Journal of Radiation Industry 9(4) : 171~180(2015)

방사선 기반에 의한 기계적으로 공극을 증가시킨 젤라틴이 도입된 혈관조직공학용 PLLA/PLCL 나노섬유 지지체의 개발

정진오[1,#] · 정성린[1,#] · 서다은[1] · 박종석[1] · 권희정[1] · 안성준[1] · 신영민[2] · 임윤묵[1,*]

[1]한국원자력연구원 첨단방사선연구소 공업환경연구부
[2]한양대학교 생명공학과

Development of Mechanically Expanded Gelatin-AAc-PLLA/PLCL Nanofibers for Vascular Tissue Engineering by Radiation-based Techniques

Jin-Oh Jeong[1,#], Sung In Jeong[1,#], Da-Eun Seo[1], Jong-Seok Park[1], Hui-Jeong Gwon[1], Sung-Jun Ahn[1], Young Min Shin[2] and Youn-Mook Lim[1,*]

[1]*Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, 1266 Sinjeong-dong Jeongeup-si Jeollabuk-do 56212, Korea*
[2]*Department of Bioengineering, Division of Applied Chemical and Bio Engineering, Hanyang University, Seoul, Korea*

Abstract - Vascular tissue engineering has been accessed to mimic the natural composition of the blood vessel containing intima, media, and adventitia layers. We fabricated mechanically expanded PLLA/PLCL nanofibers using electrospinning and UTM. The pore size of the meshes was increased the gelatin immobilized AAc-PLLA/PLCL nanofibers (203.30±49.62 microns) than PLLA/PLCL nanofibers (59.99±8.66 microns) after mechanical expansion. To increase the cell adhesion and proliferation, we introduced carboxyl group, and gelatin was conjugated on them. The properties of the PLLA/PLCL nanofibers were analyzed with SEM, ATR-FTIR, TBO staining, and water contact angle measurement, general cell responses on the PLLA/PLCL nanofibers such as adhesion, proliferation, and infiltration were also investigated using smooth muscle cell (SMC). During the SMC culture, the initial viability of the cells was significantly increased on the gelatin immobilized AAc-PLLA/PLCL nanofibers, and infiltration of the cells was also enhanced on them. Therefore, gelatin immobilized AAc-PLLA/PLCL nanofibers and mechanically expanded meshes may be a good tool for vascular tissue engineering application.

Key words : Poly(L-lactide, PLLA), Poly(L-lactide-co-ε-caprolactone, PLCL), Gamma-irradiation, Gelatin, Vascular tissue engineering

서 론

최근 고령화 사회의 도래 및 식습관 변화로 인해 심장질환, 혈관질환이 증가하고 있다. 이에 따라 손상된 혈관을 대

# These two authors contributed equally to this work.
* Corresponding author: Youn-Mook Lim, Tel. +82-63-570-3065, Fax. +82-63-570-3079, E-mail. ymlim71@kaeri.re.kr

체하기 위한 혈관 이식 빈도 또한 증가하고 있다. 혈관 이식 방법에는 자가혈관이식과 인공혈관이식이 있는데 자가혈관이식은 혈관 채취가 어렵고 재발의 위험이 있어 약 40% 만이 자가혈관을 이식하고 있는 추세이다. 따라서 자가혈관을 대체할 수 있는 인공혈관용 지지체의 개발이 필요하며, 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Kang *et al*. 2013; Ahn *et al*. 2015; Zang *et al*. 2015; Zhao *et al*. 2015).

인공혈관용 지지체는 생체적합성, 혈액적합성, 항응고성을 가져야 하고 수술 시 봉합 및 혈류에 따른 기계적 강도와 탄성을 갖추어야 한다. 이러한 인공혈관용 지지체의 재료로 사용되고 있는 대표적인 생체적합성 고분자로는 Poly (L-lactide-co-glycolide) (PLGA), Polycaprolactone (PCL), Poly(L-lactide) (PLLA), Poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) (PLCL) 등이 있다(Furukawa *et al*. 2002; Kim *et al*. 2008; Uchida *et al*. 2008; Tillman *et al*. 2009). 인공혈관 소재로 많이 사용되고 있는 PLCL은 L-lactide와 ε-caprolactone의 공중합체로서 생체적합성과 생분해성이 우수하고 탄성을 갖기 때문에 지속적으로 기계적 자극을 받는 심장이나 피부, 혈관조직 재생과 관련된 연구에 이용된다(Jeong *et al*. 2004; Jeong *et al*. 2005; Lim *et al*. 2008). PLLA는 L-lactic acid가 중합되어 얻어지는 고분자로 소수성이고 분해되는 속도가 느리며 기계적 강도가 우수하다(Shin *et al*. 2014). 또한 생체적합성과 열가소성이 우수하며, 체액과 직접 접촉하는 용도에 사용할 수 있는 FDA 승인을 받은 고분자이기 때문에 다양한 연구에 사용되고 있다(Rasal *et al*. 2010). 인공혈관용 지지체는 세포 외 기질과 유사한 3차원 다공성 지지체가 요구된다. 인공혈관용 지지체를 제조하는 방법으로는 필름 제조법, 극소량침출법 및 전기방사법 등이 있다(Choi *et al*. 2008; Shin *et al*. 2014; Shin *et al*. 2014).

전기방사법은 3차원 다공성 지지체를 제작하는 대표적인 방법 중 하나로써 조성에 따라 다양한 특성을 나타낼 수 있으며, 수백 나노미터에서 수 마이크로미터까지 다양한 직경의 섬유를 제작할 수 있다. 또한 소량의 용액으로도 방사가 가능하고 부피에 대한 표면적이 크다는 장점이 있으며, 세포 외 기질과 유사한 구조를 가지고 있기 때문에 조직공학적으로 다양한 연구가 진행되고 있다(Ma *et al*. 2005; Vaz *et al*. 2005).

