



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

농학석사 학위논문

실크 피브로인과 폴리카프로락톤으로
구성된 3 층구조 혈관형 나노섬유
지지체의 구조 특성, 역학적 성질 및
세포적합성

Structure, mechanical property, and
cytocompatibility of tri-layered nanofiber
scaffold composed of silk fibroin and poly(ϵ -
caprolactone) for vascular graft

2014 년 8 월

서울대학교 대학원
바이오시스템·소재학부
바이오소재공학전공
박 아 름

실크 피브로인과 폴리카프로락톤으로 구성된
3 층구조 혈관형 나노섬유 지지체의 구조 특성,
역학적 성질 및 세포적합성

Structure, mechanical property, and
cytocompatibility of tri-layered nanofiber scaffold
composed of silk fibroin and poly(ϵ -caprolactone) for
vascular graft

지도교수 박 영 환

이 논문을 농학석사 학위논문으로 제출함
2014 년 6 월

서울대학교 대학원
바이오시스템·소재학부
바이오소재공학전공
박 아 름

박아름의 농학석사 학위논문을 인준함
2014년 6 월

위 원 장	<u> </u>	현 진 호	(인)
부위원장	<u> </u>	박 영 환	(인)
위 원	<u> </u>	이 기 훈	(인)

초 록

본 연구에서는 순차적 전기방사 방법을 이용하여 내부층, 중간층, 외부층 3개의 적층구조로 이루어진 실크 피브로인(SF)과 폴리카프로락톤(PCL) 3층구조의 복합 나노섬유 지지체를 제조하고 구조 특성, 역학적 성질 및 세포적합성을 평가하여 혈관 조직공학분야로의 응용 가능성을 살펴보았다. 3층구조 지지체의 내부층은 생체적합성이 우수한 SF 나노섬유, 외부층은 역학적 성질이 우수한 PCL 나노섬유로 구성되었다. 내·외부층의 박리를 최소화하고 형태학적 안정성을 확보하기 위하여 SF와 PCL의 혼합 비율을 달리한 SF/PCL 나노섬유 층을 도입하였고 2차원 매트 형태와 3차원 혈관 형태(내부 직경 1.5mm, 두께 200 μ m 내외)의 지지체를 제조하였다. 각 층의 형태학적 구조와 층간 혼화성을 전자현미경을 통하여 확인하였으며 중간층이 삽입된 3층구조 복합 나노섬유 지지체의 경우 폭 및 길이 방향의 인장강도와 신도, 터짐 압력 강도, 그리고 봉합 유지 강도가 현저히 뛰어남을 보였다. 세포적합성 시험을 수행한 결과 모든 층에서 세포 독성은 없었고 PCL 나노섬유로 구성된 외부층에서는 섬유아세포, 스피루리나(항응고성 첨가 물질)가 함유된 SF 나노섬유 내부층에서는 혈관내피세포의 증식이 높은 것으로 나타났으며 특히 내부층에서 혈관내피세포의 유전자 발현 인자가 활성을 보이는 것으로 관찰되었다. 따라서 SF/PCL 블렌드 나노섬유 중간층이 도입된 3층구조의 SF, PCL 복합 나노섬유 지지체는 생체 혈관의 역학적 성질과 유사한 특성을 가지고 있으며 우수한 생체적합성을 나타내고 있으므로 혈관 조직공학 분야에 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

주요어 : 실크 피브로인, 폴리카프로락톤, 나노섬유, 3층구조, 지지체, 혈관 조직공학

학 번 : 2012-23357

목 차

초 록	i
목 차	ii
List of Tables	v
List of Figures	vi
제 1 장 서 론	1
제 2 장 문헌 연구	5
2.1 생체 혈관의 구조	5
2.2 혈관 대체 인공 이식편	8
2.3 나노섬유 조직공학용 지지체	11
2.4 인공혈관용 지지체	13
제 3 장 재료 및 방법	16
3.1 재료	16
3.1.1 미세조류 스피루리나의 수용액 추출	16
3.1.2 재생 실크 피브로인의 제조	16
3.2 나노섬유 매트 제조 및 분석	17

3.2.1	제조 방법	17
3.2.2	물성 분석	19
3.2.3	역학적 성질 측정	19
3.3	3층구조 혈관형 나노섬유 지지체의 제조 및 분석	21
3.3.1	제조 방법	21
3.3.2	형태학적 구조 관찰	23
3.3.3	역학적 성질 측정	23
3.3.4	생물학적 시험	26
3.4	통계적 분석	28
 제 4 장 결과 및 고찰		29
4.1	나노섬유 매트 구조 특성 및 성질	29
4.1.1	형태학적 구조	29
4.1.2	FT-IR 분석	34
4.1.3	열적 거동	37
4.1.4	표면 친수성	39
4.1.5	인장 성질	42
4.2	3층구조 혈관형 나노섬유 지지체의 구조 특성 및 성능 평가	49
4.2.1	형태학적 구조	49
4.2.2	역학적 성질	53
4.2.2.1	길이방향 인장 성질	53
4.2.2.2	원주방향 인장 성질 및 터짐 압력 강도	58

List of Tables

Table 1. Sample identification of electrospun nanofiber mats...	18
Table 2. Sample identification of tubular type electrospun nanofiber scaffolds.....	22
Table 3. Average fiber size of SFSP, SF, SF/PCL blend, and PCL nanofiber mats.....	33
Table 4. Contact angle of SFSP, SF, SF/PCL blend, and PCL nanofiber mats.....	41

List of Figures

Figure 1. Schematic structure of a medium-sized blood vessel.	7
Figure 2. Scheme of ideal micro-vascular prostheses.....	10
Figure 3. Scheme for measuring the circumferential tensile strength.	25
Figure 4. FE-SEM images of (a)SFSP, (b)SF, (c)SFPCL31, (d)SFPCL22, (e)SFPCL13, and (f)PCL nanofiber mats($\times 50.00K$, scale bar: 500nm)	32
Figure 5. FT-IR spectrum of Spirulina extract.....	35
Figure 6. FT-IR spectra of SFSP, SF, SF/PCL blend, and PCL nanofiber mats.....	36
Figure 7. DSC thermograms of SFSP, SF, SF/PCL blend, and PCL nanofiber mats.....	38
Figure 8. Typical S-S curve of SFSP, SF, SF/PCL blend, and PCL nanofiber mats under a dry condition of sample	45
Figure 9. Mechanical properties of SFSP, SF, SF/PCL blend, and PCL nanofiber mats at dry condition of sample; (a) Ultimate tensile strength, (b) Elongation at break, and (c) Young's modulus	46
Figure 10. Mechanical properties of SFSP, SF, SF/PCL blend, and PCL nanofiber mats at wet condition of sample; (a) Ultimate tensile strength, (b) Elongation at break, and (c) Young's modulus	47
Figure 11. Typical S-S curve of SFSP, SF, SF/PCL blend, and PCL nanofiber mats under a wet condition of sample.....	48
Figure 12. Optical(a, d, g), fluorescence(b, e, h), and merged(c, f, i) images of cross-section of tubular type nanofiber scaffold($\times 50$,	

scale bar: 500 μ m)	51
Figure 13. FE-SEM images of cross-section of tubular type nanofiber scaffolds (a) Double, (b) Triple31, (c) Triple22, and (d) Triple13(\times 100, scale bar: 200 μ m)	52
Figure 14. Typical S-S curve of tubular type nanofiber scaffold in a longitudinal direction of sample.....	56
Figure 15. Mechanical properties of tubular type nanofiber scaffold in a longitudinal direction of sample (a) Ultimate tensile strength, (b) Elongation at break, and (c) Young's modulus(* significantly different at $p < 0.05$, $n = 5$)	57
Figure 16. Typical S-S curve of tubular type nanofiber scaffold in a circumferential direction of sample	60
Figure 17. Mechanical properties of tubular type nanofiber scaffold in a circumferential direction of sample (a) Ultimate tensile strength, (b) Elongation at break, and (c) Young's modulus(* significantly different at $p < 0.05$, $n = 5$)	61
Figure 18. Estimated burst pressure strength of tubular type nanofiber scaffold in comparison to that of native blood vessels(*significantly different at $p < 0.05$, $n = 5$)	62
Figure 19. Suture retention strength of tubular type nanofiber scaffold in comparison to that of native blood vessels(*significantly different at $p < 0.05$, $n = 5$).....	64
Figure 20. TNF- α assay of SFSP, SF, SF/PCL blend, and PCL nanofibers.....	66
Figure 21. MTT assay of HUVEC cells on SF, SFSP, and PCL nanofiber scaffolds after 1, 3, 5 days cell culture (* significantly	

different at $p < 0.05$, $n = 6$).....	69
Figure 22. MTT assay of fibroblast cells on SF, SFSP, and PCL nanofiber scaffolds (after 1, 3, 5 days cell culture (* significantly different at $p < 0.05$, $n = 6$).....	70
Figure 23. FE-SEM images of HUVEC cells on SF(a, d, g), SFSP(b, e, h), and PCL(c, f, i) nanofiber scaffold for 1(a-c), 3(d-f), and 5(g-i) days after cell seeding ($\times 2000$, scale bar: $10 \mu\text{m}$)	73
Figure 24. FE-SEM images of fibroblast cells on SF(a, d, g), SFSP(b, e, h), and PCL(c, f, i) nanofibers for 1(a-c), 3(d-f), and 5(g-i) days after cell seeding ($\times 2000$, scale bar: $10 \mu\text{m}$)	74
Figure 25. RT-PCR results for expression of vWF and CD31 in HUVEC cells after 6 days cultured on SF and SFSP nanofiber scaffolds (fibroblast was used as negative control to expression of HUVECs)	76

제 1 장 서 론

최근 심혈관 질환(cardiovascular disease)은 선진국에서의 주된 사망 원인 중 하나이며 손상된 혈관을 다른 재료로 대체하는 방법으로 치료가 진행되어 왔다. 현재 Goretex®나 Dacron® 등 합성 고분자 기반의 혈관 이식편은 대구경($\Phi_{in}>6mm$)에 적용되고 있으나 소구경 혈관 이식편으로는 적합하지 못하다. 그래서 소구경 혈관 이식편에 대한 표준은 여전히 자가 이식편, 동종 이식편으로 국한되어 있으나 이 또한 적절한 혈관 탐색의 어려움 및 면역 반응 등의 한계가 존재하여 다른 혈관 이식편의 개발에 대한 요구가 지속되고 있다.[1, 2]

이상적인 혈관 이식편의 조건은 형태학적, 역학적, 생물학적 측면으로 나누어 설명할 수 있다. 먼저 형태학적 측면에서는 생체 혈관의 구조와 유사성을 가져야 한다. 생체 혈관은 크게 3개의 층으로 이루어져 있으며 각 층의 성능이 다른데 이러한 다양한 성능을 만족시키기 위해 인공혈관 이식편을 다층 구조로 제작하면 보다 이상적인 혈관 이식편이 될 수 있다. 또한 역학적 측면에서도 생체 혈관보다 우수하거나 유사하여야 한다. 그러나 높은 역학적 성질을 갖는 재료를 이용하여 혈관 이식편을 제작하는 경우에 그 차이가 너무 크게 되면 역학적 성질 불일치로 인해 혈관 이식편을 삽입하였을 때 과열이 생길 수 있다. 한편 생물학적 측면은 크게 혈액적합성과 세포적합성으로 나눌 수 있는데 혈액적합성의 경우에는 혈관 이식편 내부로 혈액이 통과함에 있어 혈전이 형성되지 않도록 해야 한다. 특히 소구경 혈관 이식편에서는 혈전 형성이 혈관의 폐색으로 곧장 이어질 수 있기 때문에 중요하다고 할 수 있다. 세포적합성에 있어서는 혈관 이식편 내부에 있어 혈관내피세포의 빠른 내피화 (endothelialization)가 이루어져야 하고 이를 통해 혈관

이식편이 더 안정적으로 혈액을 통과시킴으로써 개존율(patency rate)를 증가시킬 수 있다.[3-6]

이러한 이상적인 혈관 이식편의 연구는 조직공학에 있어서 큰 관심 분야로서 대두되어 왔다. 조직공학이란 자가 회복이 어려운 손상된 조직에 대체물을 삽입함으로써 해당 조직을 치료하고 재생하는 재료, 세포, 성장인자 등을 복합적으로 연구하는 분야이다. 이에 혈관 조직공학에서는 천연 혹은 합성 고분자 기반의 지지체에 적절한 배양 조건으로 세포를 배양함으로써 기능성의 소구경 혈관형 지지체를 제조하는 시도를 하고 있다.[7]

최근에 전기방사 기술이 조직공학 분야에서 가장 많은 주목을 받고 있다. 전기방사 기술이란 고분자 용액을 이용하여 정전기적 인력을 통해 마이크로 혹은 나노 단위의 섬유를 제조하는 기술이다. 이렇게 제조된 섬유 형태의 구조는 체내 세포외기질(extracellular matrix, ECM)과 유사한 환경을 만들어 줌으로써 생체 모방을 할 수 있기 때문에 전기방사 방법은 매력적인 기술이라고 할 수 있다.

