*Journal of Radiation Industry* 7 (1) : 45~49 (2013)

# 감마선 조사법을 이용한 전기방사 나노/마이크로 섬유 지지체의 표면 기능화

임종영 · 신영민 · 최종배 · 정진오 · 권희정
정성린 · 박종석 · 임윤묵*

한국원자력연구원 첨단방사선연구소 공업환경연구부

# Functionalization of Electrospun Nano/Micro-fibrous Scaffolds Using Gamma-ray Irradiation

Jong-Young Lim, Young Min Shin, Jong-Bae Choi, Jin-Oh Jeong,
Hui-Jeong Gwon, Sung In Jeong, Jong-Seok Park and Youn-Mook Lim*

*Research Division for Industry & Environment, Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 580-185, Korea*

**Abstract - In tissue engineering application, a fibrous structure of scaffolds has been issued as an alternative system to regulate cell survival and tissue regeneration, and electrospinning technique has been popularly used to generate fibrous meshes or sheets mimicking the structure of native extracellular matrix (ECM). However, recent strategy in the scaffold development is expanded to provide the structural property as well as a biological property of native ECM, a variety of surface modification techniques have been used to introduce biological property. In this study, we developed biomimetic poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) (PLCL) nano- and micro-fibrous scaffolds as a unique platform with structural and biological properties with native ECM using electrospinning method and gamma-ray irradiation. Surface morphology of the scaffolds was observed by scanning electron microscopy, and alteration of surface property was evaluated with toluidine blue O staining, water contact angle measurement and ATR-FTIR analysis.**

**Key words : Poly(L-lactide-co-ε-caprolactone), Electrospinning, Gamma-ray irradiation**

## 서 론

조직공학은 재료공학 및 생물학 기술의 융합학문으로 손상된 장기의 빠른 재생을 그 목적으로 탄생하였다. 조직공학은 크게 재료가공 분야인 지지체 개발 부분과 이들 지지체에서 성장할 수 있는 세포의 배양기술이 중심이며, 다양한 형태의 지지체 및 세포들이 손상된 조직의 빠른 재생을 위해 연구되고 있다. 특히, 지지체는 천연 또는 합성고분자를 중심으로 개발되고 있으며, 그 형태는 일반적으로 다공성 지지체가 주를 이루고 있다. 하지만, 최근 지지체 개발 기술의 발전으로 3차원의 섬유 구조형 지지체가 각광을 받고 있으며, 이들 지지체는 세포외기질과의 구조적 유사성으로 인해 그 중요성이 더욱 증가되고 있다. 다양한 섬유형 지지체 개발 기술 중 전

* Corresponding author: Youn-Mook Lim, Tel. +82-63-570-3065, Fax. +82-63-570-3079, E-mail. ymlim71@kaeri.re.kr

기방사법은 조작 방법이 간단하여 연구자들이 많이 사용하고 있으며, 원리는 고분자 용액을 흘려줌과 동시에 높은 전압을 가해주는 것이다. 이때, 노즐 끝에 반구형 방울이 생기게 되며 전하들 사이의 반발력으로 인해 테일러콘이 형성되면서 나노 또는 마이크로 크기의 섬유가 방사되어 집적판에 적층되며, 고분자의 농도, 용매의 종류, 노즐의 크기, 전압의 세기, 용액의 방출속도 등 다양한 변수들을 조절하여 원하는 직경의 섬유를 제조할 수 있는 장점이 있다(Kwon *et al.* 2005). 이렇게 제조된 지지체는 세포외기질과 유사한 구조를 가지고 있기 때문에 조직공학적 측면에서 많이 사용되고 있으며, 합성고분자로는 poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), poly(ε-caprolactone) (PCL), poly(L-lactic acid) (PLLA), poly(lactic acid-co-ε-caprolactone) (PLCL) 등이 사용되어지고 있다. 또한, 천연 고분자로는 콜라젠, 젤라틴, 파이브로넥틴 등이 전기방사법을 이용하여 섬유형 지지체를 개발하는데 활발하게 사용되고 있다(Jamil *et al.* 2002; Bini *et al.* 2006; Laleh *et al.* 2008). 본 연구에서는 전기방사법을 이용하여 나노/마이크로 섬유형 지지체를 각각 제조하고, 감마선 조사 기술을 이용하여 아크릴산을 그라프트했으며, 섬유형 지지체의 섬유 구조, 아크릴산 도입율과 표면 특성의 변화를 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

L-lactide는 Purac Biochem (Netherlands)에서 구입하였으며, 2,2,2-trifluoroethanol (TFE), toluidine blue O, ε-caprolactone, stannous octoate, toluene, and acrylic acid (AAc)는 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하였다. Dichloromethane (DCM)은 Showa chemical (Japan)에서 구입하여 사용하였다.