체내의 혈관 구조는 내막, 중막, 외막으로 구성되어 있다. 내막은 혈류가 접촉하는 가장 안쪽 벽으로 혈관내피세포로 구성된 단층 구조를 갖는다. 혈관내피세포는 혈액적합성을 유지시켜주고 혈액 응고를 조절해주는 역할을 한다. 중막은 평활근 세포 및 아교질 섬유, 탄력 섬유로 구성된 중간층으로 두꺼운 평활근 세포 층으로 구성되어 혈관의 수축 및 이완을 담당한다. 외막은 결합섬유와 신축섬유로 구성되어 있고 혈관의 팽창을 방지한다. 그 중 중막은 혈관내피세포가 단층으로 덮여 있는 내막과 다르게 평활근 세포 층으로 이루어져 있기 때문에 이를 모사하기 위해 세포가 지지체 전체에 침투되어 증식해야 한다. 하지만 전기방사법으로 제작된 지지체는 섬유 간의 공극이 작기 때문에 세포가 지지체 전체에 침투되어 자라지 못한다는 문제점이 있어 지지체 전체에 세포를 침투시켜 배양하는 연구가 진행 중이다(Baker *et al*. 2008; Wright *et al*. 2011; Phipps *et al*. 2012; Zander *et al*. 2013). 또한 고분자 섬유로 만들어진 지지체는 표면이 소수성이기 때문에 세포의 점착, 증식 및 퍼짐성이 낮다. 이러한 문제점을 개선하기 위해 고분자 섬유 표면에 친수성을 증가시키고 세포 친화성을 향상시켜 줄 수 있는 단백질이나 펩타이드 같은 생체활성인자를 도입하는 표면 개질 기술이 필요하다.

고분자 표면 개질 기술로는 산 또는 염기 처리, 빛 또는 자외선 처리, 플라즈마, 방사선 조사를 사용하는 방법이 있다(Lee *et al*. 2005; Chan *et al*. 2006; Park *et al*. 2006). 이러한 표면 개질 기술들 중 방사선 조사 기술은 개시제나 촉매 등의 화학 첨가제가 없이 빠르게 라디칼을 형성하여 중합반응이 일어나도록 하며, 저온에서도 반응이 가능하고 기체, 액체 및 고체 상태 모두에서 반응이 가능하다는 장점이 있다(Choi *et al*. 2007; Ping *et al*. 2011; Jeong *et al*. 2015). 이전 연구에서 방사선 조사 기술을 이용하여 3차원 다공성을 가지는 박테리아 셀룰로오스와 PLCL 필름 표면에 아크릴산을 도입하여 카르복실 그룹을 생성한 후 EDC/NHS 반응을 통해 젤라틴을 추가로 도입하였다(Shin *et al*. 2008; Choi *et al*. 2012). 이러한 연구 결과를 바탕으로 방사선을 이용한 조직공학적 응용의 가능성을 확인하였다.

본 연구에서는 혈관의 중막을 대체하기 위한 인공혈관용 지지체를 개발하였다. PLLA와 PLCL을 혼합한 후 전기방사법을 통해 나노섬유를 제작하였고 세포가 지지체 안쪽까지 침투하여 자라게 하기 위해 섬유를 당겨 공극을 증가시켰다. 그 후 방사선 조사를 통해 나노섬유 표면에 아크릴산을 도입하여 카르복실 그룹을 생성하고 세포 친화성을 높이기 위해 EDC/NHS 반응을 이용하여 젤라틴을 도입하였다. 제작한 지지체는 공극 크기에 의한 세포 침투와 젤라틴에 의한 세포 친화성에 대한 평가를 진행하였으며, 조직공학적인 인공혈관용 지지체로서의 활용 가능성을 확인해보고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

Poly(L-lactide) (PLLA)는 Resomer®L214S (Essen, Germany)에서 구매하였으며, dichloromethane (DCM)은 Junsei (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 그리고 L-lactide

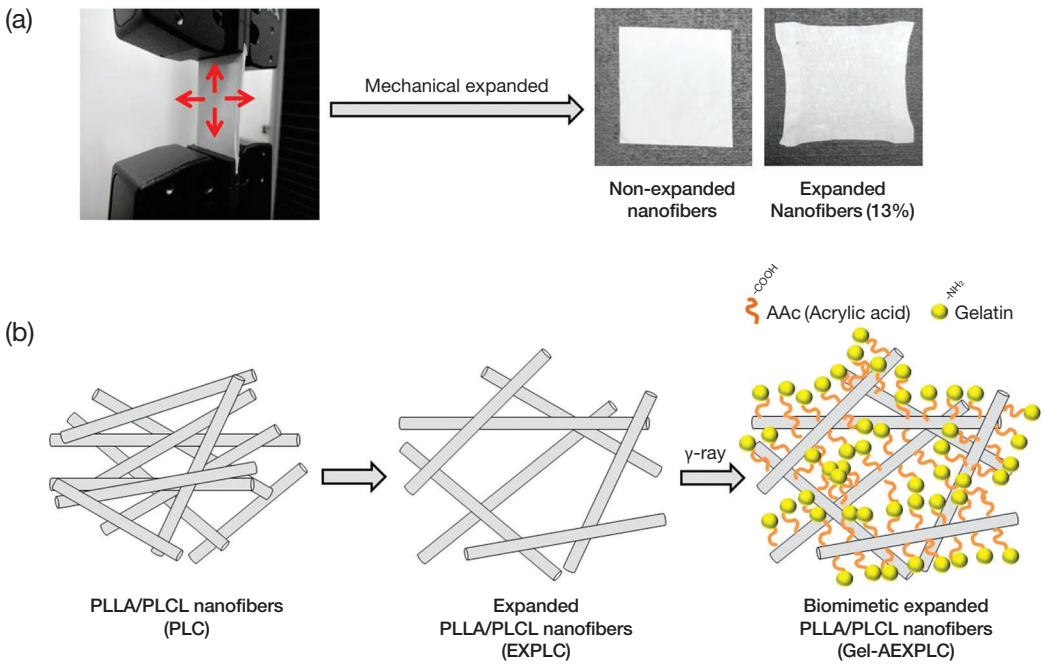

Fig. 1. The schematic diagrams of (a) mechanically expanded nanofibers, and (b) gelatin immobilized AAc-PLLA/PLCL nanofibers using gamma-irradiation.

(LA)는 Purac Biochem (Gorinchem, Netherlands)에서 구입하였고, ε-caprolactone (CL), trifluoroethanol (TFE), acrylic acid (AAc), gelatin, N-(3-dimethylamionipropyl)-N′-ethyl-carbodiimide hydrochloride (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), 4-morphilinoethanesulfonic acid (MES), toluidine blue O (TBO)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 사용하였다. 그 외 실험에 사용된 모든 시약과 용매는 다른 정제 과정 없이 사용하였다.

2. Poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) (PLCL) 합성

PLCL을 합성하기 위해 단량체인 lactide (LA)와 ε-caprolactone (CL)를 50 : 50의 비율로 250 ml 유리 엠플에 넣고 혼합한 후 톨루엔에 용해한 stannous octoate를 첨가하였다. 마그네틱 교반기를 이용하여 교반한 후 진공상태와 질소상태를 반복하여 생성된 거품을 제거하였다. 또한 100°C의 오일배스에서 1시간 동안 반응시킨 후 1분에 1°C씩 150°C까지 온도를 증가시켜 24시간 동안 개환중합 반응을 하였다 (Jeong *et al*. 2004). 반응을 마친 PLCL은 클로로포름에 용해하여 정제하였으며, 메탄올을 이용하여 침전한 후 72시간 동안 진공건조를 실시하였다.