전기방사를 통한 소구경의 인공혈관용 나노섬유 지지체에 대한 연구는 천연 고분자와 합성 고분자 재료를 기반으로 하여 항혈전 물질 등의 여러 생리 활성 인자를 도입해 제작하는 방향으로 진행되고 있다. 콜라겐, 엘라스틴, 실크 등의 천연 고분자는 높은 생체적합성으로 인해 혈관 조직공학분야에 유망한 물질로 거론되지만 이를 단독으로 이용하기에는 역학적 성질이 생체 혈관과 비교하여 떨어지고 한계가 있다.[1, 8] Sang 등은 콜라겐과 생분해성 합성 고분자인 Poly(ϵ -caprolactone)(PCL)을 블렌드하여 혈관 이식편을 제작함으로써 역학적 성질에서 향상된 성능을 나타내는 것을 보였다.[7] 하지만 단층 형태로 제작하였기 때문에 실제 다층구조인 혈관이 수행하는 다양한 기능을 소화하기는 어렵다는 한계가 있으므로 이에 다층 형태의 나노섬유

지지체를 제작하는 연구가 진행되고 있다. Vaz 등은 PCL과 PLA를 이용하여 다층 형태를 구성함으로써 각 재료가 갖는 장점을 극대화한 지지체를 제작했다.[9] 그리고 Chen 등은 헤파린을 함유한 내부층과 그렇지 않은 외부층으로 구성된 다층 형태의 나노섬유 지지체를 제조함으로써 내부에 항혈전성을 부여한 연구를 수행하였다. [5] 다층 형태로 제작함으로써 발생하는 문제점은 각 층의 재료 구성이 다를 때 층간 박리 현상이 발생한다는 것이다. 동일한 화학구조를 갖는 생분해성 지방족 폴리에스터 PCL과 PLA를 이용하여 제조한 이층구조 지지체의 형태학적 구조를 살펴보았을 때 박리가 발생하는 것을 보고하였다.[9]

본 연구에서는 천연 고분자와 합성 고분자, 항혈전 물질을 이용하여 소구경의 3층구조 나노섬유 지지체를 제작하고 그 성능을 평가하였다. 천연 고분자로는 최근 조직공학용 지지체로 많은 연구가 수행 중인 실크 피브로인(silk fibroin, SF)을, 합성 고분자로는 높은 강도와 신도를 갖는 탄성의 폴리카프로락톤(poly(ϵ -caprolactone), PCL)을 이용하였다. 항혈전 물질로는 미세조류인 스피루리나(Spirulina)를 선택하여 지지체의 항응고성을 부여하였다.[10-12] 3층구조 지지체의 내부층은 미세조류 함유 SF 나노섬유, 중간층은 SF와 PCL의 구성비를 달리한 블렌드 나노섬유, 외부층은 PCL 나노섬유의 세 층으로 구성하였다. 서로 다른 재료로 각 층을 구성함에 따라 발생하는 박리 문제를 최소화하기 위해 두 층의 중간적인 물성을 갖는 SF/PCL 블렌드 나노섬유를 중간층으로 도입하였다. 혈관 이식편을 제작함에 앞서 이를 구성하는 각 층을 나노섬유 형태로 제작하여 형태학적 구조, 친수성, 화학 구조, 열적 특성 및 역학적 성질을 평가하였고 SF/PCL 블렌드 나노섬유가 중간층에 도입되는 것에 대한 타당성을 확립하였다. 제작한 혈관 형태 지지체 단면의 형태학적 구조를 전자현미경을 통해

살펴봄으로써 3층구조의 층간 혼화성을 확인하였고, 생체 혈관과 유사한 역학적 성질을 나타내는지를 길이 및 폭 방향의 인장시험과 터짐 압력 강도를 통하여 알아보았다. 다양한 역학적 성질과 더불어 세포 독성, 세포 증식능(섬유아세포와 혈관내피세포), 유전자 발현 실험을 수행하여 세포적합성을 평가함으로써 SF/PCL 3층구조 혈관형 나노섬유 지지체의 혈관 조직공학 분야로의 응용 가능성을 살펴보았다.

제 2 장 문헌 연구

2.1 생체 혈관의 구조

혈관은 생체 내에 존재하는 심장에서 시작하여 심장에서 끝나는 폐쇄순반계이며 이 혈관을 통해서 혈액이 순환하고 이를 통해 체내 각종 장기 및 조직 곳곳에서 영양분, 노폐물 및 기체 교환을 하게 된다. 혈관은 크게 동맥, 모세혈관, 정맥으로 나누어 지는데 동맥은 산소와 영양분을 함유한 동맥혈을 온몸으로 운반하는 역할을 하며 모세혈관은 조직과의 물질교환을 통해 이산화탄소와 노폐물을 흡수한다. 이 혈액은 정맥을 경유하여 심장으로 돌아오게 된다.[13, 14]

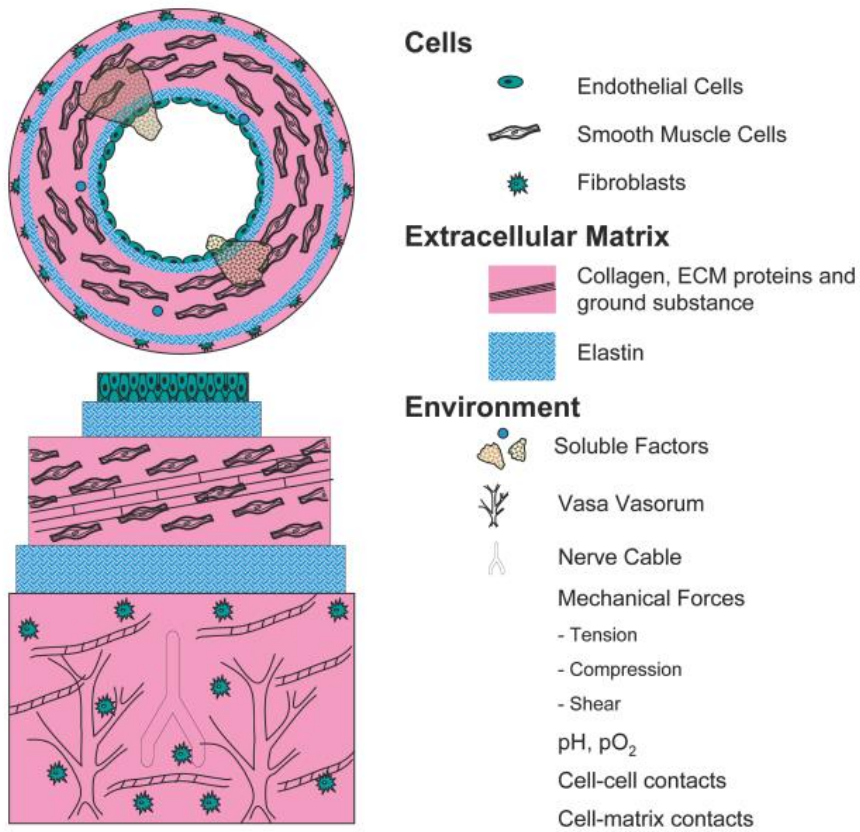
모세혈관을 제외한 모든 혈관의 벽은 Figure 1에서 볼 수 있는 것처럼 동심원 형태의 세 층으로 크게 구성되어 있다. 먼저 루멘(lumen)을 둘러싸는 가장 안쪽의 층을 내막(tunica intima)라고 하는데 혈관내피세포로 구성된 단일 층으로 되어있으며 이 내피세포들은 서로 뺨뺨하게 분포되어 있어 혈관 내강에 대한 항혈전성 장벽을 형성한다. 또한 매끄러운 표면을 형성함으로써 혈액이 흐를 때 발생하는 소용돌이 혈류 흐름에 의한 마찰을 감소시키는 역할도 수행하고 있다.

중막(tunica media)은 환상으로 배열된 평활근 조직층과 탄력섬유 조직층으로 구성되어 있다. 평활근의 작용은 자율 신경계의 혈관운동 신경섬유에 의해 조절되며 혈관의 수축 및 이완을 통해 직경을 변화시킨다. 혈관 내강 직径의 작은 변화에도 혈류와 그에 따른 혈압은 큰 영향을 받기 때문에 중막의 작용은 혈액 순환 역학에 있어서 중요하다고 볼 수 있다.

그리고 외막(tunica adventitia)은 혈관의 가장 외부를 구성하는 층으로 험거운 콜라겐 기질에 섬유아세포가 분포되어 있는 형태로

존재한다. 이 층은 다양한 역할을 수행하는데 동맥 벽에 대해서는 혈관 공급에 대한 기질로 작용하고 주변 조직에 대해 혈관을 고정시키는 역할을 수행한다. 또한 구조적으로 혈관을 지지하는 기능 또한 수행하여 신체의 움직임으로 인한 혈관 파열을 방지한다.

부수적으로 내막과 중막 사이에는 내탄성판(internal elastic lamina)이라고 부르는 콜라겐과 라미닌, 엘라스틴으로 구성된 기저막이 존재하고, 중막과 외막 사이에는 외탄성판(external elastic lamina)이라고 불리는 층이 존재하여 막들 사이를 분리 및 구별시키는 층으로서 존재한다. [13-16]



[16]

Figure 1. Schematic structure of a medium-sized blood vessel

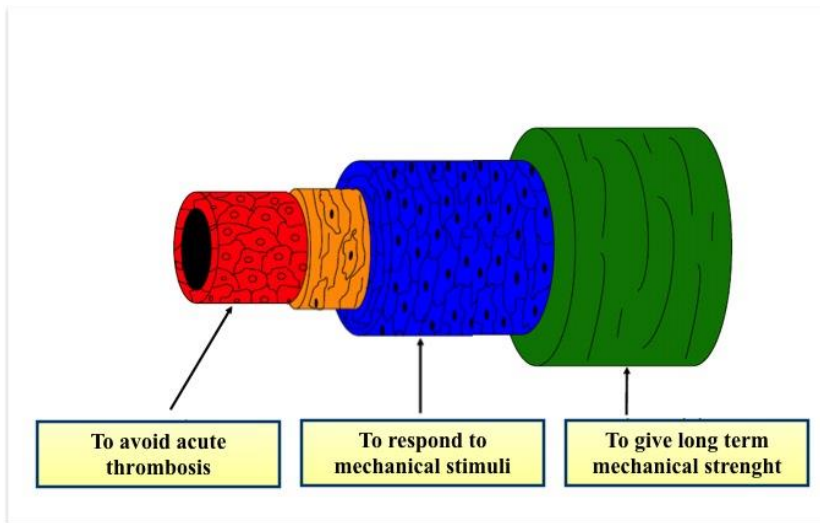
2.2 혈관 대체 인공 이식편

매년 세계적으로 1천 7백만여 명이 혈관 관련 질병으로 인해 사망한다고 보고되고 있다. 특히 심혈관 질병은 서양인들의 질병 및 사망의 주된 원인이며 특히 유럽에서는 매년 430만 명이 이러한 질병으로 사망하고 미국의 경우에는 약 1400만 명의 환자가 동맥 보철물을 필요로 한다. 심혈관 질병의 주된 원인으로는 죽상동맥경화증(atherosclerosis)으로 혈관 내부에 지방반(fatty plaque)이 침전되거나 평활근세포의 과도한 증식으로 인해 혈관 내부 공간이 좁아지고 혈류의 흐름을 방해함으로써 나타나는 증상이다. [17-21]

질병이 있는 혈관을 대체하기 위해 현재 표준 방법으로 복재 정맥(saphenous veins)과 유동맥(mammary arteries)으로 된 자가이식편(autograft) 혹은 동종이식편(allograft)을 이용하거나 인공 이식편(artificial graft)를 이용하여 스텐트 혈관확장술(stent angioplasty)과 관상동맥 우회술(coronary bypass surgery)를 시행하고 있다. 하지만 자가이식편의 경우에는 적합한 혈관을 확보하는 것에 대한 어려움과 및 이식 시 여러 질병이 발생할 우려가 있고, 동종이식편 역시 거부반응, 내피세포 붕괴 및 혈관 반응성의 상실 등의 문제가 발생한다. 인공 이식편의 경우에는 현재 천연 및 합성 재료로 개발이 진행되고 있는데 그 중 가장 빈번히 사용되는 형태가 합성 고분자 기반의 이식편으로, Dacron, polyurethane 또는 extended polytetrafluoroethane(ePTFE)을 재료로 하여 구성된 것이다. 하지만 이러한 합성 고분자 기반 이식편은 내부 직경이 6mm이하가 되면 혈전증(thrombosis) 및 연결 내막 과다 형성증(anastomotic intimal hyperplasia)이 발생할 수 있으며 대부분의 이식편은 생체혈관과의 역학적 성질의 불일치 및 이식편에서의 내피세포의 낮은 재증식(re-

endothelialization)성 등의 한계가 존재한다.[7, 19, 22]

이상적인 인공 이식편은 역학적, 생물학적 측면에서 다음과 같은 조건을 만족시켜야 한다. 먼저 적절한 역학적 성질을 갖고 있어야 한다. 혈관은 계속적으로 원주방향 및 길이방향으로 응력을 받으며 특히 원주방향으로는 심장 박동으로 인한 혈압이 발생하는데 이를 견딜 수 있는 강도 및 신도를 지녀야 하며 인공 이식편과 생체 혈관 사이에 역학적 성질이 비슷함으로써 주변 생체 혈관과의 역학적 성질 불일치로 인한 균열 생성을 방지해야 한다. 만약 그렇지 않다면 이는 결국 이식 실패로 이어지게 되고 환자에 삽입했을 때는 치명적일 수 있다. 생물학적 측면에서 보면 인공 이식편은 생체 내에 이식하는 것이 궁극적인 목표이므로 생체적합성과 생분해성을 지니고 있어야 한다. 혈관내피세포로 인한 내피화에 대해 최적 조건을 가지고 있어야 하며 이식편에 혈관 세포가 부착 및 침투하여 증식하기 때문에 일정 시간이 지나면 완전히 분해됨으로써 생체 조직으로 대체될 수 있어야 한다. 또한 이식편의 표면의 항혈전성도 중요한 요소이다. 특히 혈관내피세포가 증식하기 전까지는 항혈전성을 유지하여 이식편 내부에의 이물질 침전 등이 방지될 수 있어야 한다. 한편 인공 이식편의 외부층은 결합 조직과 상호작용해야 하기 때문에 섬유아세포와 잘 호응할 수 있어야 한다.[4-7, 22-26]



[27]

Figure 2. Scheme of ideal micro-vascular prostheses

2.3 나노섬유 조직공학용 지지체

조직공학은 질병에 걸린 조직을 재생하거나 치료하기 위한 효율적인 전략을 개발하기 위해 재료공학, 생명공학 등의 다양한 학문적 지식이 결합된 분야이며 조직공학을 통해 개발한 스캐폴드를 통해 손상된 조직에 기능성이 부여된 대체물을 제공할 수 있다. 스캐폴드와 세포, 성장 인자를 결합함으로써 조직공학은 조직 손상을 회복하는 것에 대한 대안을 제시한다. 조직공학이 갖는 장점으로는 이식하는 지지체를 사용함으로써 수술 절차를 감소시키며 이식된 지지체가 주변 조직과 결합되어 매끄럽게 융화될 수 있다는 것인데 이러한 장점들은 보다 생체 모방에 가까운 스캐폴드의 개발에 기여할 수 있다.[28] 조직공학에 이용되는 고분자는 poly(glycolic acid) (PGA), poly(lactic acid) (PLA), poly(glycolic-co-acrylic acid) (PLGA copolymer), PCL 등의 생분해성 합성 고분자와 실크 피브로인, 키토산, 콜라겐 등의 천연 고분자가 있는데 이 재료들을 바탕으로 적합한 기술을 이용해 조직공학용 지지체를 제조하고 바이오메디컬 분야에 적용하는 연구가 진행되고 있다.[29, 30]

지지체 제조 기술 중 전기방사법은 특히 큰 주목을 받는 기술이다. 전기방사 기술을 통해서 고분자 용액으로부터 마이크로 혹은 나노 단위의 섬유를 제작하는데 이는 세포외기질을 모방할 수 있기 때문에 세포 증식 및 분화에 있어 유리하게 작용할 수 있다. 이에 전기방사를 통해 제작한 나노섬유 지지체는 성능이 우수한 소재로 입증되어 신경 도관, 창상 피복재, 뼈 조직 재생뿐만 아니라 인공혈관(vascular graft) 등 다양한 조직공학 분야에 응용가능성이 높다고 보고하고 있다.[31-38] 더욱이 전기방사 기술을 통해서 는 고분자 용액의 농도와 전압, 노즐과 콜렉터 사이의 거리, 방사속도 등 섬유를 제조함에 있어서

관여되는 인자를 변경함으로써 나노섬유의 형태학적 구조(섬유 직경, 공극 크기 등)을 조절할 수 있다는 점에 있어서 해당 조직에 맞춤형하여 제작할 수 있다는 것이 큰 장점으로 작용한다.[39]

2.4 인공혈관용 지지체

조직공학에서의 인공혈관용 지지체에 대한 연구는 혈관 분야에서 자가이식편 또는 동종이식편의 부족 및 한계에 대한 대안으로 대두되고 있으며 무엇보다 앞에 제시된 인공혈관 이식편의 경우 소구경에서의 적용이 어려운 문제에 직면함에 있고 그 대체 방안으로 조직공학 분야에서의 연구가 활발히 진행되고 있어 현재까지 다양한 형태를 갖는 혈관형 지지체에 대한 연구가 문헌들을 통해 보고되고 있다.

