한 배열을 하고 있다. 같은 시간 경과한 후의 GC-4의 표면에서의 경우에도 세포의 특징적인 모양과 배열 및 confluence를 형성하고 있는 것으로 보아서 세포의 점착과 증식이 잘 이루어졌을



control



artificial skin

Fig. 5. Phase contrast photomicrographs of human skin fibroblast proliferation on the surface of copolymer (GC-4).

을 알 수 있었다. 이로써 합성한 공중합체는 좋은 생체적합성을 갖고 있다고 생각된다.

결 론

본 연구에서는 상처치료 촉진 효과가 있는 chito-san과 생체단백질 구성성분인 L-lysine을 공중합하여 인공피부로서의 기본적인 물리화학적 성질을 검토하였으며, 세포배양실험을 통하여 생체적합성을 평가하였다. 합성에 있어서 대부분의 공중합체는 70% 이상의 전화율을 나타냄으로써 중합이 용이하게 진행됨을 알 수 있었으며, 공중합체의 용해성 검사로부터 펩티드 함량과 보호기인 benzyloxycarbonyl기가 공중합체의 용해도에 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다. 제조한 인공피부의 기계적 성질은 인공피부의 목표치에는 다소 못미치긴 하지만 이는 가소제의 첨가나 타재료와의 복합화 등으로 개선할 수 있을

것으로 생각되며, 효소분해성 및 정상피부와 같은 수분투과량을 갖는 것으로 미루어 인공피부로서의 기능을 할 수 있을 것으로 생각된다. 세포배양실험 결과에서는 control과 거의 유사한 정도로 세포의 증식이 원활히 이루어지는 것을 알 수 있었으며, 이로써 좋은 생체적합성과 세포와의 친화성이 우수한 것을 알 수 있었다. 이는 또한 상처면에서 세포의 정착과 증식을 유도함으로써 새로운 조직의 재생을 촉진할 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구의 일환으로 수행되었으며 연구비를 지원해 주신 한국과학재단에 감사사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. S. J. Kim, D. S. Min, and K. Y. Kim, *J. KSMBE.*, Vol. 8, No. 1 (1987).
2. K. Kurita, A. Yoshida, and Y. Kotama, *Macromolecules*, **21**, 1579 (1988).
3. S. W. Jang, K. Y. Kim, et al., *Polymer(Korea)*, **12**, 455 (1988).
4. Y. Kuroyanagi, K. Y. Kim, and M. Seno, *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **21**, 1289 (1983).
5. C. A. Homsy, *J. Biomed. Mater. Res.*, **4**, 341 (1970).
6. D. S. Min, K. Y. Kim, et al., *Research Reports Vol.* 28, (1989).
7. W. A. Zisman and H. Y. Fox, *J. Colloid. Sci.*, **7**, 109 (1952).
8. M. J. Lyndon, *Brit. Polym. J.*, **18**, 22 (1986).
9. T. Hayashi et al., *Jpn. J. Artif. Organs*, **18**, 59 (1989).
10. S. Nagaoka, *SEN-I GAKKAISHI*, **43**, 497 (1987).
11. S. Hattori, J. D. Andrade, J. B. Gibbs, JR., D. E. Gregonis, and R. N. King, *J. Colloid Interf. Sci.*, **104**, 72 (1985).
12. J. M. Schakenraad, H. J. Busscher, C. R. H. Wilderuur, and J. Arends, *J. Biomed. Mater. Res.*, **20**, 773 (1986).