3. 전기방사를 이용한 PLLA/PLCL 나노섬유 제작

2 wt%의 PLLA와 PLCL (70 : 30, v/v)을 DCM과 TFE 혼합용액 (80 : 20, v/v)에 4시간 동안 마그네틱 교반기를 이용하여 100 ml 바이알에서 50 ml을 용해한 후 12 ml 주사기에 10 ml을 주입하여 전기방사하였다. 전기방사에는 DC 전압 공급장치 (DC voltage power supply, NNC-60K-2 mA, NanoNC, Korea), 주사기펌프 (infusion pump, ESR-200RD, NanoNC, korea), 노즐 (20 G, NanoNC, korea)로 구성되어 있으며, 고분자 용액은 15 kV 전압에서 2 ml hr^{-1}의 방출 속도로 5시간 동안 방사한 후 상온에서 24시간 동안 완전히 건조하여 PLLA/PLCL 나노섬유를 제작하였다.

4. 기계적으로 공극을 증가시킨 PLLA/PLCL 나노섬유 제작

전기방사를 이용하여 제조된 PLLA/PLCL 나노섬유의 공극을 증가시키기 위해 Universal testing machine (UTM, Instron 5569, Instron, USA)을 이용하여 5 mm min^{-1}의 속도로 나노섬유의 공극을 증가시켰다. 나노섬유의 크기는 3×3 cm이며, 나노섬유 전체의 13%를 당겨 공극을 증가시켰다. UTM을 이용하여 기계적으로 공극을 증가시킨 PLLA/PLCL 나노섬유의 전체적인 모식도는 Fig. 1(a)에 나타내었다.

5. 감마선을 이용한 아크릴산 도입 및 EDC/NHS 반응을 통한 젤라틴 도입

전기방사를 이용하여 제조한 후 UTM을 이용하여 공극을 증가시킨 PLLA/PLCL 나노섬유에 아크릴산을 도입하기 위해 0.01 M Mohr's salt가 함유된 1, 5, 10 wt% 아크릴산 용액

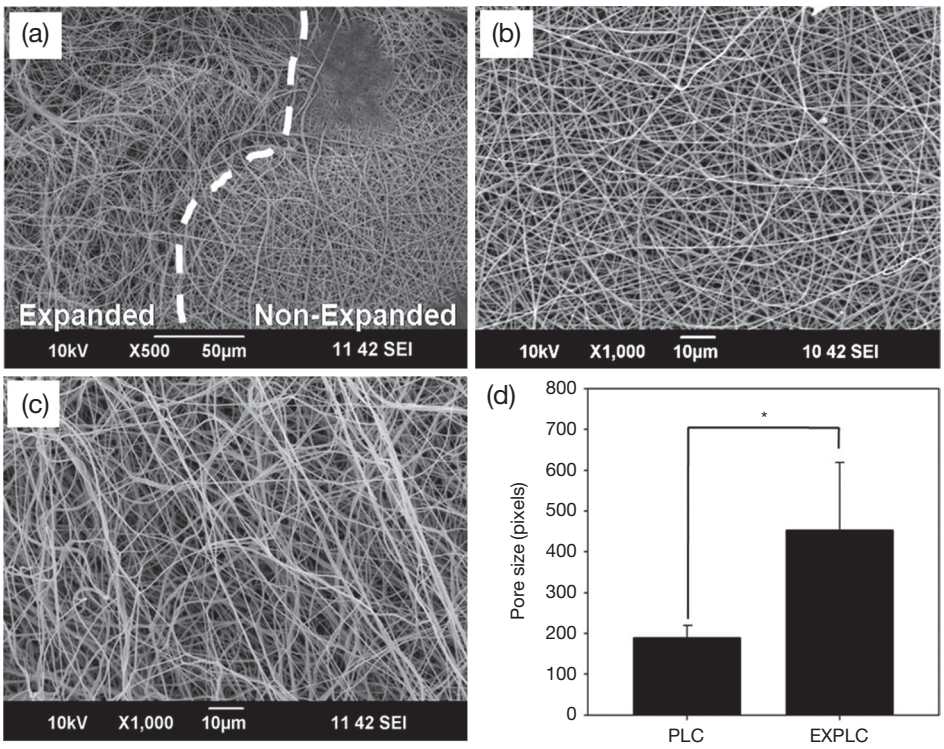

Fig. 2. Scanning electron microscopy (SEM) images of (a) boundary surface of extended PLLA/PLCL nanofibers and non-extended PLLA/PLCL nanofibers, (b) non-extended PLLA/PLCL nanofibers, (c) extended PLLA/PLCL nanofibers, and (d) pore size of non-expanded PLLA/PLCL nanofibers and expanded PLLA/PLCL nanofibers (*$p < 0.05$).

에 각각 담지한 후 ^{60}Co 선원의 감마선(ACEL type C-1882, Korea Atomic Energy Research Institute)을 선량률 10 kGy hr^{-1}로 1시간 동안 조사하였다. 조사 후 미 반응된 아크릴산을 제거하기 위해 3차 증류수를 이용하여 48시간 동안 세척하였다. 또한 아크릴산이 도입된 나노섬유에 젤라틴을 추가로 도입하기 위해 0.1 M MES 버퍼 용액(pH 5.07, 5 mg ml^{-1})에 EDC와 NHS를 순차적으로 녹인 후 나노섬유를 담지하여 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 나노섬유를 꺼내어 젤라틴을 0.1 M sodium bicarbonate (pH 8.21)에 녹인 용액에 넣고 12시간 동안 반응하였다. 미 반응된 젤라틴을 제거하기 위해 MES와 PBS를 이용하여 48시간 동안 세척한 후 72시간 동안 동결건조를 이용하여 건조하였다. 젤라틴이 도입된 PLLA/PLCL 나노섬유의 전체적인 모식도는 Fig. 2(b)에 나타내었다. 또한 PLLA/PLCL 나노섬유를 PLC, 공극을 증가시킨 PLLA/PLCL 나노섬유를 EXPLC, 공극을 증가시킨 후 아크릴산이 도입된 PLLA/PLCL 나노섬유를 AEXPLC, 젤라틴이 추가적으로 도입된 나노섬유를 Gel-AEXPLC로 명명하였다.