단순히 와이어(wire) 형태의 니들을 고분자 용액에 담금하여 지지체를 얻는 연구가 수행되었다. Lovett 등은 실크/polyethylene oxide(PEO) 고분자 블렌드 용액에 일정 시간 담침하여 니들에 골고루 흡착시킨 후 건조하여 제작한 지지체의 경우 공극을 형성해주는 PEO의 함량에 따라 강도와 단백질 투과성에 있어서 영향을 받는다는 것을 관찰하였다.[40]

이미 짜여진 직물을 도입하여 보다 높은 강도를 갖는 지지체를 고안한 연구들 또한 보고되었는데 Yang 등은 혈관 형태의 편직물(knitted fabric)에 폴리우레탄을 입혀서 혈관 형태의 지지체를 제작하였고 그 결과 폴리우레탄으로만 구성된 지지체보다 5~10배 높은 강도를 나타내는 결과를 보였으며[41], Nakazawa 등은 실크 단백질의 실크 직물을 이용하여 혈관 형태로 제작한 후 실크 수용액으로 코팅하여 지지체를 제작하였고 실크 재료가 갖는 생체적합성으로 인하여 생체 내에서 높은 생존율을 보였다는 결과를 보고하였다.[42]

주사기에 고분자 용액을 담아 이를 압출하여 지지체를 디자인한 경우도 있다. 여기서 용액이 나오는 니들은 중심이 막힌 동심원으로 된 형태를 선택하여 결과적으로 중공형의 섬유가 제작되도록 하였다. Lai 등은 이방성의 콜라겐 섬유로 구성된 지지체를 위의 방법으로

제조하였고 길이방향으로 잘 정렬된 콜라겐 섬유를 따라 섬유아세포가 배열되어 증식함을 확인하였다.[43] Diban 등은 PLGA/PCL을 재료로 하여 중공 섬유를 제작하였으며 블렌드 비율에 따라 형태학적 구조와 상용성에 영향을 미친다는 것을 확인하였는데 특히 PLGA/PCL이 85:15로 블렌드된 중공 섬유가 세포 증식, 공극 구조 등에서 적절한 조건을 지닌다고 보고하였다.[44] 또한 3D 프린팅을 이용하여 생체 혈관의 모형을 제작한 후 고분자를 코팅하고 모형을 녹여내어 지지체를 제작한 연구[45]와 시트 형태로 콜라겐 겔을 제작하여 원통 형태로 돌돌 말아서 지지체를 제작한 연구[8] 또한 진행되었다.

최근 나노 기술을 이용하여 제조한 나노섬유 지지체를 인공혈관으로 이용하려고 연구가 많이 진행되고 있으며 특히 전기방사를 이용하여 나노섬유 혈관형 지지체를 단층(mono-layer) 혹은 다층(multi-layer)구조로 제조하여 구조 특성과 성능을 평가하는 연구가 진행되고 있다. 단층으로 구성된 지지체의 경우는 단일 재료를 이용하는 방법[1], 두 가지 이상의 재료를 이용하되 동시에 전기방사하는 방법(co-electrospinning)[46], 두 재료를 블렌딩하여 제조하는 방법[7, 47, 48]을 보고하고 있다.

그러나 생체 혈관이 다층의 형태로 구성되어 있으며 각 층에 요구되는 특성이 다르다. 적절한 역학적 성질과 동시에 생분해성도 가지는 한편 이식편 내부는 내피세포가 자라기에 적합한 표면을 가져야 하는데 이러한 단층의 지지체는 실제 적용되는 데 있어 한계점이 있다.[49] 이에 혈관을 구성하는데 형태학적, 역학적인 측면에서 모방하여 다층 형태로 구성한 지지체는 혈관 이식편의 성공률을 증진시킬 수 있다. 또한 재료적인 측면에 있어서도 역학적 강도가 높은 합성 고분자와 생체적합성이 높은 천연 및 생체고분자 및 성장인자 등의 생리활성 물질을 복합하여 이용함으로써 혈관과의 유사성을 높일 수 있다.[50]

한 연구에서는 생체 동맥의 특성과 유사한 다층 구조를 갖는 매끈한 형태의 소구경 나노섬유 지지체를 제조하였다. 재료는 엘라스틴, 콜라겐, 실크 등의 천연 및 생체 고분자와 폴리카프로락톤을 이용하여 각 재료를 일정 비율로 블렌딩함으로써 각 층을 형성하였고 역학적 성질을 평가함으로써 생체 동맥과 유사한 조건을 찾는 시도를 하였다.[51] 한편 생체적합성이 높은 천연 고분자만으로 지지체를 제작하기에는 역학적 강도가 높지 않기 때문에 적합하지 않으므로 합성 고분자를 복합화하여 다층 형태의 지지체를 제작함으로써 강도적 측면과 생물학적 측면을 모두 만족시키는 결과를 보고한 바 있다.[50]

제 3 장 재료 및 방법

3.1 재료

3.1.1 미세조류 스피루리나의 수용액 추출

지지체의 항응고성을 부여하기 위해 미세조류의 일종인 *Spirulina maxima*를 이용하였고 (주)네이처스훼밀리코리아에서 구입하여 사용하였다. 정제(tablet)형태의 스피루리나는 분쇄기(IKA grinder A10, IKA, Germany)를 이용해서 분말 형태로 제작한 뒤 기존 연구[52]를 참고하여 처리하였다. 분쇄한 스피루리나 파우더를 1L 증류수에 첨가하여 24시간, 4℃에서 교반한 후 5000rpm, 4℃조건으로 10분간 원심 분리하여 상등액만을 추출하였고 동결 건조해서 파우더 형태의 스피루리나 수용액 추출물(*Spirulina water extract*, SP)을 제조하였다.

3.1.2 재생 실크 피브로인의 제조

건조 누에고치의 정련과정은 먼저 누에고치를 0.3% sodium oleate와 0.2% sodium carbonate 수용액에서 100℃ 조건으로 약 1시간 가열하여 세리신을 제거하였고 사용한 염은 정련한 누에고치로부터 완전히 제거하기 위해 증류수를 이용해 4~5번 수세한 뒤 오븐에서 건조하여 실크 피브로인(SF)을 얻었다.

건조된 SF는 CaCl₂/H₂O/EtOH의 1:8:2 몰비를 갖는 수용액에 85℃ 조건에서 3분 동안 용해하였다. 용해한 수용액으로부터 염을 제거하기 위하여 이를 셀룰로오스 투석막(MWCO 12,000~ 14,000Da)을 이용해 3일간 투석시켜서 실크 수용액을 얻었고 이 용액을 동결 건조시켜 스펀지 형태의 재생 SF를 제작하였다.

3.2 나노섬유 매트 제조 및 분석

3.2.1 제조 방법

내부층, 중간층 및 외부층으로 구성된 3층구조의 혈관형 나노섬유 지지체의 층별 구조 특성을 분석하기 위해 먼저 각 층을 구성하고 있는 SF, PCL 및 SF/PCL 블렌드 나노섬유 매트를 각각 전기방사를 통해 제조하였다.

SF는 앞에서 제조한 스펀지 형태의 재생 SF를 사용하였으며 PCL은 sigma-aldrich Korea에서 구입한 분자량 M_w 70,000–90,000의 제품을 사용하였다. 또한 방사용액에 사용한 용매는 공통적으로 98% 포름산(Kanto chemical)을 이용하였다.

먼저 내부층을 구성하고 있는 SF 나노섬유는 SF 농도 13%(w/v)에 SP 1%(w/v)를 첨가한 방사용액을 전기방사하여 얻었다. 그리고 외부층의 PCL 나노섬유는 농도 13%(w/v)를 포름산에 용해한 방사용액을 사용하였으며 중간층은 다양한 SF/PCL 혼합비율(SF:PCL=3:1, 2:2, 1:3)을 가진 방사용액을 제조하여 전기방사를 수행하였다.

전기방사는 방사용액을 10ml 주사기에 넣은 후 방사속도 0.3ml/h, 전압 12–14kV, 방사거리 20–25cm 방사조건 하에서 진행하였다. 나노섬유가 집적되는 콜렉터는 90mm 직경의 원통형 드럼을 사용하여 200rpm 속도로 회전시켜 전기방사를 수행하였고 일정한 온습도(온도 25℃, 습도 40%) 하에서 실험을 진행하였다. 제조한 2차원 나노섬유 매트의 시료 명칭 및 조성을 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Sample identification of electrospun nanofiber mats

Sample ID	Composition
SFSP	Silk Fibroin 13%(w/v) + Spirulina extract 1%(w/v)
SF	Silk Fibroin 13%(w/v)
SFPCL31	Silk Fibroin / PCL (weight ratio 3:1) 13%(w/v, total concentration)
SFPCL22	Silk Fibroin / PCL (weight ratio 2:2) 13%(w/v, total concentration)
SFPCL13	Silk Fibroin / PCL (weight ratio 1:3) 13%(w/v, total concentration)
PCL	PCL 13%(w/v)

3.2.2 물성 분석

제조한 나노섬유의 형태학적 구조를 확인하기 위해 FE-SEM(Supra 55VP, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 비드의 존재 여부 및 섬유의 직경을 살펴보았으며 이에 앞서 제조한 시료들을 백금으로 코팅한 뒤 실험을 진행하였다.

FT-IR spectrometer(ATR FT-IR, Nicolet iS5, Thermo Scientific, USA)을 이용하여 각 나노섬유 매트를 구성하는 재료에 대한 화학적 구조를 살펴보았다. 일정한 두께(약 $80\mu\text{m}$)를 갖는 시료를 준비하여 실험을 진행하였으며 스캔 횟수는 32회로 설정하여 실험에 적용하였다.

또한 각 시료 당 5mg씩 준비한 후 질소가스 조건 하에서 상온~ 350°C 까지 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 승온속도로 DSC(DSC-Q1000, TA Instrument, UK)를 이용하여 열 분석을 행하였다.

그리고 접촉각 측정장치(Easy drop-Rahmen, Kruss, Germany)를 이용하여 각 나노섬유 매트의 표면 친수성을 평가하였다. 모든 시료는 $15\text{mm} \times 15\text{mm}$ 로 제작하였으며 각 시료당 5번 측정하여 그 평균값을 통해 분석하였다.

3.2.3 역학적 성질 측정

시료의 역학적 성질을 측정하기 위하여 만능재료 시험기(GS/LRX plus, Lloyd Instruments, UK)를 이용하여 인장강도와 변형률, 영률을 측정하였다. 건조 상태 및 습윤 상태에서 측정하였으며, 시료는 $80\sim 100\mu\text{m}$ 의 두께와 $10\text{mm} \times 40\text{mm}$ 의 크기를 갖도록 제작하였고 실험 조건으로는 게이지 길이(gauge length) 20mm, 인장 속도 $10\text{mm}/\text{min}$ 으로 조건을 설정하였다. 실험은 각 시료 당 5번 이상 수행하였으며 습윤 상태에서의 인장강도 실험은 실험 전 모든 시료를

증류수에 충분히 침윤시킨 뒤 사용하였다.

3.3 3층구조 혈관형 나노섬유 지지체의 제조 및 분석

3.3.1 제조 방법

내부, 외부 및 중간층 세 층으로 이루어진 3층구조 혈관형 지지체의 제조는 순차적 전기방사(sequential electrospinning) 방법을 이용하였다. 먼저 SP 1%(w/v)를 함유하는 SF 13%(w/v) 방사용액을 사용하여 전기방사한 뒤(내부층 형성), 다양한 SF/PCL 블렌드(SF:PCL=3:1, 2:2, 1:3) 방사용액을 전기방사하여 중간층을 형성하고 마지막으로 PCL 13%(w/v) 방사용액을 사용하여 외부층을 형성하는 3단계로 연속적으로 진행하였다. 각 층의 두께는 $70\mu\text{m}$ 내외로 조절하였으며 전체 3개 층의 두께는 $200\mu\text{m}$ 정도로 일정하게 조절하였다. 혈관형 지지체를 제조하기 위하여 1.5mm의 직경을 갖는 와이어를 콜렉터로 사용하여 일정한 속도로 회전시켰으며 모든 전기방사 조건을 앞에서 언급한 나노섬유 매트 형태의 제조 조건과 동일하게 하여 전기방사를 수행하였다. 전기방사가 완료된 지지체는 약 20mm의 길이로 잘라서 콜렉터에서 분리하였고 증류수를 이용해 여러 차례 수세한 후 상온에서 건조하였다.

중간층의 경우 SF/PCL 조성비에 따른 3층구조 지지체의 구조 특성과 역학적 성질을 고찰하기 위하여 SF/PCL 혼합비율(3:1, 2:2, 1:3)이 서로 다른 시료를 제작하였으며 또한 대조군으로 중간층 없이 내부층과 외부층으로만 구성된 이층구조 지지체, 그리고 단일층(SF 또는 PCL)으로 구성된 지지체를 제조하여 비교 및 검토하였다. 혈관형 나노섬유 지지체 시료 명칭과 구성은 Table 2에 나타난 바와 같다.

Table 2. Sample identification of tubular type electrospun nanofiber scaffolds

Sample ID	No. of layers	Composition		
		Inner layer	Middle layer	Outer layer
Triple31	3	SF 13%(w/v) + SP 1%(w/v)	SF/PCL(weight ratio 3:1) 13%(w/v, total concentration)	PCL 13%(w/v)
Triple22	3	SF 13%(w/v) + SP 1%(w/v)	SF/PCL(weight ratio 2:2) 13%(w/v, total concentration)	PCL 13%(w/v)
Triple13	3	SF 13%(w/v) + SP 1%(w/v)	SF/PCL(weight ratio 1:3) 13%(w/v, total concentration)	PCL 13%(w/v)
Double	2	SF 13%(w/v) + SP 1%(w/v)	-	PCL 13%(w/v)
SFSP*	1	SF 13%(w/v) + SP 1%(w/v)		
PCL*	1	PCL 13%(w/v)		

Triple: tri-layer scaffold,
 Double: bi-layer scaffold,
 SFSP*: mono-layer scaffold of SFSP,
 PCL*: mono-layer scaffold of PCL

3.3.2 형태학적 구조 관찰

지지체를 구성하고 있는 3층구조 형태와 층간 박리 정도를 확인하기 위하여 FE-SEM을 이용하여 제조한 각 지지체의 단면을 살펴보았으며 이 때 시료는 일정한 간격으로 잘라서 실험에 사용하였고 백금으로 코팅한 후 관찰하였다.