### 2. Poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) (PLCL) 합성 및 섬유 제조

PLCL은 촉매로서 stannous octoate 사용하여 L-lactide (LA)와 ε-caprolactone (CL) (LA : CL=50 : 50)을 개환중합했으며, 합성된 PLCL (MW 430,000 g $mol^{-1}$)은 DCM과 TFE (8 : 2)의 용매에 각각 4, 15 wt% 농도로 용해했다. 이들 용액은 10 또는 18 kV의 전압에서 노즐과 집적판의 거리를 15 cm로 유지하면서, 1 또는 2 ml $h^{-1}$의 방출속도로 전기방사를 실시했고, 습도는 21% 미만을 유지하였다.

### 3. 아크릴산 그라프트

전기방사를 통해 제조된 섬유의 표면에 아크릴산을 그라프트하기 위해서 감마선을 사용하였다. 간단히 0.01 M의 Mohr's salt가 포함된 2%의 아크릴산 용액에 PLCL 섬유를 담지하고 10 kGy (10 kGy $hour^{-1}$)의 선량으로 조사하였으며, 조사된 섬유에서 반응을 하지 않은 아크릴산을 제거하기 위해 48시간 동안 증류수를 이용하여 세척하였다.

### 4. 주사전자현미경을 이용한 형태 분석

섬유 표면 구조의 변화를 확인하기 위해서 sputter coating을 65초간 작동시켜 섬유의 표면에 골드코팅을 실시하였으며, 10 kV의 전자 빔 세기, 10 mm의 측정거리 조건에 주사전자현미경 (JSM-6390, JEOL, Japan)을 이용하여 관찰하였다. 그리고 섬유의 직경은 Image-J (NIH, USA) 프로그램을 사용하여 측정하였다.

### 5. 젖음성 측정

PLCL과 아크릴산이 그라프트된 PLCL 섬유의 젖음성 변화를 평가하기 위해 접촉각 측정기 (Phoenix-300, surface electro optics Ltd., Korea)를 이용하여 접촉각을 측정하였다. 접촉각은 1초 간격으로 4초 동안 측정하였으며, 물방울은 10 μl를 떨어트렸다.

### 6. 감쇠 전반사 적외선 분광 분석 (ATR-FTIR)

PLCL과 아크릴산이 그라프트된 PLCL 섬유는 ATR-FTIR spectrophotometer (Truker TEMSOR 37, Bruker AXS. Inc., Germany)를 이용하여 측정하였으며, 500～4000 $cm^{-1}$의 파장 범위에서 4 $cm^{-1}$의 해상도로 측정하였고 64 scans으로 하였다.

### 7. 그라프트된 아크릴산의 정량 분석

섬유에 그라프트된 아크릴산의 정량분석을 위해 toluidine blue O 염색방법을 통하여 분석하였다. 아크릴산이 그라프트된 섬유를 toluidine blue O 용액 (20 mg 염화나트륨, 0.01 M 염산, 4 mg toluidine blue O chloride)에 24시간 동안 상온에서 반응시켰으며, 이후 반응하지 않고 남은 toluidine blue O를 2차 증류수를 이용하여 제거하였다. 이후에 에틸알코올과 0.1 M 수산화나트륨 (4 : 1, v/v) 혼합용액에서 염색된 toluidine blue O를 초음파 처리를 통하여 완전히 용출시켰으며, 용출된 용액은 microplate spectrophotometer (PowerWave XS, Biotek, USA)를 이용하여 630 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 결과 및 논의

### 1. 주사 전자 현미경을 이용한 구조 관찰

고분자 용액의 농도를 조절함으로써 서로 다른 직경을 갖는 섬유형 지지체를 제작하였다. 주사전자현미경을 이용해 제작된 지지체의 형태를 관찰한 결과, Fig. 1A에서 보는 것과 같이 4 wt%의 PLCL 용액을 방사했을 경우 약 0.57±0.25 μm의 섬유직경을 갖는 나노섬유 지지체 (NF)를 제작할 수 있었으며, 15 wt% 고분자 용액을 이용하여 제작하였을 경우는 약 14.04±2.39 μm의 직경을 갖는 마이크로 섬유 지지체 (MF)를 제작할 수 있었다. 각 지지체의 감마선 조사 전후의 표면의 형태 및 섬유 직경의 변화를 관찰한 결과, 전제적인 구조적 변화는 관찰되지 않았으나, 각 지지체의 섬유 직경은 NF에서 0.61±0.12 μm였으며, MF는 아크릴산 그라프트 후 약 14.7±2.99 μm의 섬유 직경을 보여주어 섬유직경의 변화는 관찰할 수 없었다 (Fig. 1B).