6. 주사전자 현미경(SEM) 분석

공극을 증가시킨 나노섬유 형태를 확인하기 위해 주사전자현미경(JSM-6390, JEOL, Japan)을 이용하여 확인하였다. 고해상도의 이미지를 얻기 위해서 sputter coater를 이용하여 60초 동안 백금코팅을 하였으며, 전자빔 10 kV, 10~12 mm의 거리의 조건으로 측정하였다. 또한 나노섬유의 공극을 측정하기 위해 Image-J (NIH, USA)를 사용하여 SEM 이미지에서 무작위로 선정한 200개의 공극을 측정하여 그 평균값을 구하였다.

7. Toluidine blue O (TBO) 염색 및 정량

아크릴산이 도입된 EXPLC 표면의 카르복실 그룹을 확인하기 위해 TBO를 이용하여 염색 및 정량 분석을 하였다. 24 well plate에 TBO solution (60 mg NaCl, and 12 mg toluidine blue O chloride in 0.01 M HCl 30 ml) 500 μl와 AEXPLC를 넣고 4시간 이상 교반 후, 3차 증류수를 이용하여 TBO가 더 이상 녹아 나오지 않을 때까지 세척하였다. 세척이 끝난 AEXPLC를 0.1 M NaOH와 에탄올을 혼합한 용액(1 : 4, v/v)에 TBO가 나노섬유에서 완전히 제거될 때까지 녹인 후 UV-visible spectrometer (PowerWave XS, Biotek, USA)를 이용하여 530 nm에서 측정하였다.

8. 접촉각 측정

아크릴산이 도입된 EPLC의 아크릴산 함량에 따른 친수

화도를 확인하기 위해 접촉각 측정기(Phoenix-300, surface electro optics Ltd, Korea)를 이용하여 측정하였다. 정제된 증류수를 실린지에 주입한 후 10 μl씩 AEXPLC 표면에 떨어뜨렸다.

9. 전반사 적외선 분광 분석기(ATR-FTIR) 분석

젤라틴과 아크릴산이 도입된 EXPLC 표면의 화학적 특성을 ATR-FTIR spectrophotometer (Bruker Tensor 37, Bruker AXS. Inc., Germany)를 이용하여 확인하였다. Spectra는 1500~1850 cm^{-1}의 범위를 측정하였으며, ATR 모드와 주사회수는 64회, 6 cm^{-1} 분해능의 조건으로 측정하였다.

10. 세포 침투율 및 증식률 평가

젤라틴과 아크릴산이 도입된 EXPLC에 세포를 배양하여 세포 침투율 및 증식률을 확인하기 위해 24 well plate에 PLC, EXPLC, AEXPLC, Gel-AEXPLC를 넣은 후 평활근세포(Smooth muscle cells, SMC, Lonza, USA)를 현탁액 2×10^4의 밀도로 나노섬유 표면에 접종한 후 SmBM®(Lonza, USA)배지에 넣고, 37°C, 5% CO_2 배양기에서 7일 동안 배양하였다. EXPLC에 대한 평활근세포의 세포 침투율을 확인하기 위해 3.7% paraformaldehyde를 이용하여 상온에서 15분 동안 반응시켜 세포를 고정한 후 건조시키기 위해 순서대로 60, 70, 80, 90, 95, 100%의 에탄올에 각각 20분 동안 반응시킨 후 건조하였다. 건조된 나노섬유는 주사전자현미경을 이용하여 세포 침투율을 확인하였다. 또한 젤라틴과 아크릴산이 도입된 EXPLC에 대한 평활근세포의 1, 4, 7일 동안의 증식을 확인하기 위해 Cell counting kit-8 (CCK-8, Dojindo, Japan)을 이용하였다. 배지와 CCK-8 용액의 비율은 9 : 1의 비율로 혼합하였으며, 500 μl씩 각각의 나노섬유에 넣고 37°C에서 2시간 동안 처리한 후 Spectrometer (PowerWave XS, Biotek, USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

11. 통계처리

모든 실험 결과의 통계처리는 각각의 시료에 대한 평균±표준오차로 나타내었으며, two-tailed unpaired Student's *t*-test (Excel, Microsoft)으로 $p<0.05$ 수준에서 실시하여 평가하였다.

결 과

1. 주사전자 현미경(SEM) 분석

UTM을 이용하여 공극을 증가시킨 나노섬유 형태를 주사전자현미경을 통해 확인하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 공극을 증가시킨 부분과 증가시키지 않은 부분의 경계면을 통해 확인한 결과, UTM을 이용하여 5 mm min^{-1}의 속도로 나노섬유를 당겨 나노섬유가 전체의 13%까지 증가시켰으며, 공극을 증가시킨 부분은 공극을 증가시키지 않은 부분에 비해 넓은 형태로 확인되었다. 또한 Fig. 2의 (d)에서 공극을 측정한 결과, 공극을 증가시키지 않은 섬유는 59.99±8.66 microns이였으며, 공극을 증가시킨 섬유의 공극은 203.30±49.62 microns으로 측정하였다.

2. Toluidine blue O (TBO) 염색 및 정량

EXPLC에 도입된 아크릴산의 카르복실 그룹을 확인하기 위해 이와 반응하는 TBO를 이용하여 UV-visible spectrometer (580 nm)으로 확인하였다. Fig. 3의 (a)에서 보는 바와 같이 PLC는 카르복실 그룹이 없기 때문에 염색이 되지 않은 반면, 아크릴산이 도입된 EXPLC는 카르복실 그룹으로 인해 푸른색으로 염색이 되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 아크릴산이 1, 5, 10%로 함량이 증가될수록 더 많은 양의 TBO가 염색되어 진한 푸른색을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. Fig. 3의 (b)에서 보는 바와 같이 아크릴산이 도입되지 않은 EPLC의 경우 TBO가 정량되지 않은 반면,

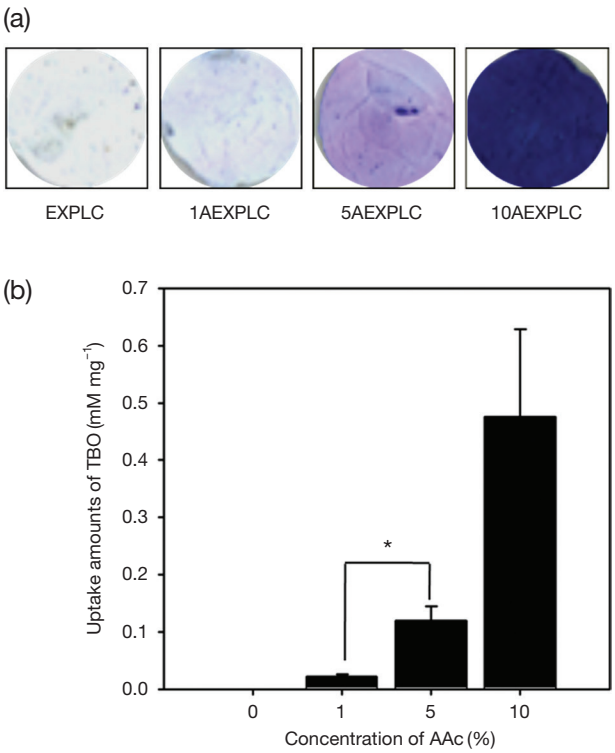

Fig. 3. Quantification of carboxylic acid groups of AAc grafted PLLA/PLCL nanofibers. (a) toluidine blue O (TBO) stained 1, 5, 10 wt% AAc grafted PLLA/PLCL nanofibers, (b) uptake amount of toluidine blue O (*$p<0.05$).