또한 제조된 지지체에서 SP가 지지체 내부층에 함유된 상태로 잘 유지되고 있는지와 층간 경계를 확인하기 위해 형광현미경(BX51, Olympus, Japan)을 이용해 SP가 띠는 형광을 통해 스피루리나 추출물의 존재 여부를 살펴보았다. 노출 시간은 광학현미경의 경우에는 5ms로, 형광현미경의 경우에는 50ms로 설정하여 실험을 진행하였다.

3.3.3 역학적 성질 측정

지지체가 인공혈관으로서 적용되는 데 있어서 적절한 강도를 갖는지를 살펴보기 위하여 길이방향 및 원주방향으로의 인장강도, 터짐 압력 강도, 봉합 유지 강도 등 다양한 역학적 성질을 측정하였다. 지지체를 최종적으로 적용될 곳이 인체 내이기 때문에 모든 역학적 성질 실험은 습윤 상태의 시료를 이용하였고, 만능재료시험기를 이용하여 실험을 진행하였다. 500N의 로드셀(load cell)을 이용하였으며 각 실험은 5번 이상 반복하여 시행하였다.

지지체의 길이방향 인장강도(longitudinal tensile strength)를 측정하였는데 이때 시료는 길이 20mm, 두께 150-200 μ m로 제작하였으며 실험 조건은 인장 속도 10mm/min, 게이지 길이 10mm로 설정하여 측정하였다. 한편 원주방향 인장강도 (circumferential tensile strength)는 이전의 연구[41, 53]에서 보고한 실험 모델 및 방법을 이용하였고 그 실험 모델은 Figure 3에 나타내었다. 시료는 길이

3mm로 제작하였으며 실험 조건은 먼저 시료를 ㄷ자 형태의 클램프(clamp)에 삽입한 후 인장 속도 0.6mm/min, 게이지 길이는 시료의 지름으로 설정하여 진행하였다. 이 때 최대 응력을 원주방향 인장강도(ultimate circumferential tensile strength, UCTS)로 설정하였고 이 값으로부터 지지체의 터짐 압력 강도(burst pressure strength)를 라플라스 법칙에서의 식 (1)을 이용하여 추정하였다.[8, 54]

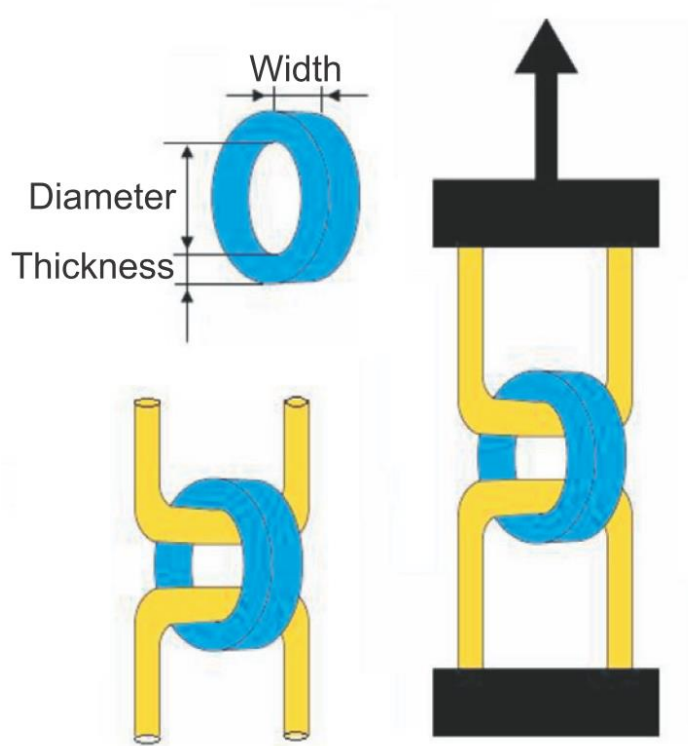
$$\text{Burst pressure (mmHg)} = (\text{UCTS} \times d) / R_0 \dots\dots\dots(1)$$

여기서 d: 지지체의 두께

R₀: 상압에서 지지체의 내부 구경 반지름

UCTS: 원주방향 인장강도

또한 봉합 유지 강도(suture retention strength)는 시료의 한쪽 끝은 아랫 줍쇠로 고정시키고 다른 한쪽 끝은 끝에서 2mm되는 지점에 5-0 prolene 봉합사를 이용해 연결한 후 그 봉합사를 윗 줍쇠로 고정시켜 인장 속도 20mm/min로 실험을 진행하였다.



[41]

Figure 3. Scheme for measuring the circumferential tensile strength

3.3.4 생물학적 시험

지지체가 생체 내에 이식됨에 앞서 충분한 생체적합성을 갖는지를 살펴보기 위해서 세포 독성, 세포 증식, 세포 유전자 발현 등을 지지체의 각 층과 구성이 같은 나노섬유 매트 형태의 시료를 이용하여 살펴보았다.

먼저 세포 증식 실험에 앞서 제작한 지지체에 독성이 있는지를 확인하기 위해 대식세포인 RAW 264.7을 이용하여 염증 반응 실험을 진행하였다. 시료는 5mm × 5mm의 크기로 준비하였으며 이에 세포를 1×10^4 cells/25mm²의 비율로 seeding한 후 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium including 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin) 배지를 이용하여 세포를 배양하였다. 세포를 seeding한 시료는 1일, 2일, 3일 동안 37°C, CO₂ 5% 조건에서 배양한 후 대식세포로부터 분비되는 염증반응을 매개하는 신호분자인 TNF- α 의 양을 Mouse TNF- α Immunoassay용 kit를 이용해 간접적으로 평가하였다.

세포 증식 실험은 MTT assay를 통해서 평가하였다. 세포는 NIH 3T3 mouse fibroblast(섬유아세포)와 Human umbilical vein endothelial cell(HUVEC, 혈관내피세포)을 이용하였고 독성 실험에서와 마찬가지로 시료는 5mm × 5mm으로 준비한 후 이에 세포를 fibroblast의 경우에는 2×10^4 cells/25mm², HUVEC의 경우에는 1×10^4 cells/25mm²의 비율로 seeding하였다. 세포를 배양한 배지로는 fibroblast의 경우에는 RAW 264.7을 배양할 때와 동일한 배지를 사용하였고 HUVEC의 경우는 EGM-2 bullet kit(EBM-2 medium including hEGF, hydrocortisone, GA-1000, FBS, VEGF, hFGF-B, R3-IGF-1, ascorbic acid, and heparin)를 사용하였으며 세포를

seeding한 시료는 1일, 3일, 5일 동안 37℃, CO₂ 5% 조건에서 배양한 후 MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)시약을 이용해 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

또한 1일, 3일, 5일 동안 세포를 배양한 각각의 시료를 2.5% glutaraldehyde 용액(Sigma Aldrich, Korea)을 이용하여 부착된 세포를 고정시킨 후 알코올을 이용한 탈수 과정을 통해 건조하고 이를 백금으로 코팅하여 전자현미경을 통해 부착한 세포의 형태학적 구조를 관찰하였다.

한편 시료 위에서 배양한 HUVEC이 수일이 지난 후에도 세포 자체의 성능을 잘 유지하며 증식하고 있는지 확인하기 위해 PCR(Takara PCR thermal cycler dice, TaKaRa, Japan)을 통해서 세포의 유전자 발현 여부를 확인하였다. 배양한 지 6일 된 세포를 Tri-reagent를 이용하여 떼어낸 후에 세포로부터 mRNA를 추출한 후 AccuPower® RT Premix(Bioneer, Korea)을 이용하여 cDNA를 합성하고 이를 PCR을 통해 프라이머를 이용하여 증폭시켰다.

HUVEC의 유전자 발현 여부를 확인하기 위해 사용한 유전자로는 CD31(PECAM-1(PECAM: platelet endothelial cell adhesion molecule))과 vWF(von Willebrand factor)를 이용하였다. 각 유전자에 대한 프라이머 시퀀스는 CD31의 경우에는 5-TCATCGGAGTGATCATTGC-3(Forward primer)와 5-CTAGAGTATCTGCTTTCCACG-3(Reverse primer)이고 vWF의 경우에는 5-CGCTGCTTCTGCGACACCA-3(Forward primer), 5-GCCAGTGGCTCAGGGTGCTG-3(Reverse primer)이며, housekeeping gene인 GAPDH의 경우에는 5-GCATGGCCTTCCGTCTCCCC-3(Forward primer), 5-

GAGGGCAATGCCAGCCCCAG-3(Reverse primer)의 염기서열을 갖는 것을 이용하였으며 각 유전자의 증폭 산물은 각각 367, 201, 211 base pair를 갖는 것으로 선택하였다. [55, 56]

PCR 증폭 산물은 1% 아가로스 겔에 로딩하여 전기 영동하여 그 발현 여부를 확인하였는데 TA buffer를 사용하였으며 80V의 전압을 40~45분간 가하여 진행하였고 분자량을 측정하기 위한 마커로는 1kb(+) DNA ladder marker(Enzynomics, Korea)를 이용하여 실험을 실시하였다.

3.4 통계적 분석

정량화된 실험 결과들은 (means)±(standard deviation)으로 나타내었으며 Microsoft Excel 2010 프로그램을 이용하여 분산 분석법(anova)으로 그 유의성을 검정하였다. 통계학적 표준 편차는 $p<0.05$ 로 허용 범위를 제한하여 나타내었다.

제 4 장 결과 및 고찰

4.1 나노섬유 매트 구조 특성 및 성질

혈관형 나노섬유 지지체의 각 층을 구성하는 부분을 나노섬유 매트 형태로 제작하여 구조와 성질을 살펴보았다. 이는 지지체를 구성하는 각 층에 대한 특성을 살펴보는 것과 더불어 지지체의 중간층으로 SF/PCL 블렌드 나노섬유가 도입됨으로써 내부층과 외부층의 박리를 감소시켜 주는 중간적인 특성을 갖는지를 다양한 측면에서 살펴보기 위하여 행하였다. 나노섬유 매트를 제조함에 있어서 비드 형성이 없고 균일한 나노섬유 집합체를 얻기 위해 SF, SFSP, PCL 및 SF/PCL 블렌드 나노섬유 매트의 제조 조건(전압 및 거리)을 최적의 상태로 조절하여 수행하였다.

4.1.1 형태학적 구조

SF, PCL, SF/PCL 블렌드 나노섬유의 형태학적 구조를 SEM으로 관찰하여 Figure 4에 나타내었으며 나노섬유의 평균 직경을 계산하여 Table 3에 나타내었다.

전기방사를 이용하여 제조한 나노섬유의 형태학적 구조에 영향을 미치는 인자로는 방사용액의 농도와 전압, 방사속도, 콜렉터와의 거리, 회전형 콜렉터의 회전 속도 등이 있다. 방사용액의 점도가 나노섬유의 직경에 있어 가장 큰 영향을 미치는데 일반적으로 방사용액의 점도가 높을수록 큰 직경의 나노섬유를 얻게 된다. 전기방사 조건에 있어서는 전압이 낮을수록, 방사 속도가 빠를수록 굵은 직경의 나노섬유가 제조되며 적절한 범위 내에서 콜렉터와의 거리가 짧을수록, 콜렉터의 회전 속도가 느릴수록 큰 직경의 나노섬유가 형성된다.

SEM 측정 결과 제조한 나노섬유 집합체의 평균 섬유 직경이 200-400nm 범위를 갖는 것으로 나타났다. 특히 SF/PCL 블렌드를 전기방사하는 경우 섬유 직경의 편차가 크고 섬유 균제성이 다소 떨어지는 형태학적 구조 특징을 보였다. 혈관형 지지체를 구성하고 있는 각 층의 나노섬유를 최적 조건에서 제조하기 위해 전기방사 전압조건 및 방사속도, 거리 등을 조절하였기 때문에 이들 조건에서 제조한 나노섬유 매트와 SF/PCL 블렌드 나노섬유 매트와 나노섬유 직경 등 형태학적 구조 특성을 직접적으로 비교하는 것은 다소 무리가 있지만 각 나노섬유 매트와 나노섬유 직경의 구조 차이를 살펴보았다

SFSP 나노섬유의 경우 SP의 함유량이 증가함에 따라 점도와 전기전도도가 모두 증가한다고 보고하고 있다.[12] 점도가 증가할수록 섬유 직경이 증가하고 전기전도도가 증가할수록 섬유 직경이 감소한다는 것에 기반할 때 서로 상반된 인자가 섬유 직경에 영향을 미친다고 할 수 있다. 기존 연구에 의하면 같은 전압인 경우 SP의 농도가 낮은 경우 전기전도도의 영향이 커서 직경이 감소를 하는 반면 SP의 농도가 커지면 점도의 영향을 더 많이 받아 형태학적 구조가 불균일해지는 한편 평균 직경이 증가한다고 보고하고 있다. 본 논문에서는 SF 나노섬유에 SP를 함유(1%(w/v))함에 따라 섬유 직경이 큰 결과를 보인 것은 농도 및 전기전도도 영향 이외에 전압 조건이 달라(12kV) 발생한 결과라고 생각된다. 보통 전기방사를 이용한 나노섬유 제조시 1kV 차이에 따라 섬유 직경의 차이가 나타나는 것을 감안할 때 전압의 차이에 따라 나노섬유 직경이 영향을 받아 나타난 결과로 해석된다.

한편 PCL 나노섬유를 제조함에 있어서는 14kV의 상대적으로 높은 전압이 가해졌고 산 용매(포름산)를 사용하였으므로 PCL의 분해에 따른 방사용액의 점도 감소도 동반되는 관계로 PCL 나노섬유 평균 직경이 179nm 정도로 작게 나타났다고 볼 수 있다.

SF/PCL 블렌드 나노섬유의 경우에는 섬유 직경의 편차가 너무 커서

두 성분의 함량비에 따른 형태학적 구조 차이를 설명하기 어렵지만 SF와 PCL의 방사용액 내에서의 상용성이 낮아서 나타나는 현상으로 생각된다. PCL 함량이 증가할수록 평균 직경은 증가하는 결과를 보였다.