### 2. 물 접촉각 측정

조직공학 지지체로서 세포의 접착력과 증식력 조절에 영향을 줄 수 있는 젖음성을 평가하기 위하여 접촉각을 측정하였다 (Fig. 2A). Fig. 2B을 보면 NF, MF의 경우 각각 87.30±0.3, 93.46±0.31도를 유지하고 있는 반면 아크릴산이 그라프트된 AAc-NF, AAc-MF 섬유는 4초 후에 접촉각이 각각 40.17±2.57와 26.42±3.03으로 줄어든 것을 볼 수 있다. 또한 동일한 그라프트 조건에서 MF

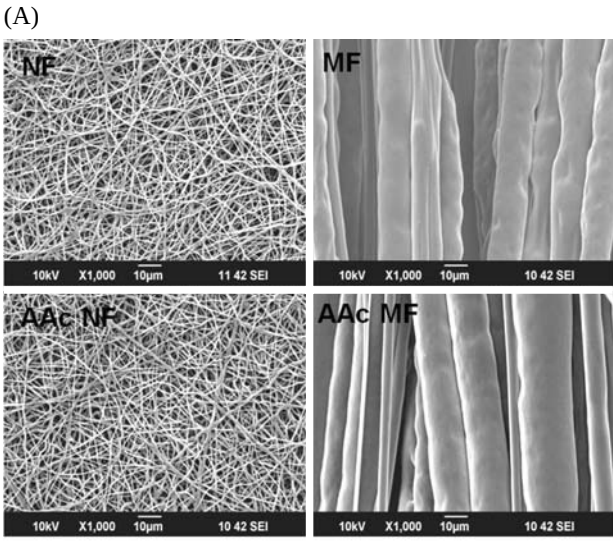


**Fig. 1.** Surface morphology of the fibrous scaffolds, (A) SEM images of the electrospun scaffolds, and (B) average diameter of the fibers.

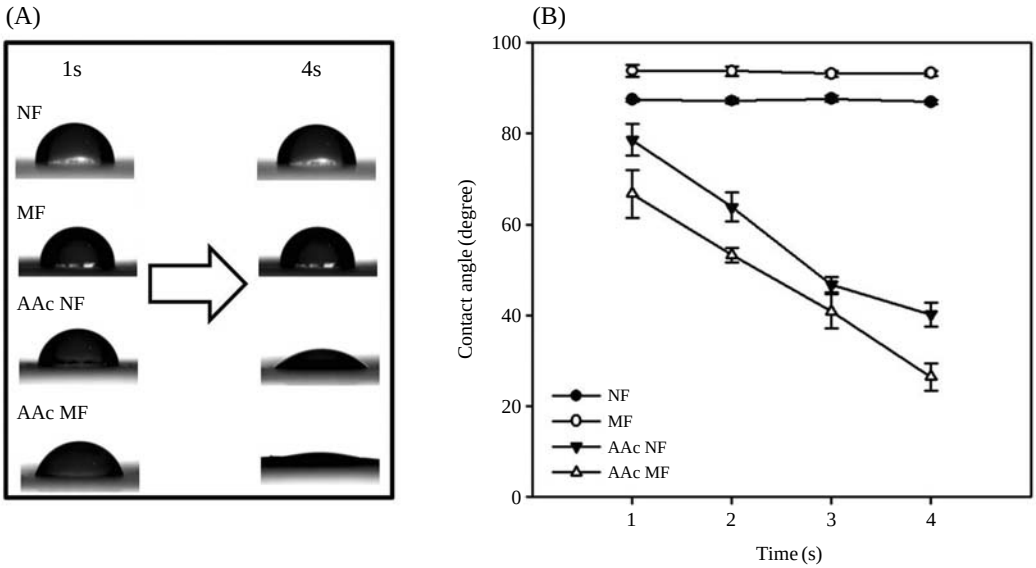


**Fig. 2.** Water contact angle measurement, (A) images of water droplet on the scaffolds, and (B) dynamic water contact angles.