1AEXPLC는 TBO가 0.02±0.01 mM mg^{-1}로 정량되었으며, 5AEXPLC와 10AEXPLC 역시 각각 0.12±0.03 mM mg^{-1}와 0.48±0.15 mM mg^{-1}의 TBO가 정량되었다.

3. 접촉각 측정

아크릴산 함량에 따른 나노섬유의 친수화도를 확인하기 위해 접촉각을 측정하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 아크릴산이 도입되지 않은 EXPLC의 경우 89.55±1.89°로 높은 소수성을 나타내고 있는 반면 아크릴산 함량이 1, 5, 10%로 증가함에 따라 접촉각이 83.64±2.10, 62.12±8.16, 50.35±11.28°로 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

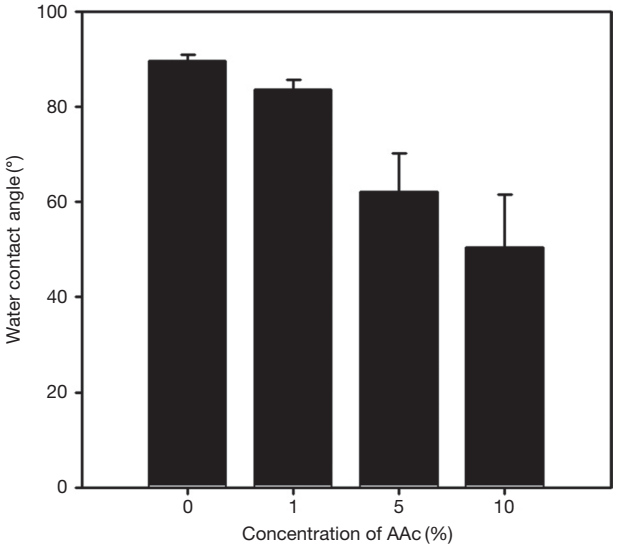

Fig. 4. Water contact angle of 1, 5, 10 wt% AAc-PLLA/PLCL nanofibers.

4. 전반사 적외선 분광 분석기(ATR-FTIR) 분석

AEXPLC와 EDC/NHS로 젤라틴을 추가로 도입한 Gel-AEXPLC의 화학적 구조를 분석하기 위해 전반사 적외선 분광 분석기를 이용하여 카르복실 그룹을 확인하였다. Fig. 5(a)에서 보는 바와 같이 EXPLC는 1750 cm^{-1}에서 카보닐 그룹이 관찰되었으며, 아크릴산 함량이 증가함에 따라 1700 cm^{-1}에서 카보닐 그룹과 카르복실 그룹이 합쳐져서 넓은 형태로 관찰되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 젤라틴을 추가로 도입한 후 Fig. 5(b)에서 보는 바와 같이 Gel-AEXPLC에서 1650 cm^{-1}과 1550 cm^{-1}에서 젤라틴의 아마이드 그룹이 확인되어 AEXPLC에 젤라틴을 추가로 도입할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

5. 세포 침투율 및 증식률 평가

공극을 증가시킨 EXPLC에 아크릴산과 젤라틴을 도입한 후 세포의 침투율과 증식률을 주사전자현미경과 CCK-8를 통해 확인하였다. Gel-AEXPLC에 평활근세포를 7일 동안 배양한 후 주사전자현미경을 통해 세포 침투율을 확인한 결과, Fig. 6에서 보는 바와 같이 공극을 증가시키지 않은 PLC보다 공극을 증가시킨 EXPLC가 세포가 섬유 사이사이 안으로 침투되어 배양되는 것을 확인하였고, 아크릴산과 젤라틴을 도입한 EXPLC의 경우 보다 많은 양의 세포가 섬유 깊숙한 곳까지 침투하여 증식하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 CCK-8를 이용하여 세오 증식률을 확인한 결과, Fig. 7에서 보는 바와 같이 1일차의 경우 EXPLC보다 젤라틴이

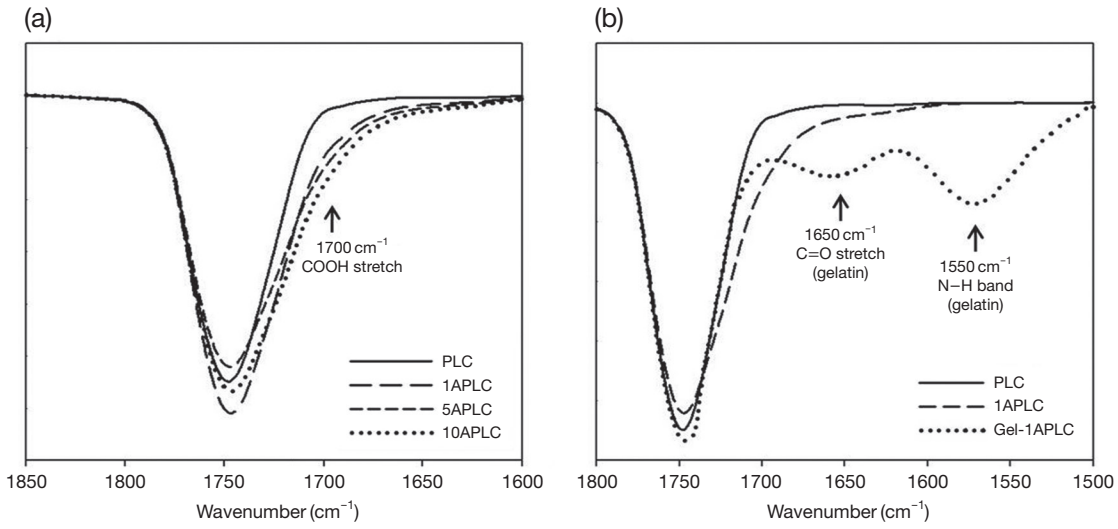

Fig. 5. Surface chemical properties of the gelatin immobilized AAc-PLLA/PLCL nanofibers by Attenuated total reflectance-fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR). (a) peak shift of the AAc grafted PLLA/PLCL nanofibers, and (b) spectrum of gelatin immobilized AAc-PLLA/PLCL nanofibers.