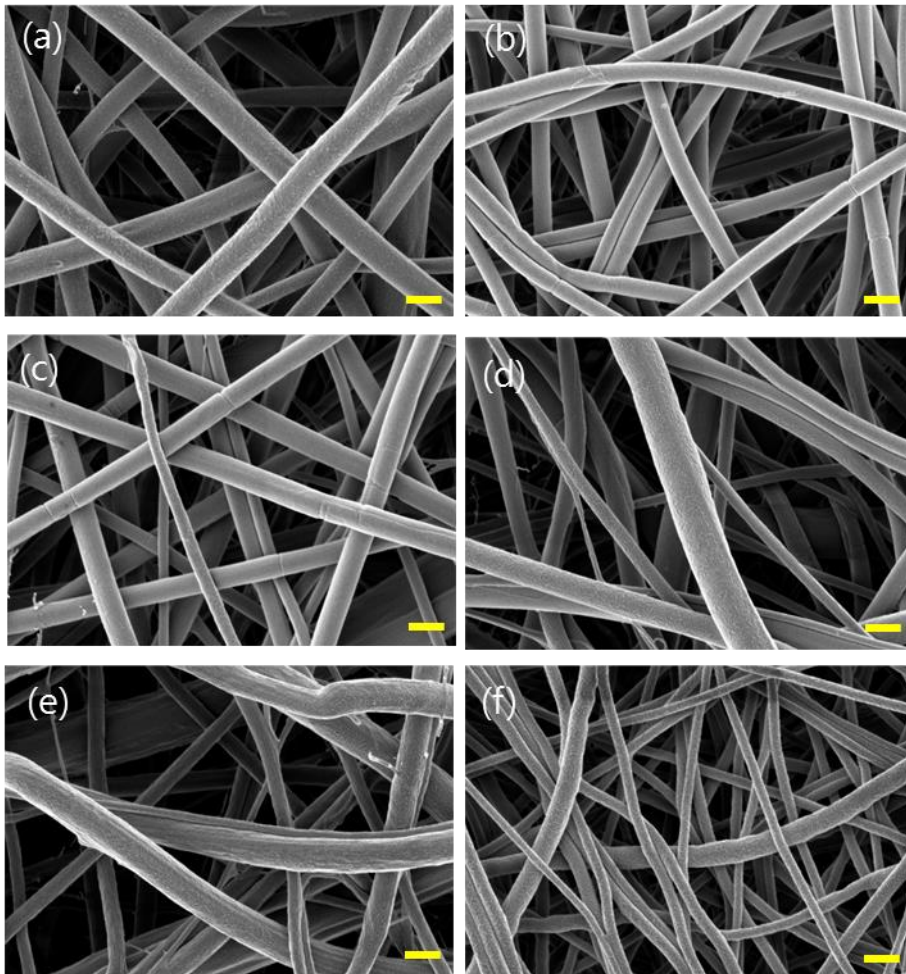


Figure 4. FE-SEM images of (a)SFSP, (b)SF, (c)SFPCL31, (d)SFPCL22, (e)SFPCL13, and (f)PCL nanofiber mats($\times 50k$, scale bar: 500nm)

Table 3. Average fiber size of SFSP, SF, SF/PCL blend, and PCL nanofiber mats

	SFSP ¹⁾	SF ²⁾	SFPCL31 ²⁾	SFPCL22 ²⁾	SFPCL13 ²⁾	PCL ³⁾
Average fiber size(nm)	357±52	256±38	278±66	303±159	386±239	179±64

전기방사 전압조건: ¹⁾ 12kV, ²⁾ 13kV, ³⁾ 14kV

4.1.2 FT-IR 분석

Figure 5는 SF 전기방사시 첨가한 미세조류 SP의 FT-IR 스펙트럼을 보여주고 있다. 3300 cm^{-1} 부근에서 나타난 흡수 피크는 수소결합된 수산화기와 NH_2 기의 스트레칭에 기인한 것이고 [57], 단백질에 기인하는 피크(amide I peak: $1630\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$, amide II peak: $1530\text{--}1540\text{ cm}^{-1}$, amide III peak: $1230\text{--}1270\text{ cm}^{-1}$, amide V peak: $640\text{--}800\text{ cm}^{-1}$)도 특징적으로 나타났다. 또한 1040 cm^{-1} , 670 cm^{-1} 에서 황산염에 의한 특징적인 피크 [58]가 나타나는 것을 통해 종합적으로 볼 때 스피루리나 수용액 추출물인 SP는 친수성을 갖는 무기염과 단백질로 구성되어 있는 것으로 확인하였다.

한편 SF 나노섬유의 FT-IR 스펙트럼(Figure 6)에서는 전형적인 amide I, II, III 피크가 관찰되었으며 SP를 아주 미세한 양(1%(w/v)) 함유한 SF 나노섬유의 경우에도 SF 나노섬유와 거의 유사한 스펙트럼을 나타냈다. PCL 나노섬유의 경우에는 2949 cm^{-1} 와 2865 cm^{-1} 에서 나타나는 CH_2 스트레칭에 대한 피크와 1727 cm^{-1} 에서 나타나는 $\text{C}=\text{O}$ 스트레칭에 대한 피크가 관찰되었으며 [59], SF/PCL 블렌드 나노섬유에는 SF와 PCL이 갖고 있는 특징적인 피크들이 중첩되어 나타난 결과를 통해서 SF와 PCL이 혼재되어 존재함을 확인할 수 있었다.

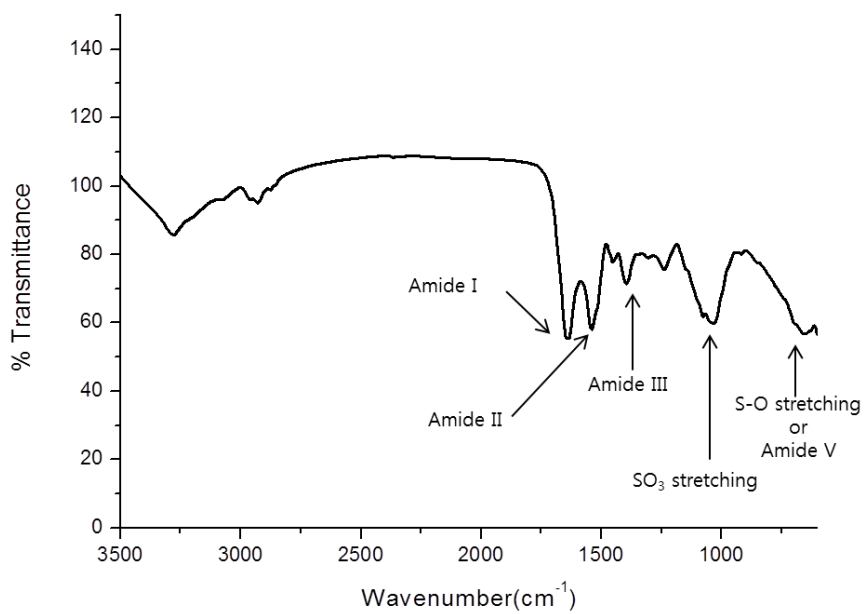


Figure 5. FT-IR spectrum of *Spirulina* extract

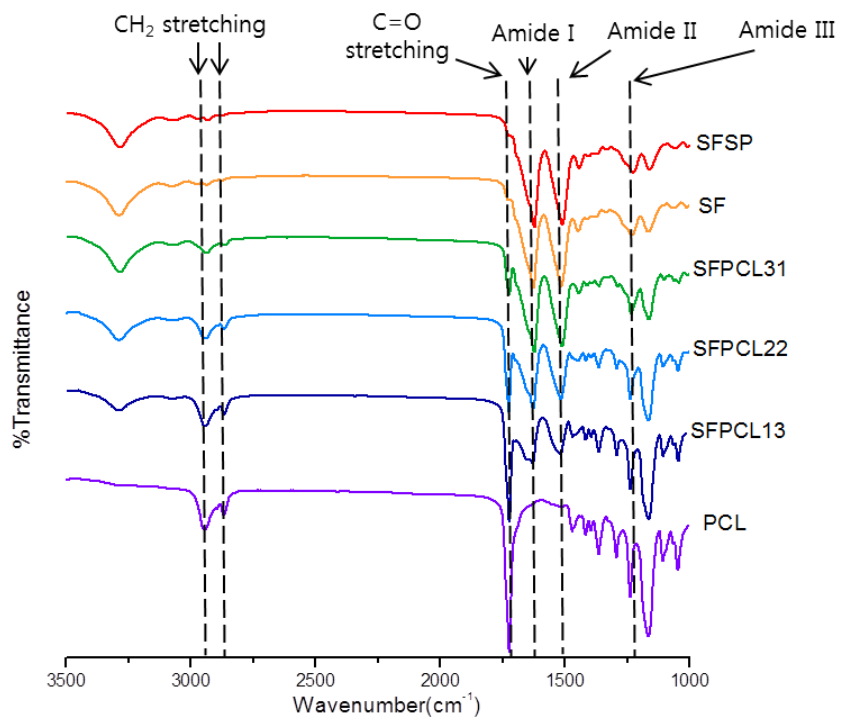


Figure 6. FT-IR spectra of SFSP, SF, SF/PCL blend, and PCL nanofiber mats

4.1.3 열적 거동

SP 함유 SF 및 SF/PCL 블렌드 나노섬유 매트와 DSC 열분석 결과를 Figure 7에 나타내었다. SF 나노섬유의 경우에는 40~115°C 부근에서 넓은 흡열 피크가 나타나고 280°C 부근에서 날카로운 흡열 피크가 나타나는 것을 확인할 수 있었는데 전자의 경우는 SF와 물 분자의 결합이 끊어지면서, 즉 물이 증발함에 의한 것이고 후자의 경우는 SF 사슬의 분해로 인한 것으로 해석된다.[60, 61] 한편 PCL 나노섬유의 경우에는 57.2°C에서 흡열 전이가 나타났는데 이는 PCL의 용융 거동으로 인하여 나타나는 흡열피크로 확인되었다.[62]

SF/PCL 블렌드 나노섬유에 대해서는 각각 SF와 PCL의 열적 전이에 해당되는 피크들이 나타남을 확인하였다. 블렌드 함량비에 따라 열적 전이에 해당하는 흡열 피크의 온도 변화는 거의 없는 것으로 관찰되었으며 SF와 PCL의 열적 전이에 해당하는 피크 강도가 블렌드 비율에 비례하는 것으로부터 블렌드 나노섬유 매트의 구성 성분이 SF와 PCL이 잘 혼재되어 있음을 확인할 수 있었다.

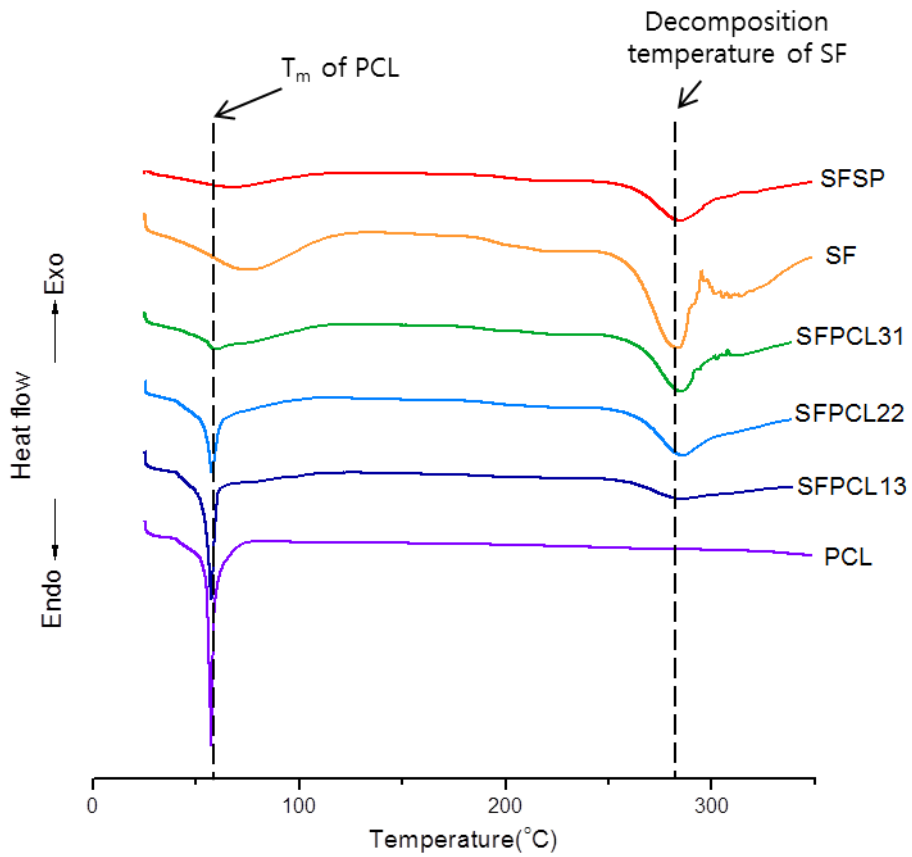


Figure 7. DSC thermograms of SFSP, SF, SF/PCL blend, and PCL nanofiber mats

4.1.4 표면 친수성

나노섬유의 표면 친수성을 살펴보기 위해 접촉각 측정을 하였으며 각 나노섬유 매트형태의 접촉각 측정값을 Table 4에 나타냈다. 친수성의 정도는 세포의 부착능에 영향을 미치는 요소이므로 세포가 부착하는 지지체로서 작용하는 나노섬유가 어느 정도의 친수성을 나타내는지 확인하는 것은 중요하다고 볼 수 있다. PCL 나노섬유의 경우는 72°의 접촉각을 나타내었는데 특히 물방울이 나노섬유에 떨어진 이후에 흡수되지 않고 방울 형태를 그대로 유지하고 있는 것을 확인하였고 이는 PCL이 갖는 소수성으로 인한 것으로 판단된다. SF 나노섬유의 경우에는 62°의 접촉각을 나타내었는데 PCL과 비교하여 낮은 접촉각 값을 보였다. SF는 75%이상이 글리신과 알라닌으로 구성되어 단백질 중에서는 소수성 아미노산을 많이 함유하고 있어 전체적으로 소수성을 띠고 있기는 하나 PCL에 비교하면 상대적으로 친수성을 갖고있기 때문으로 해석된다. 따라서 SF/PCL 블렌드 나노섬유를 보면 SF의 함량이 증가할수록 상대적인 친수성이 증가하므로 접촉각이 감소하는 경향을 나타냈다. 이런 표면 친수성의 결과는 SF/PCL 블렌드를 혈관형 지지체의 중간층으로 도입함으로써 중간층이 습윤 상태에서 혈관형 지지체의 내부층과 외부층 사이의 박리를 방지하는 역할을 할 수 있는 근거가 된다고 볼 수 있다.

한편 SP를 함유하는 SF 나노섬유의 경우에는 SF 나노섬유와 비교했을 때 접촉각이 감소하는 결과가 나타났다. 이것은 SP가 스피루리나 수용액에서 추출한 단백질과 다당류 성분이 포함되어 있기 때문에 친수성이 부여된 결과라고 생각되며 이러한 경향성은 다른 연구[63]에서도 보고되고 있다. 세포의 종류에 따라 그 경향성은 다르지만 일반적으로 부착 표면이 친수성이 높을수록 세포가 잘

부착하고 증식한다는 것을 감안할 때 미세조류 함유 SF 나노섬유는 SP로 인한 항혈전성 뿐만 아니라 친수성으로 인한 세포의 부착능 및 증식능 향상 또한 기대할 수 있다.