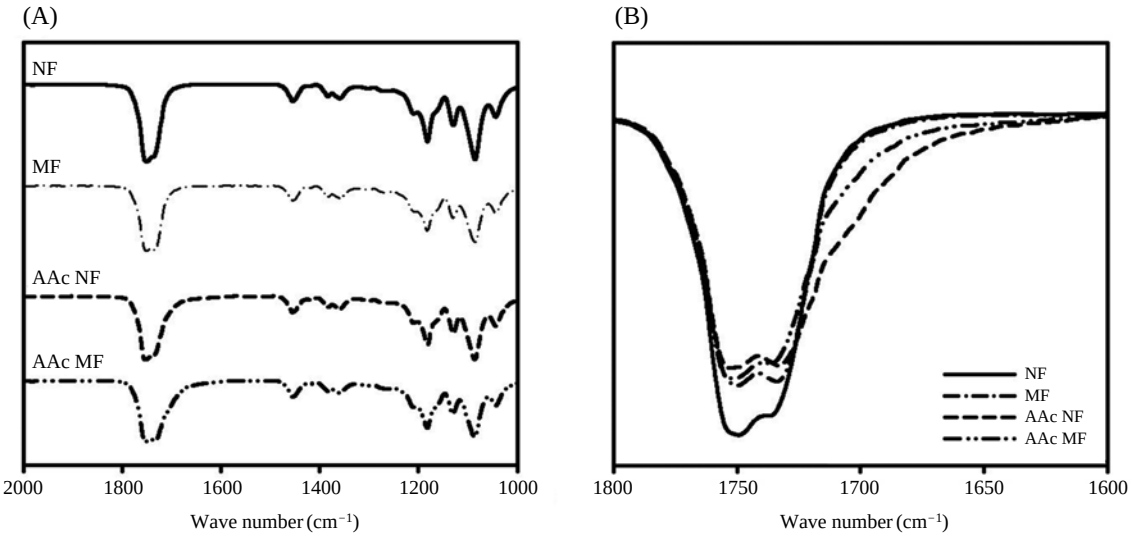


**Fig. 3.** ATR-FTIR spectrum of the scaffolds, (A) wide range of the spectrum, and (B) representative range of the spectrum from 1600 to 1800 $cm^{-1}$.

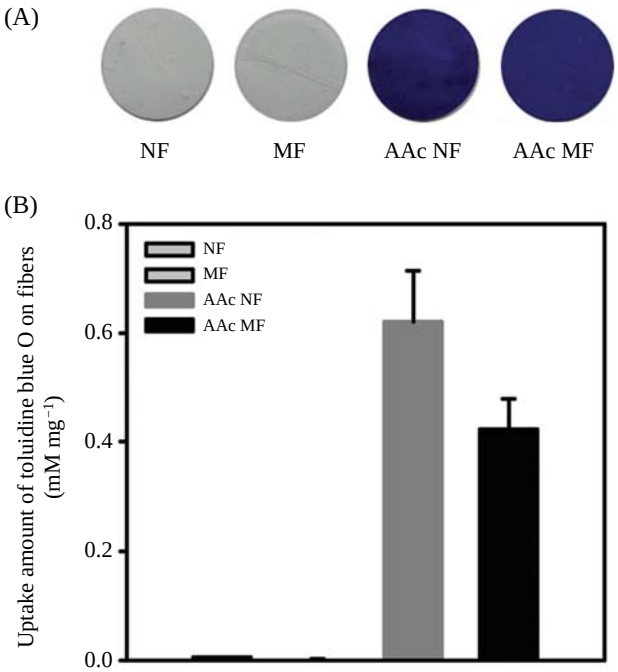


**Fig. 4.** Toluidine blue O staining and quantification, (A) images of toluidine blue O stained scaffolds, and (B) quantification of carboxylic group on the scaffolds.

섬유의 접촉각이 시간에 따라 NF 섬유보다 더 낮은 경향을 보여 기공 크기의 차이에 의한 경향으로 판단된다.

### 3. 화학구조 분석

아크릴산 도입에 따른 지지체의 표면 기능기의 변화를 확인하기 위해 ATR-FTIR을 이용하여 분석하였다 (Fig. 3A). 순수한 PLCL 나노/마이크로 섬유형 지지체는 1740 $cm^{-1}$에서 카르보닐기 (C=O)의 존재를 확인할 수 있었던 반면, 아크릴산이 도입된 지지체는 1740 $cm^{-1}$에서 카르보닐기와 함께 1700 $cm^{-1}$에서 아크릴산의 카르복실기 (-COOH)가 관찰되어 아크릴산이 지지체 표면에 그라프트되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 3B). 또한, NF가 MF에 비하여 카르복실기의 흡수 peak가 높게 나온 것은 지지체의 표면적 증가에 따른 아크릴산의 그라프트양의 변화에 기인할 것으로 생각된다.