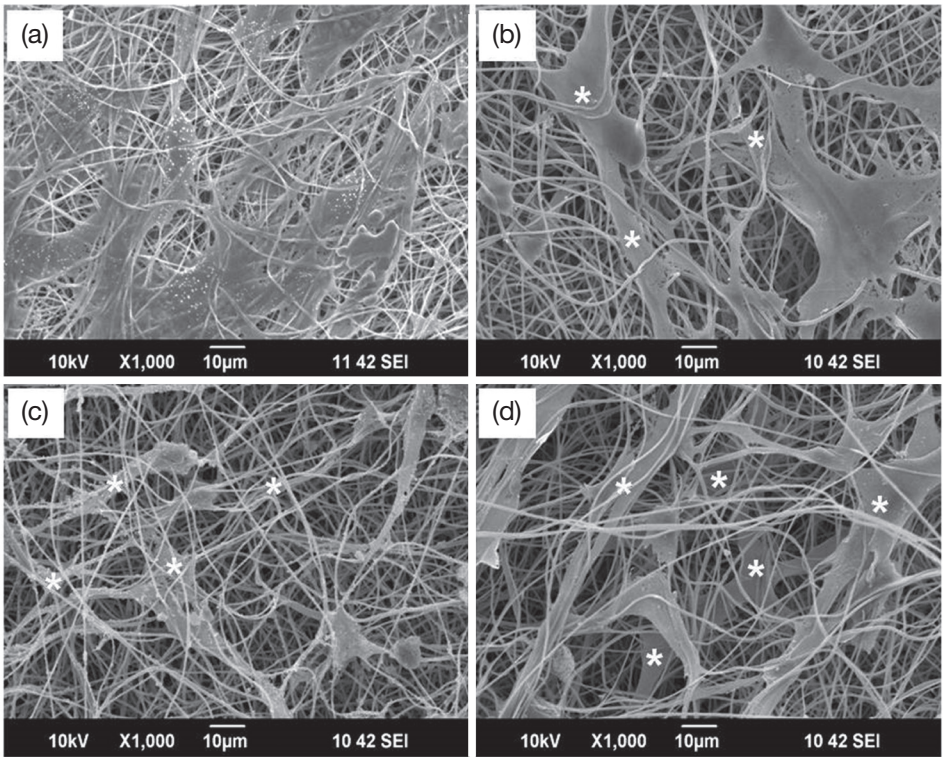

Fig. 6. Morphologies of SMC cultured on the PLLA/PLCL nanofibers for 1 day by Scanning electron microscopy (SEM). (a) non-extended PLLA/PLCL nanofibers, (b) extended PLLA/PLCL nanofibers, (c) AAc grafted Ex-PLLA/PLCL nanofibers, and (d) gelatin immobilized AAc-Ex-PLLA/PLCL nanofibers.

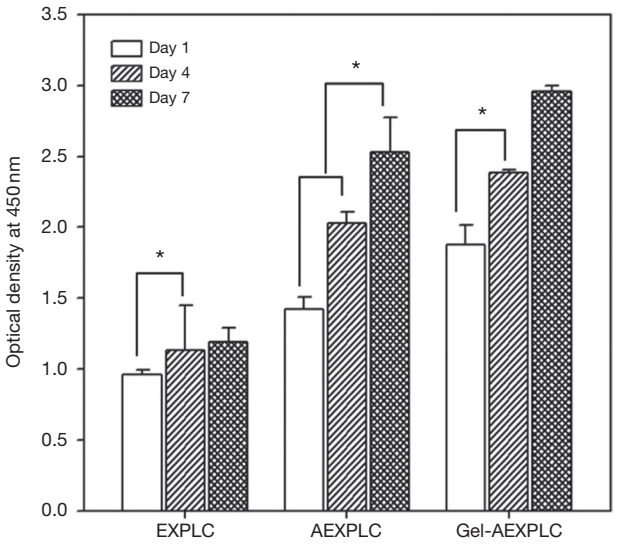

Fig. 7. Proliferation of SMC for 7 days (*$p < 0.05$).

도입된 Gel-AEXPLC에서 세포 증식률이 증가하는 것을 확인하였다. PLC의 경우 1, 4, 7일 동안 세포 증식률의 변화가 거의 없는 반면 젤라틴이 도입된 Gel-AEXPLC의 경우 7일차의 경우 1일차보다 세포 증식률이 눈에 띄게 증가된 것을 확인하였다.

고 찰

본 연구에서는 혈관의 평활근세포층을 대체하기 위한 지지체를 개발하기 위해 혈관 소재로 많이 사용되고 있는 PLLA와 PLCL을 혼합하여 전기방사를 통해 3차원 다공성 나노섬유를 제작하였다. 이렇게 제작된 나노섬유 지지체는 세포의 침투율을 증가시키기 위해 UTM을 이용하여 공극을 증가시켰다. 공극의 증가 여부를 증명하기 위해 주사전자현미경을 통해 공극을 증가시킨 부분과 증가시키지 않은 부분을 비교하였다. 공극을 증가시키지 않은 부분은 나노섬유가 적층되어 세포들이 섬유 전체에 침투할 수 없으며, 섬유 표면에 증식할 것이라고 가정할 수 있었다(Kurpinski *et al*. 2010). 반면에 공극을 증가시킨 부분은 세포가 섬유 전체에 침투하여 증식함으로써 혈관의 평활근세포층의 기능을 할 수 있을 것이라고 가정할 수 있었다. 이에 따라 주사전자현미경을 통해 공극의 증가 여부를 확인할 수 있었으며, 공극의 차이는 3.33배로 측정되어 세포가 섬유 전체에 증식할 수 있을 것이라고 가정할 수 있었다. 감마선을 이용하여 아크릴산의 도입여부를 증명하기 위해 카르복실 그룹과 반응하는 TBO를 이용하여 염색 및 정량하였다. 아크릴산 함량이 증가될수록 카르복실 그룹과 반응한 TBO도 증가되었으며, 방사선을 이용하여 함량에 따른 아크릴산의 도입이 가