Table 4. Contact angle of SFSP, SF, SF/PCL blend, and PCL nanofiber mats

Sample	SFSP	SF	SFPCL31	SFPCL22	SFPCL13	PCL
Contact angle(°)	57.3±3.2	62.2±1.0	62.6±0.7	65.1±1.7	69.4±0.9	72.6±1.0

값과 유사한 값을 나타냈다. SFPCL13 시료의 경우에도 인장 강도값이 낮은 이유는 SF와 PCL의 상용성에 의존하기 때문에 나타난 결과로 해석된다.

실제 지지체는 생체 내에서 사용되기 때문에 습윤 상태에서의 인장 특성을 살펴보는 것이 중요하다. 제조한 각 나노섬유 매트 of 습윤 상태에서의 인장 성질을 측정하여 최대 인장강도, 파단 시 변형률, 영률 값을 Figure 10에 도시하였으며 전형적인 S-S curve를 Figure 11에 나타내었다. SF 및 SP 함유 SF 나노섬유 매트 of 경우 습윤 상태에서의 인장 거동이 매우 열악하였다. 건조 상태 of 인장 거동과 비교했을 때 최대 절단 강도는 약 1/4로 감소하고 영률 또한 급격히 감소하는 반면, 절단시 변형률은 약 8배 증가한 경향을 나타냈다. 이전 연구[64]에서도 본 논문과 유사한 결과를 보고하고 있었는데 이는 SF 단백질이 습윤 상태에서 물이 가소제 역할을 함으로써 SF로 하여금 분자쇄 유연성을 부여하여 강도의 감소뿐만 아니라 초기 탄성률 of 급격한 저하를 야기시키고 응력이 분산되어 절단 변형률이 증가한다고 볼 수 있다.

반면, PCL 나노섬유 매트는 건조 상태에서와 유사한 매우 우수한 인장 거동을 보였다. 즉, PCL은 재료 고유의 화학적, 물리적 특성으로 인하여 습윤 상태에서도 높은 강도와 신도를 유지하고 초기 탄성률도 건조 상태와 비교하여 거의 변화가 일어나지 않는 결과를 보였다. SF/PCL 블렌드 나노섬유 of 경우 건조 상태와 달리 습윤 상태에서의 인장 성질에 차이를 나타내는 것은 물 분자 of 윤희작용으로 인하여 SF 성분이 크게 영향을 받으므로 나타나는 결과이다. 습윤 상태에서 PCL 나노섬유 of 강도, 신도, 영률 등 모든 인장 성질이 우수하였으므로 SF/PCL 블렌드 나노섬유 of 인장 성질 또한 PCL 의존성이 크게

나타났다. 즉 PCL의 함량이 많을수록 절단 강도, 절단 신도 및 영률이 증가하는 결과를 보였다.

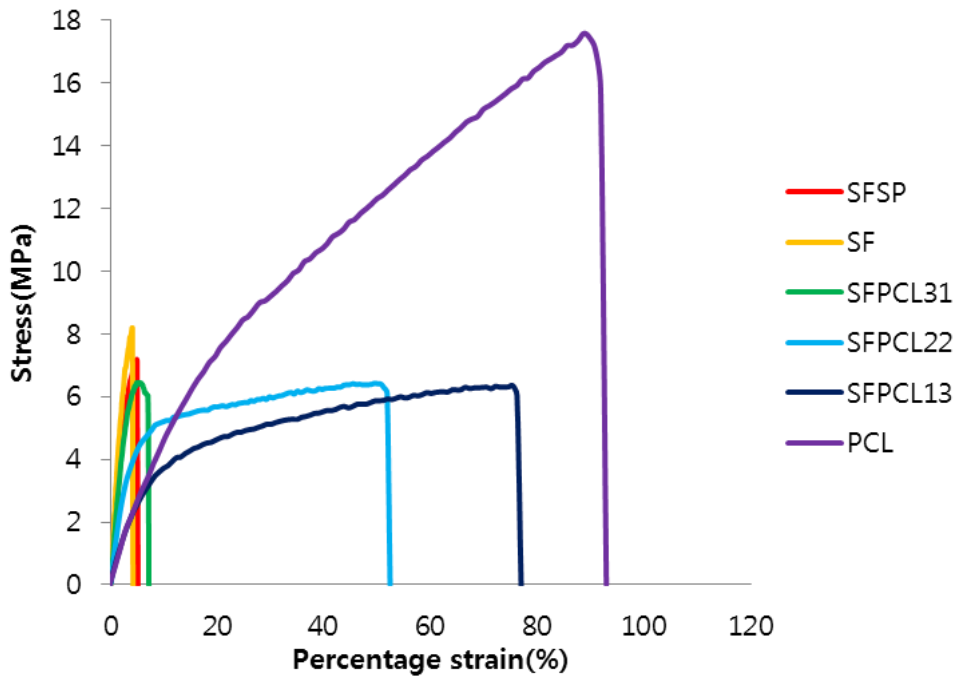
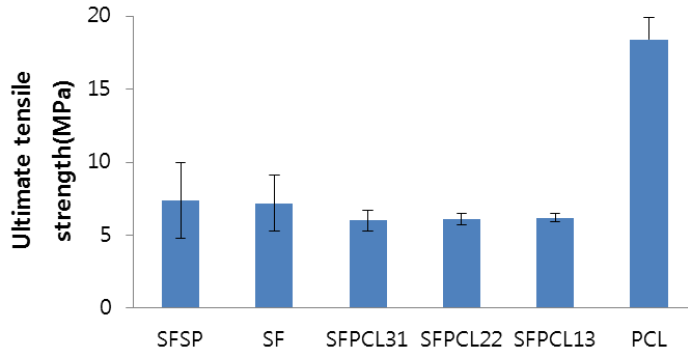
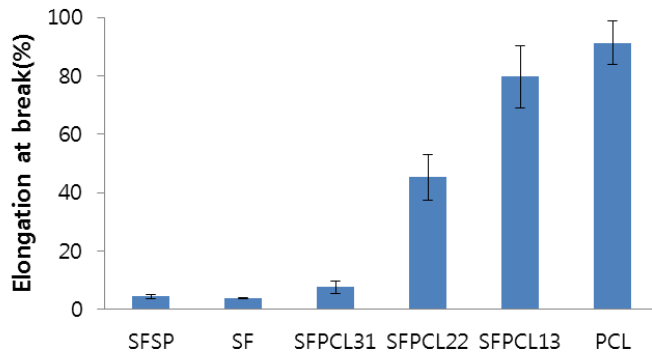


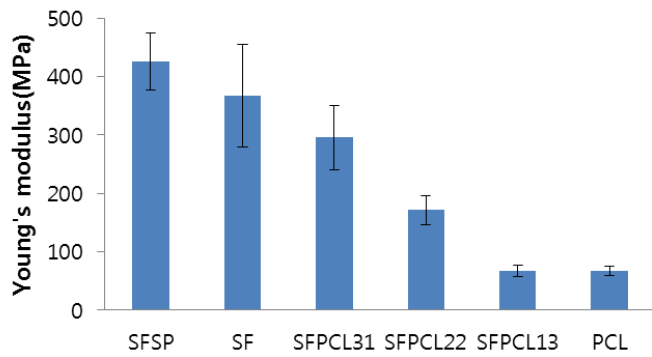
Figure 8. Typical S–S curve of SFSP, SF, SF/PCL blend, and PCL nanofiber mats under a dry condition of sample



(a)

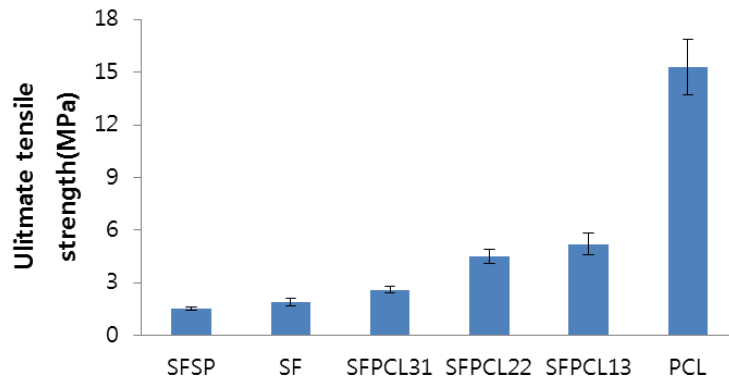


(b)

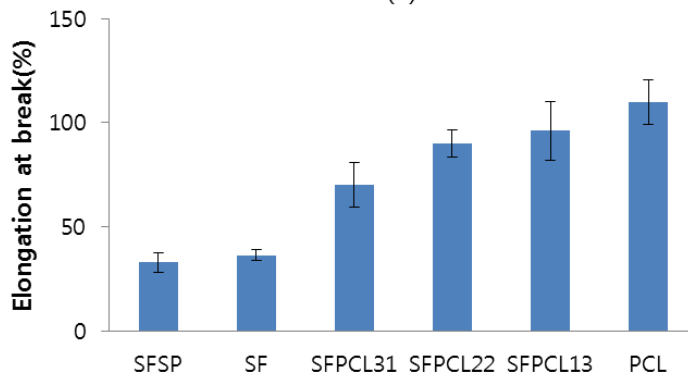


(c)

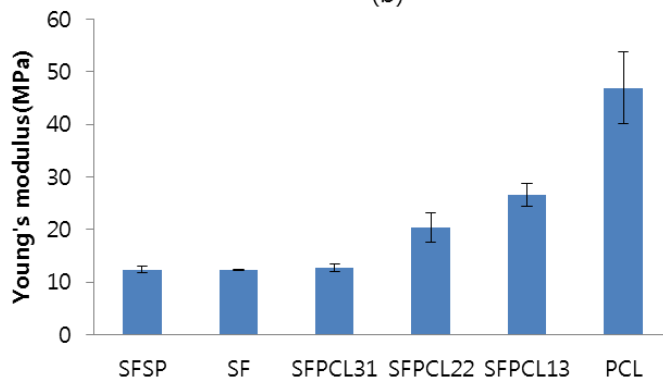
Figure 9. Mechanical properties of SFSP, SF, SF/PCL blend, and PCL nanofiber mats at dry condition of sample; (a) Ultimate tensile strength, (b) Elongation at break, and (c) Young's modulus



(a)



(b)



(c)

Figure 10. Mechanical properties of SFSP, SF, SF/PCL blend, and PCL nanofiber mats at wet condition of sample; (a) Ultimate tensile strength, (b) Elongation at break, and (c) Young's modulus

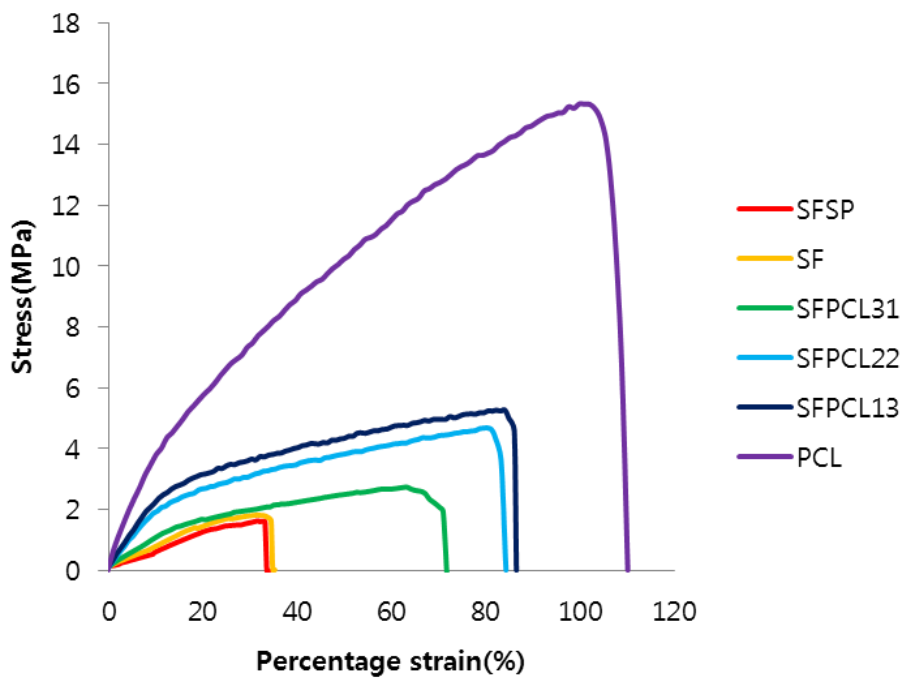


Figure 11. Typical S–S curve of SFSP, SF, SF/PCL blend, and PCL nanofiber mats under a wet condition of sample

4.2 3층구조 혈관형 나노섬유 지지체의 구조 특성 및 성능 평가

각 층을 구성하고 있는 나노섬유 매트와 구조와 성질에 대한 결과를 통해 SF/PCL 블렌드 나노섬유가 SF 및 PCL 나노섬유의 중간적인 특성을 갖는 것을 확인할 수 있었다. 이를 바탕으로 중간층을 SF/PCL 조성비를 달리하여 구성한 3층구조 혈관형 나노섬유 지지체를 제조하였으며 중간층의 SF와 PCL의 블렌드 비율을 달리함에 따라 구조 및 성능 차이가 있는지, 그리고 어떤 비율의 블렌드가 중간층으로도 도입되었을 때 혈관형 나노섬유 지지체로 적용하기에 적합한지를 살펴보았다.

4.2.1 형태학적 구조

제조한 혈관형 지지체를 전기방사 콜렉터에서 분리하기 위해 알코올 및 물에 노출이 되는 과정에 있어서 지지체 내부층에 항응고성 부여를 위해 함유되어 있는 SP가 내부층에 지속적으로 존재하는지를 확인하기 위해 콜렉터에서 분리한 지지체의 단면을 관찰하였다. 미세조류 SP에는 피코시아닌(Phycocyanin) 등의 형광을 띠는 물질이 존재하기 때문에 형광 현미경을 통하여 형광 발현 여부를 살펴봄으로써 SP의 잔존 여부를 확인하였고 혈관형 지지체의 내부층이 어떠한 형태로 구성되어 있는지 또한 관찰하였다.

Figure 12은 전기방사를 통해 제작한 후 알코올 및 수용액 처리를 거친 후 콜렉터에서 제거한 3층구조 혈관형 지지체의 단면을 관찰한 광학 및 형광 이미지를 보여주고 있다. 지지체 제조 후 후처리 과정을 거쳤음에도 SP가 잔존해 있는 것을 모든 시료에서 형광을 띠는 모습을 통해 확인하였으며 광학 이미지와 형광 이미지를 병합한 이미지(Figure

13(c), (f), (i))를 보면 내부층이 지지체 단면에서 어떠한 형태로, 어느 정도의 비율로 구성되어 있는지를 관찰할 수 있었다.