### 4. 그라프트된 아크릴산의 정량 분석

Toluidine Blue O는 아크릴산의 카르복실기와 반응하며 결합하는 염색시약으로, 본 실험에서는 섬유에 그라프트된 아크릴산의 카르복실기와 반응하여 푸른색으로 염색된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4A). 섬유에 염색된 TBO의 용출 및 흡광도 분석 결과, NF, MF는 단위질량당 0.6±0.09, 0.42±0.06 mM이 아크릴산이 그라프트된 것을 확인할 수 있었으며 (Fig. 4B), 섬유 직경에 따른 아크릴산의 그라프트 경향이 달라지는 것을 확인할 수 있었다.

## 결 론

본 연구에서는 생분해성 합성고분자인 PLCL을 전기방사법을 이용하여 나노 섬유와 마이크로 섬유를 제작했으며, 감마선을 이용하여 기능기를 도입함으로써 친수

성을 증가시켰다. PLCL 용액의 농도가 높아짐에 따라 섬유의 직경이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 아크릴산이 그라프트되어도 섬유의 구조에는 영향을 끼치지 않는 것을 주사전자현미경을 통하여 확인할 수 있었다. 또한, 아크릴산 도입에 따라 각 섬유들의 젖음성이 증가했음을 확인할 수 있었으며, toluidine blue O 염색 및 용출분석을 통해 마이크로 섬유보다 나노 섬유에서 표면적 증가에 따른 아크릴산 그라프트율의 증가를 확인할 수 있었다. 이 연구 결과를 기반으로 다양한 생분해성 합성고분자 기반 지지체에 감마선을 이용하여 손쉽게 기능기를 도입할 수 있을 것으로 기대되며, 생체모사 기술로서 유용한 기술이 될 것으로 기대된다.

## 사 사

본 연구는 미래창조과학부의 재원으로 시행하는 한국과학재단의 방사선기술개발사업으로 지원받아 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

## 참 고 문 헌

Bini TB, Gao SJ, Wang S and Ramakrishna S. 2006. Poly(l-lactide-co-glycolide) biodegradable microfibers and electrospun nanofibers for nerve tissue engineering: an in vitro study. *Journal of Materials Science* **41**:6453-6459.

Jamil A, Gary E, David G and Gary L. 2002. Electrospinning of Collagen Nanofibers. *Biomacromolecules* **3**:232-238.

Kim SJ, Jang DH, Park WH and Min BM. 2010. Fabrication and characterization of 3-dimensional PLGA nanofiber/microfiber composite scaffolds. *Polymer*. **51**:1320-1327.

Kwon IK, Kidoaki S and Matsuda T. 2005. Electrospun nano- to microfiber fabrics made of biodegradable copolyesters: structural characteristics, mechanical properties and cell adhesion potential. *Biomaterials* **26**:3929-3939.

Laleh GM, Molamma P, Mohammad M, Mohammad H, Nasr E and Seeram R. 2008. Electrospun poly(3-caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Biomaterials* **29**:4532-4539.

Lisbeth G, Adrienne CT and Matt T. 2005. Polymeric Grafting of Acrylic Acid onto Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate): Surface Functionalization for Tissue Engineering Applications. *Biomacromolecules* **6**:2197-2203.

Roberto S. 2002. Use of radiation in biomaterials science. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B*. **191**:752-757.

Sepideh HH, Katja SL, Andrew D, Fady R, Hunter S, Benjamin MW, Richard S, Ramin B and William M. 2008. Three-dimensional electrospun ECM-based hybrid scaffolds for cardiovascular tissue engineering. *Biomaterials* **29**:2907-2914.

Weigel T, Schinkel G and Lendlein A. 2006. Design and preparation of polymeric scaffolds for tissue engineering. *Expert Review of Medical Devices* **3**(6):835-851.

Zonga X, Bienc H, Chungc CY, Yinc L, Fangb D, Benjamin S. Hsiaoa, Chua B and Entcheva E. 2005. Electrospun fine-textured scaffolds for heart tissue constructs. *Biomaterials* **26**:5330-5338.

Manuscript Received: May 31, 2013
Revised: July 31, 2013
Revision Accepted: August 1, 2013