능하다는 것을 확인하였다(Shin *et al*. 2008). 접촉각 측정을 통해 아크릴산 도입으로 인해 섬유가 친수화가 되는 것을 확인할 수 있었다. 감마선 조사에 의해 EXPLC에 성공적으로 아크릴산이 도입된 것을 확인할 수 있으며, 친수화된 AEXPLC에서 세포친화력을 증가시켜 세포 점착 및 증식률을 높여줄 것으로 사료된다(Jeong *et al*. 2015). 또한 전반사 적외선 분광 분석기를 통해 카르복실 그룹과 아마이드 그룹을 확인함으로써 나노섬유에 아크릴산과 젤리틴이 도입되는 것을 확인할 수 있었다. 마지막으로 공극이 증가된 나노섬유의 세포 침투율과 증식률을 확인한 결과, 공극의 증가가 세포의 침투율 증가에 영향을 주는 것을 확인하였으며, 이는 공극이 증가하여 세포가 섬유 안으로 침투하였으며, 젤라틴의 영향으로 인해 세포 접착력과 증식률이 증가되어 많은 양의 세포가 관찰되는 것으로 사료된다. PLC의 경우 1, 4, 7일 동안 세포 증식률의 변화가 거의 없는 반면 젤라틴이 도입된 Gel-AEXPLC의 경우 7일차의 경우 1일차보다 세포 증식률이 눈에 띄게 증가된 것을 CCK-8을 통해 확인하였다. 이는 아크릴산 도입 후 젤라틴의 추가 도입으로 인해 세포 증식률을 증가시켜준 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 전기방사를 이용하여 제작된 PLLA/PLCL 나노섬유를 UTM을 이용하여 나노섬유의 공극을 증가시켰다. 또한 세포 증식률을 증가시키기 위해 감마선을 이용하여 아크릴산을 도입한 후 EDC/NHS 반응을 통해 젤라틴을 추가로 도입하였다. 공극의 증가를 확인하기 위해 주사전자현미경을 통해 공극이 3.33배 증가된 것을 확인하였으며, 아크릴산과 젤라틴의 도입은 TBO 염색 및 정량 분석, 접촉각 측정, 전반서 적외선 분광분석기를 통해 증명하였다. 또한 SMC를 이용하여 공극의 증가와 젤라틴의 도입에 따른 세포 침투율과 증식률을 확인하여 감마선을 이용한 혈관조직공학용 지지체로써의 응용 가능성을 확인하였다.

사 사

본 연구는 2015년 미래창조과학부의 한국연구재단 재원으로 원자력연구개발 사업(2012M2A2A6013196)의 지원에 의해 이루어진 것으로, 이에 감사 드립니다.

참 고 문 헌

Ahn H, Ju YM, Takahashi H, Williams DF, Yoo JJ, Lee SJ, Okano T and Atala A. 2015. Engineered small diameter vascular grafts by combining cell sheet engineering and electrospinning technology. *Acta Biomaterialia* **16**:14-22.

Baker BM, Gee AO, Metter RB, Nathan AS, Marklein RA, Burdick JA and Mauck RL. 2008. The potential to imprve cell infiltration in composite fiber-aligned electrospun scaffolds by the selective removal of sacrificial fibers. *Biomaterials* **29**:2348-2358.

Chan CM and Ko TM. 1996. Polymer surface modification by plasmas and photons. *Surf. Sci. Rep*. **24**:1-54.

Choi JB, Jeong SI, Gwon HJ, Park JS, Nho YC, Choi YH, Park KJ, Park MY, Shin H and Lim YM. 2012. Preparation and Characterization of Gelatin-immobilized Bacterial Cellulose Scaffold for Tissue Engineering Using Gamma-ray Irradiation. *Journal of Radiation Industry* **6**(2):159-164.

Choi JH, Lee YJ, Lim YM, Kang PH, Shin JH and Nho YC. 2007. Radiation processing of polymeric materials. *Polymer Science and Technology* **18**(3):253-258.

Choi JW, Lim SH, Hong YS and Kim BS. 2008. Development of artificial vessels with autologous bone marrow cells and polymers. *Korean J. Thorac. Cardiovasc. Surg*. **41**:160-169.

Furukawa KS, Ushida T, Toita K, Sakai Y and Tateishi T. 2002. Hybrid of Gel-Cultured Smooth Muscle Cells With PLLA Sponge as a Scaffold Towards Blood Vessel Regeneration. *Cell Transplant*. **11**(5):475-480.

Hasırcı V, Lewandrowski K, Gresser JD, wise DL and Trantolo DJ. 2001. Versatility of biodegradable biopolymers: degradability and an in vivo application. *J. Biotechnol*. **86**:135-150.

Jeong JO, Jeong SI, Shin YM, Park JS, Gwon HJ, An SJ, Huh JB, Shin H and Lim YM. 2015. Development of Acrylic Acid Grafted Polycaprolactone (PCL)/Biphasic Calcium Phosphate (BCP) Nanofibers for Bone Tissue Engineering Using Gamma-Irradiation. *Polym.-Korea* **39**(3):1-8.

Jeong SI, Kim BS, Kang SW, Kwon JH, Lee YM, Kim SH and Kim YH. 2004. In vivo biocompatibilty and degradation behavior of elastic poly(l-lactide-co-e-caprolactone) scaffolds. *Biomaterials* **25**:5939-5946.

Jeong SI, Kim SH, Kim YH, Jung Y, Kwon JH, Kim BS and Lee YM. 2004. Manufacture of elastic biodegradable PLCL scaffolds for mechano-active vascular tissue engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed*. **15**(5):645-660.

Jeong SI, Kwon JH, Lim JI, Cho SW, Jung Y, Sung WJ, Kim SH, Kim YH, Lee YM, Kim BS, Choi CY and Kim SJ. 2005. Mechano-active tissue engineering of vascular smooth muscle using pulsatile perfusion bioreactors and elastic PLCL scaffolds. *Biomaterials* **26**:1405-1411.

Jin GZ, Kim M, Shin US and Kim HW. 2011. Neurite outgrowth of dorsal root ganglia neurons is enhanced on aligned nanofibrous biopolymer scaffold with carbon nanotube coating.

Neurosci. *Lett*. **501**:10-14.

Kang TY, Hong JM, Kim BJ, Cha HJ and Cho DW. 2013. Enhanced endothelialization for developing artificial vascular networks with a natural vessel mimicking the luminal surface in scaffolds. *Acta Biomaterialia* **9**:4716-4725.

Kim MJ, Kim JH, Yi G, Lim SH, Hong YS and Chung DJ. 2008. In vitro andin vivo application of PLGA nanofiber for artificial blood vessel. *Macromolecular Research* **16**(4): 345-352.

Kurpinski KT, Stephenson JT, Janairo RRR, Lee H and Li S. 2010. The effect of fiber alignment and heparin coating on cell infiltration into nanofibrous PLLA scaffolds. *Biomaterials* **31**:3536-3542.