다층구조 지지체 단면의 형태학적 구조를 더 자세히 관찰하기 위해 FE-SEM을 관찰하였다(Figure 13). 중간층이 없는 지지체(Double)의 경우는 원형 단면을 유지하지 못하고 형태가 일그러지고 수축이 발생하였으며 내부층과 외부층의 박리가 크게 일어나는 것으로 관찰되었다. 이를 통해서 SF와 PCL의 물성이 확연히 다르고 상용성이 없음을 앞의 결과와 더불어 다시 한 번 확인할 수 있었다. 반면 SF/PCL 블렌드의 중간층을 도입하여 내부, 외부 및 중간층 세 개의 층으로 구성된 지지체의 경우에는(Figure 13(b)-(d)) 중간층이 없는 지지체(Figure 13(a))와는 달리 원형의 단면 형태를 잘 유지하고 형태적 안정성이 우수함을 알 수 있다. 중간층의 도입으로 층간 박리가 많이 개선되었으나 중간층의 SF/PCL 블렌드 비율이 높거나 낮은 경우(3:1 또는 1:3) 내부층과 외부층의 층간 박리가 여전히 발생하는 것으로 나타났다. 이는 내부층의 SF와 외부층의 PCL 사이에 SF/PCL 혼합 성분으로 구성된 중간층이 완충 역할을 해주어야 하나 내부 또는 외부와 유사한 성분을 많이 함유하는 경우 중간층의 역할을 충분히 해주지 못하기 때문이다. 따라서 동일한 SF/PCL 성분비를 가진 Triple22 시료의 경우(Figure 13(c)) 내부 및 외부층과 더 균일하게 물리적으로 혼합할 수 있는 중간층을 갖게되므로 층간 박리가 최소로 일어나고 안정된 형태를 유지하고 있으므로 우수한 역학적 성질을 가질 것으로 예측된다.

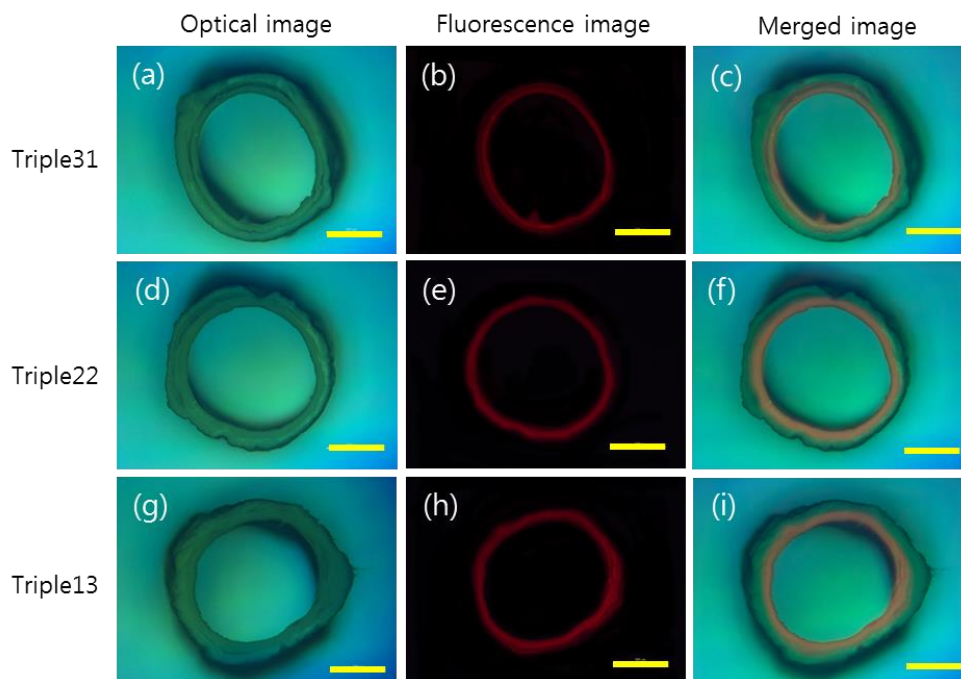


Figure 12. Optical (a, d, g), fluorescence (b, e, h), and merged (c, f, i) images of cross-section of tubular type nanofiber scaffold ($\times 50$, scale bar: $500 \mu\text{m}$)

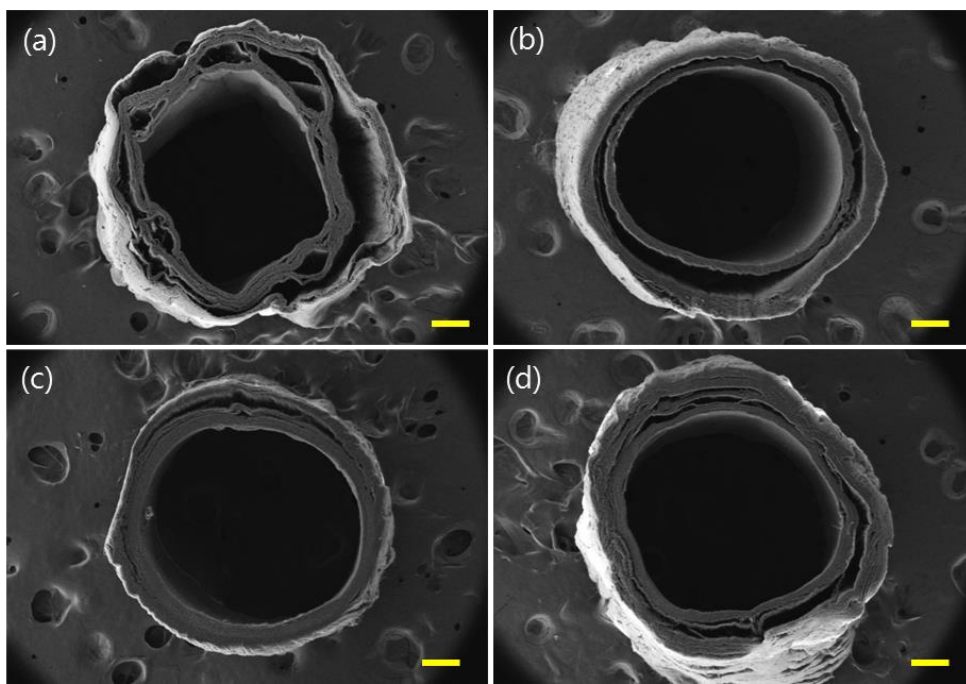


Figure 13. FE-SEM images of cross-section of tubular type nanofiber scaffolds; (a) Double, (b) Triple31, (c) Triple22, and (d) Triple13($\times 100$, scale bar: $200 \mu\text{m}$)

4.2.2 역학적 성질

지지체를 생체 내에 이식하여 인공혈관으로 사용하는 경우 적절한 역학적 성질을 갖는 것이 매우 중요하다. 일반적으로 혈관은 혈류 및 혈압으로 인해 다양한 방향에서 힘을 받게 되며 외부로부터 작용하는 힘에 대해 강도, 신도, 신축성, 굽힘성, 터짐성 등 다양한 역학적 특성을 만족하여야 한다. 또한 혈관형 지지체를 이식하여 봉합을 하여야 하므로 봉합시 찢어짐이 발생하지 않도록 적절한 봉합 강도를 갖고 있어야 한다. 본 논문에서는 제조한 혈관형 지지체의 길이방향과 원주방향으로의 인장 성질을 측정하고 터짐 압력 강도와 봉합 유지 강도를 측정하여 생체 혈관과의 강도와 비교함으로써 실제 적용 가능성을 살펴보았으며 이들 역학적 성질 측정은 시료의 습윤 상태 조건에서 행하였다.

4.2.2.1 길이방향 인장 성질

Figure 14는 혈관형 지지체의 길이 방향으로의 전형적인 S-S 곡선이며 이들 곡선으로부터 측정한 길이방향 인장 성질 결과를 Figure 15에 도시하였다. 인장 곡선의 특징을 살펴보면 단층구조와 비교하여 다층구조(2층, 3층구조)의 경우 길이방향으로의 파단이 층별 SF 및 PCL 구성 성분에 따라 의존성이 있으며 두 개 이상의 피크점을 나타내면서 층별 절단이 독립적으로 단계적으로 진행되는 경향을 보였다.

SP 함유 SF 나노섬유 내부층과 PCL 나노섬유 외부층으로 구성된 2층구조 혈관형 지지체의 길이방향으로의 절단은 먼저 내부층의 절단이 일어나고 계속적으로 외부층의 절단이 일어나는 것으로 나타났으며 Figure 15에서 보는 바와 같이 절단강도, 절단시 변형률, 영률값이 모두 PCL 지지체보다는 낮은 값, SF 지지체보다는 높은 값을 갖는 것으로 측정되었다. 전반적으로 SF 나노섬유로만 구성된 혈관형 지지체의

길이방향으로의 인장성질은 매우 열악한 반면 PCL 지지체는 매우 우수한 인장 특성을 보였으며 습윤 상태에서는 나노섬유 매트형태에서도 인장 특성이 PCL의 경우 월등히 뛰어난 결과를 보인 것과 동일한 결과를 나타냈다고 볼 수 있다.

한편 3층구조의 혈관형 지지체는 Figuer 14에서 보는 바와 같이 중간층을 구성하는 SF/PCL 블렌드 비율에 따라 2 또는 3단계로 절단이 진행됨을 알 수 있다. 층간 분리가 미미하게 일어나는 Triple 31 또는 Triple13 시료에 있어서는 중간층의 SF/PCL 구성성분이 각각 내부층(SF)또는 외부층(PCL)과 큰 차이를 보이지 않아 중간층의 특징적인 절단이 독립적으로 진행되지 않고 내·외부층과 같이 절단이 일어나 2개의 피크점을 나타내며 길이방향으로의 절단이 일어나게 된다. 층간 분리없이 안정된 형태학적 구조를 나타내는 3층구조의 Triple22 시료의 경우는 중간층의 절단이 확연히 관찰되었으며 내부, 중간, 외부층 순으로 파단이 진행되는 경향을 보였다.

3층구조 혈관형 지지체의 최대 절단 강도, 절단시 변형률, 영률을 살펴보면(Figure 15), 중간층을 도입함으로써 PCL 지지체와 유사하게 높은 신도와 절단 강도를 그대로 유지하면서 초기 탄성률이 현저히 증가하는 현상을 보였다. SF 지지체와 PCL 지지체의 우수한 역학적 특성을 모두 살려 시너지 효과를 나타냈다고 볼 수 있다. 특히 Triple22 시료의 경우에 3층구조를 갖는 다른 시료들보다도 높은 절단 강도와 초기 탄성률 값을 갖는 것으로 나타났는데 형태학적 구조에서 확인한 바와 같이 층간 박리의 최소화에 따른 형태 안정성뿐만 아니라 습윤 상태에서의 물 분자 침투에 따른 층간 상호작용의 향상에 의한 결과로 여겨진다.

3층구조 혈관형 나노섬유 지지체의 인장 성질을 생체 혈관과 비교하여 보았을 때 절단 변형률은 생체 혈관과 유사한 값을 나타냈고

최대 절단 강도는 월등히 높은 값을 나타냈다. 중간층을 구성하는 SF/PCL 블렌드 비율에 상관없이 제조한 3층구조 혈관형 지지체의 절단 강도는 6~8MPa, 절단 변형률은 135~140%로 측정되었으며 생체 혈관의 역학적 성질과 매우 유사한 특성을 나타냈다. 생체 혈관의 경우 native carotid artery는 0.95 ± 0.13 MPa 절단 강도와 $125 \pm 15\%$ 절단 변형률, porcine coronary artery는 2.6MPa 절단 강도와 $146 \pm 1\%$ 절단 변형률을 갖는 것으로 보고되고 있다. [20, 53].

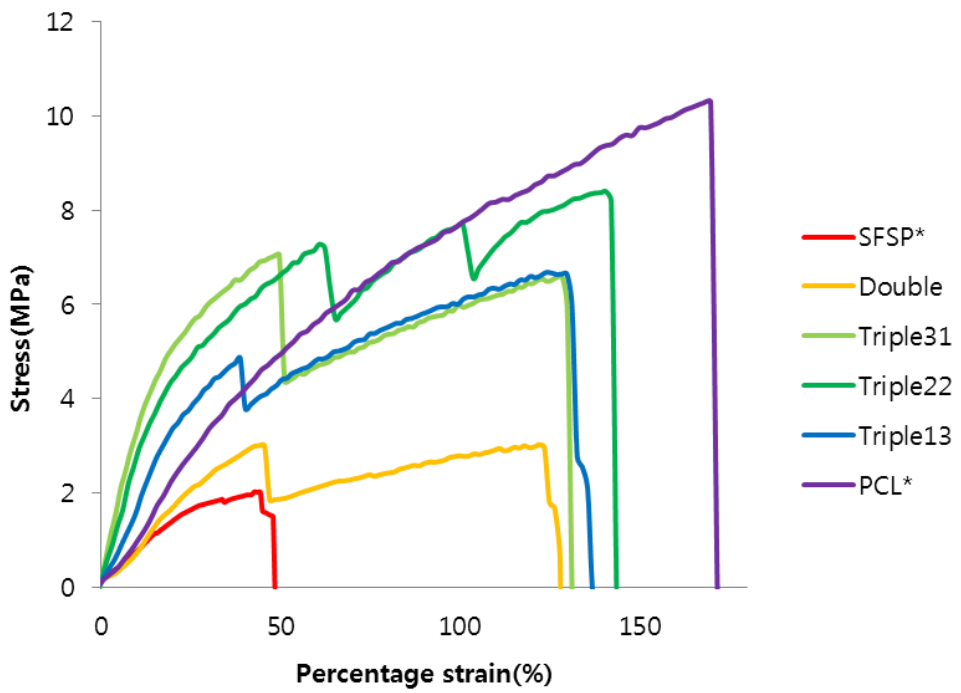
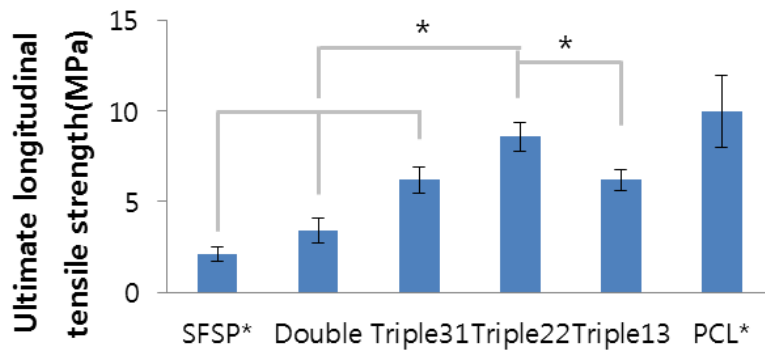
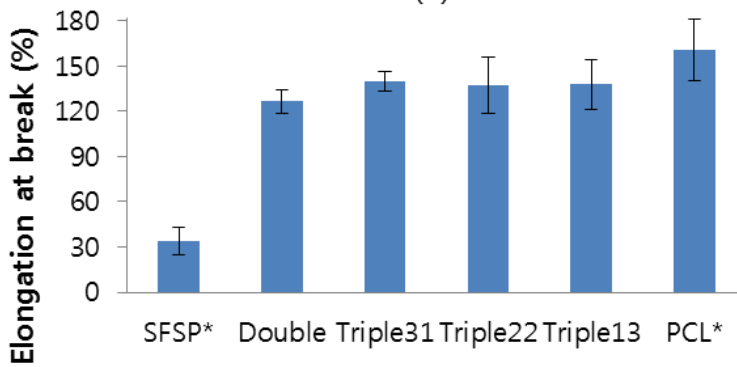