Laleh GM, Prabhakaran MP, Morshed M, Nasr-Esfahani MH and Ramakrishn S. 2008. Electrospun poly(3-caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Biomaterials* **20**:4532-4539.

Lee HB, Kim MS, Cho YH, Kang KS and Lee JH. 2005. Preparation of gradient polymer surface and their pluripotent biomedical applications. *Polym.-Korea* **29**(5):423-432.

Lee KH, Jeong IT, Sim SH and Youn GB. 2008. Fabrications and applications of core/sheath, hollow and nanoporous structured nanofibers by electrospinning. *Polymer Science and Technology* **19**(1):25-34

Li M, Guo Y, Wei Y, MacDiarmid AG and Lelkes PI. 2006. Electrospinning polyaniline-contained gelatin nanofibers for tissue engineering applications. *Biomaterials* **27**:2705-2715.

Lim JI, Yu B and Lee YK. 2008. Fabrication of collagen hybridized elastic PLCL for tissue engineering. *Biotechnol*. *Lett*. **30**:2085-2090.

Ma Z, Kotaki M, Yong T, He W and Ramakrishna S. 2005. Surface engineering of electrospun polyethylene terephthalate (PET) nanofibers towards development of a new material for blood vessel engineering. *Biomaterials* **26**(15):2527-2536.

Matsuda S, Iwata H, Se N and Ikada Y. 1999. Bioadhesion of gelatin films crosslinked with glutaraldehyde. *J*. *Biomed*. *Mater. Res*. **45**(1):20-27.

Miao YE, Zhu H, Chen D, Wang R, Tiju WW and Liu T. 2012. Electrospun fibers of layered double hydroxide/biopolymer nanocomposites as effective drug delivery systems. *Mater. Chem*. *Phys*. **134**:623-630.

Mo XM, Xu CY, Kotakib M and Ramakrishnaa S. 2004. Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation. *Biomaterials* **25**:1883-1890.

Park KS, Kim SM, Kim MS, Lee LW, Lee JM, Lee HB and Kang KS. 2006. Interaction of schwann cells with various protein or polypeptide-coated PLGA surface. *Polym.-Korea* **30**(5):445-452.

Park SA, Lee SH and Kim W. 2009. Development of biomimetic scaffold for tissue engineering. *Elastomers and Composites* **44**(2):106-111

Phipps MC, Clem WC, Grunda JM, Clines GA and Bellis SL. 2012. Increasing the pore sizes of bone-mimetic electrospun scaffolds comprised of polycaprolactone, collagen I and hydroxyapatite to enhance cell infiltration. *Biomaterials* **33**:524-534.

Ping X, Wang M and Ge X. 2011. Surface modification of poly (ethyleneterephthalate) (PET) film by gamma-ray induced grafting of poly(acrylicacid) and its application in antibacterial hybrid film. *Radiat*. *Phys*. *Chem*. **80**:567-572.

Rasal RM, Janorkar AV and Hirt DE. 2010. Poly(lactic acid) modifications. *Prog*. *Polym*. *Sci*. **35**:338-356.

Sepideh HH, Katja SL, Dhanasopon AP, Rofail F, Hunter S, Wu BM, Shemin R, Beygui RE and MacLellan WR. 2008. Three-dimensional electrospun ECM-based hybrid scaffolds for cardiovascular tissue engineering. *Biomaterials* **29**:2907-2914.

Shin YM, Kim KS, Lim YM, Nho YC and Shin H. 2008. Modulation of Spreading, Proliferation, and Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells on Gelatin-Immobilized Poly(L-lactide-co-E-caprolactone) Substrates. *Biomacromolecules* **9**:1772.

Shin YM, Kim WJ, Park JS, Gwon HJ, Nho YC and Lim YM. 2011. Polydopamine coating behaviors on the acrylic acid grafted-nanofibers. *Journal of Radiation Industry* **5**(4):371-376.

Srouji S, Kizhner T, Suss-Tobi E, Livne E and Zussman E. 2008. 3-D Nanofibrous electrospun multilayered construct is an alternative ECM mimicking scaffold. *J*. *Mater. Sci*.-*Mater. M*. **19**:1249-1255.

Sung HW, Huang DM, Chang WH, Huang RN and Hsu JC. 1999. Evaluation of gelatin hydrogel crosslinked with various crosslinking agents as bioadhesives: In vitro study. *J*. *Biomed*. *Mater. Res*. **46**(4):520-530.

Tillman BW, Yazdani SK, Lee SJ, Geary RL, Atala A and Yoo JJ. 2009. The in vivo stability of electrospun polycaprolactone-collagen scaffolds in vascular reconstruction. *Bioamterials* **30**(4):583-588.

Uchida T, Iked S, Oura H, Tada M, Nakano T, Fukuda T, Matsuda T, Negoro M and Arai F. 2008. Development of biodegradable scaffolds based on patient-specific arterial configuration. *J*. *Biotechnol*. **133**(2):213-218.

Vaz CM, Tuijl S, Bouten CVC and Baaijens FPT. 2005. Design of scaffolds for blood vessel tissue engineering using a multi-layering electrospinning technique. *Acta Biomaterialia* **1**(5):575-582.

Wang Q, Jamal S, Detamore MS and Berklang C. 2011. PLGA-chitosan/PLGA-alginate nanoparticle blends as biodegradable colloidal gels for seeding human umbilical cord mes-

enchymal stem cells. *J. Biomed. Mater. Res.-A.* **96A**:520-527.

Wright LD, Andric T and Freeman JW. 2011. Utilizing NaCl to increase the porosity of electrospun materials. *Mater. Sci. Eng.* **31**:30-36.

Zander NE, Orlicki JA, Rawlett AM and Beebe TP. 2013. Electrospun polycaprolactone scaffolds with tailored porosity using two approaches for enhanced cellular infiltration. *J. Mater. Sci.-Mater. M.* **24**:179-187.

Zang S, Zhang R, Chen H, Lu Y, Zhou J, Chang X, Qiu G, Wu Z and Yang G. 2015. Investigation on artificial blood vessels prepared from bacterial cellulose. *Mater. Sci. Eng. C.* **46**:111-117.

Zhao X, Irvine SA, Agrawal A, Cao Y, Lim PQ, Tan SY and Venkatraman SS. 2015. 3D patterned substrates for bio-artificial blood vessels - The effect of hydrogels on aligned cells on a bilmaterial surface. *Acta Biomaterialia* **26**:159-168.

Received: 10 November 2015
Revised: 15 November 2015
Revision accepted: 20 November 2015