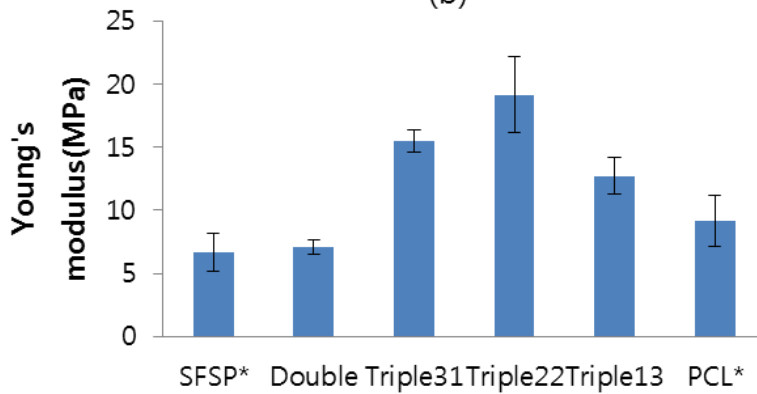
Figure 14. Typical S–S curve of tubular type nanofiber scaffold in a longitudinal direction of sample



(a)



(b)



(c)

Figure 15. Mechanical properties of tubular type nanofiber scaffold in a longitudinal direction of sample (a) Ultimate tensile strength, (b) Elongation at break, and (c) Young's modulus (* significantly different at $p < 0.05$, $n = 5$)

4.2.2.2 원주방향 인장 성질 및 터짐 압력 강도

이상적인 혈관형 지지체는 혈류에 의해 가해지는 압력을 견딜 수 있는 충분한 역학적 성질이 요구된다. 이 압력은 구경 내 표면에 수직인 방향으로의 장력을 유발하는데 혈압으로 인해 팽창되려는 효과와 반대인 혈관 벽의 세로 및 원주 접선 방향의 힘과 동일하다. 라플라스의 법칙(Laplace's law)은 이러한 혈관의 단위 길이 당 힘이 혈관 반지름과 혈압과 서로 연관이 되어 있음을 보고하였는데[65] 이를 통해 지지체의 벽의 장력을 원주방향의 인장강도를 통해 측정하고 그 값을 라플라스 법칙에 따른 식(제 3장 재료 및 방법 식 (1))을 통해 터짐 압력 강도로 환산하였다.

Figure 16은 원주방향으로 인장시험을 수행하여 얻은 3층구조 혈관형 지지체의 전형적인 S-S curve를 나타내며 이로부터 계산된 최대 인장강도, 파단시 변형률, 영률 값을 Figure 17에 도시하였다. 또한 Figure 17에서 나타낸 원주방향의 인장강도로부터 터짐 압력 강도 값을 계산하였으며 생체 혈관의 경우와 비교하여 Figure 18에 도시하였다.

PCL 혈관형 지지체는 다른 시료들 보다 높은 원주방향 인장강도를 나타내었는데 이는 PCL 재료가 갖는 인성(높은 신도 및 절단 강도)에 기인한 것으로 볼 수 있다. SP 함유 SF 혈관형 지지체는 앞선 결과에서 살펴보았던 길이방향 인장강도와 동일한 경향으로 낮은 원주방향 인장강도 및 변형률을 나타내었다. 3층구조를 갖는 혈관형 지지체의 경우는 중간층을 구성하는 SF/PCL 블렌드 비율에 상관없이 서로 비슷한 거동을 보였는데 이는 시료에 대한 역학적 성질 측정 방법에 기인한 것으로 여겨진다. 인장강도를 측정할 때 내부에 클램프를 삽입하여 당기게 되면 힘을 받는 지점은 혈관형 지지체의 옆면이 되는데 이는 지지체를 구성하는 세 층이 동일한 힘을 받게 된다는 의미이다. 결국 파단이 이루어지는 지점은 지지체가 완전히 끊어질 때이고 이는

가장 강도가 높은 PCL 부분이 끊어질 때가 되고 모든 세 층을 갖는 지지체에서 PCL 부분이 동일한 두께로 구성되어 있기 때문에 비슷한 원주방향 인장강도 및 변형률을 갖게 된다고 볼 수 있다. 원주방향의 절단 변형률 값은 SP 함유 SF 지지체를 제외하고는 모두 비슷한 값을 나타내었으며 영률 값은 SF 지지체에서 높은 값을 나타내었다. 습윤 상태에서 SF 혈관형 지지체의 경우 높은 초기 탄성률을 나타낸 것은 원통형 지지체를 원주방향으로 응력을 가함에 따라 나타나는 현상으로 해석될 수 있으며 일반적인 길이방향으로의 측정 방법 결과로는 설명할 수 없다고 생각된다.

한편 Figure 18에서 나타낸 바와 같이 터짐 압력 강도 값을 생체 혈관의 경우와 비교 검토하였다. 3층구조를 갖는 혈관형 지지체는 5300-5700mmHg의 터짐 압력 강도를 보였는데 PCL 혈관형 지지체보다는 다소 낮은 값을 보였으나 이는 SP 함유 SF 혈관형 지지체의 압력 강도값보다는 월등히 높은 값을 나타냈다. Human carotid artery는 5000mmHg, saphenous vein은 2250mmHg의 터짐 압력 강도값을 갖는 것으로 보고되고 있는데[66] 본 논문에서 제조한 3층구조 혈관형 지지체는 해당 부위에 in vivo로 이식을 함에 있어서도 혈류를 견디는 데 있어 무방한 터짐 압력이 우수한 역학적 특성을 갖는다고 볼 수 있다.

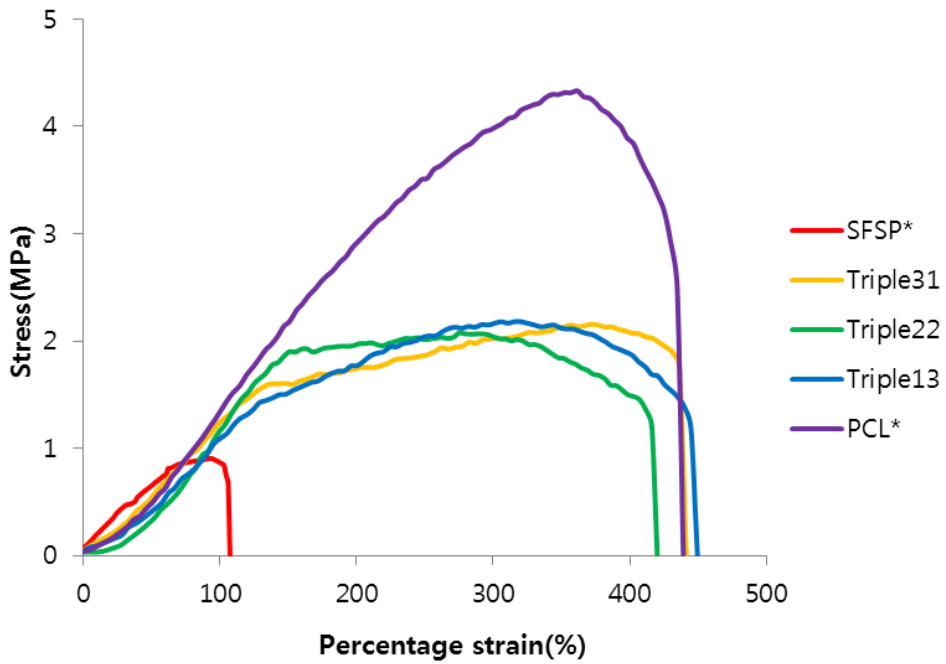
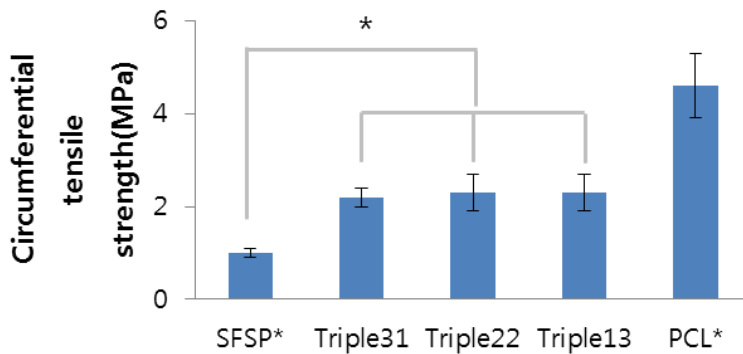
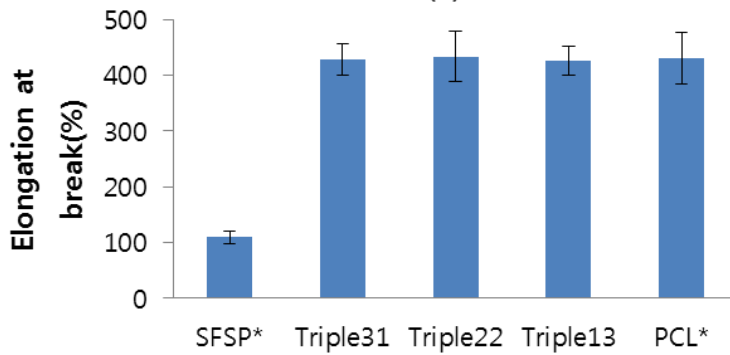


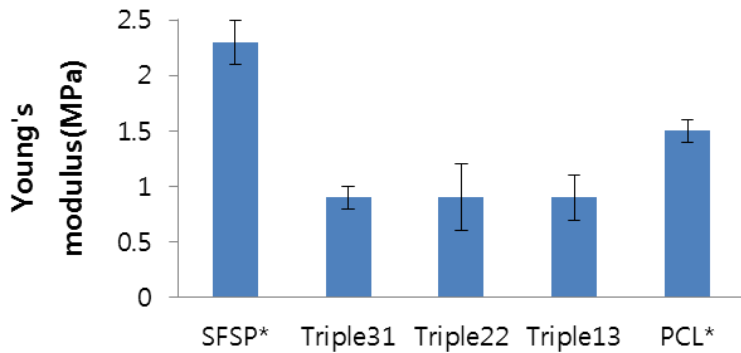
Figure 16. Typical S–S curve of tubular type nanofiber scaffold in a circumferential direction of sample



(a)



(b)



(c)

Figure 17. Mechanical properties of tubular type nanofiber scaffold in a circumferential direction of sample (a) Ultimate tensile strength, (b) Elongation at break, and (c) Young's modulus (* significantly different at $p < 0.05$, $n = 5$)

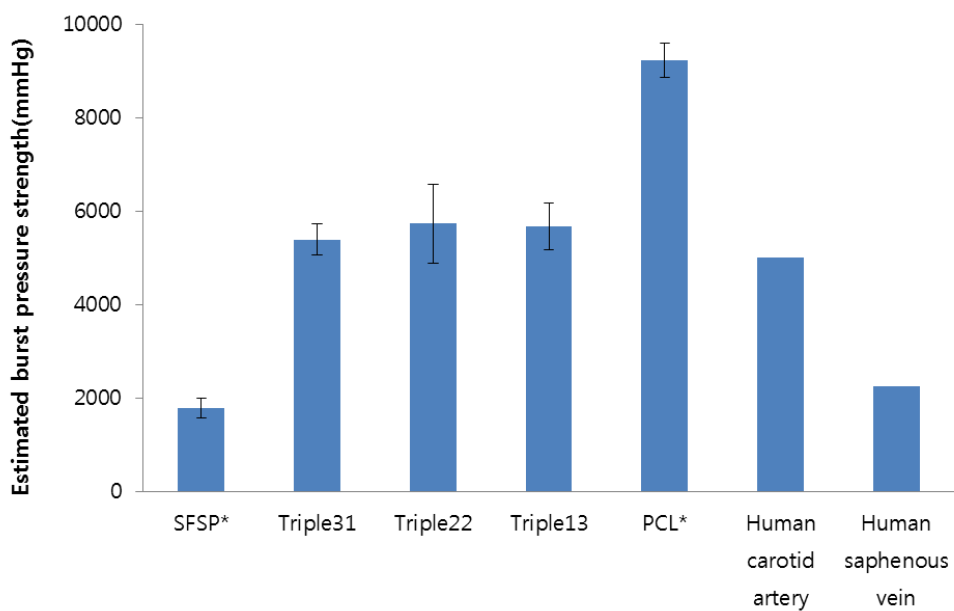


Figure 18. Estimated burst pressure strength of tubular type nanofiber scaffold in comparison to that of native blood vessels (*significantly different at $p < 0.05$, $n=5$)

4.2.2.3 봉합 유지 강도

혈관형 지지체를 생체 내에 이식할 때는 주변 혈관과 지지체를 봉합할 때 요구되는 힘을 견딜 수 있어야 하는데 이 때 요구되는 응력이 봉합 유지 강도이다. 이는 실제 지지체의 이식 절차의 성공 여부에 직접적인 연관이 있는 요소로 알려져 있다.[7] 3층구조 혈관형 나노섬유 지지체의 봉합 유지 강도를 측정하여 그 결과를 Figure 19에 나타내었다.

예상했던대로 실크 자체로만 제조한 SFSP 혈관형 지지체는 인장 성질뿐만 아니라 봉합 유지 강도에서도 열악한 성능을 나타냈으며 탄성이 우수한 PCL 혈관형 지지체는 높은 봉합 유지 강도 값을 보였다. 반면에 3층구조 지지체의 경우에는 PCL 지지체의 봉합 유지 강도값보다는 조금 낮은 값을 보였지만 SF 혈관형 지지체 봉합 유지 강도의 10배 이상 높은 값을 나타냈다.

3층구조 혈관형 지지체의 봉합 유지 강도는 1.44~1.86N으로 측정되었으며 다른 역학적 성질의 경향성과 마찬가지로 층간 박리가 덜 일어나 형태 안정성이 높고 층간 상호작용이 큰 Triple22 시료의 경우 가장 우수한 봉합유지 특성을 나타냈다. 혈관용 지지체에 있어서 기본적으로 요구되는 봉합 유지 강도는 적어도 2.0N 이상이 되어야 한다고 알려져 있으며[67] 실제 생체 혈관의 봉합 유지 강도 측정값은 Human mammary artery의 경우 $1.4 \pm 0.01\text{N}$, Human saphenous vein은 $1.81 \pm 0.02\text{N}$ 로 보고되고 있다.[68] 따라서 본 논문에서 제조한 3층구조 혈관형 나노섬유 지지체는 충분히 혈관 대체 지지체로 사용할 수 있는 봉합 유지 특성이 있으며 형태학적 구조 설계를 보완한다면 봉합 유지 강도값을 더 높일 수 있을 것으로 기대된다.

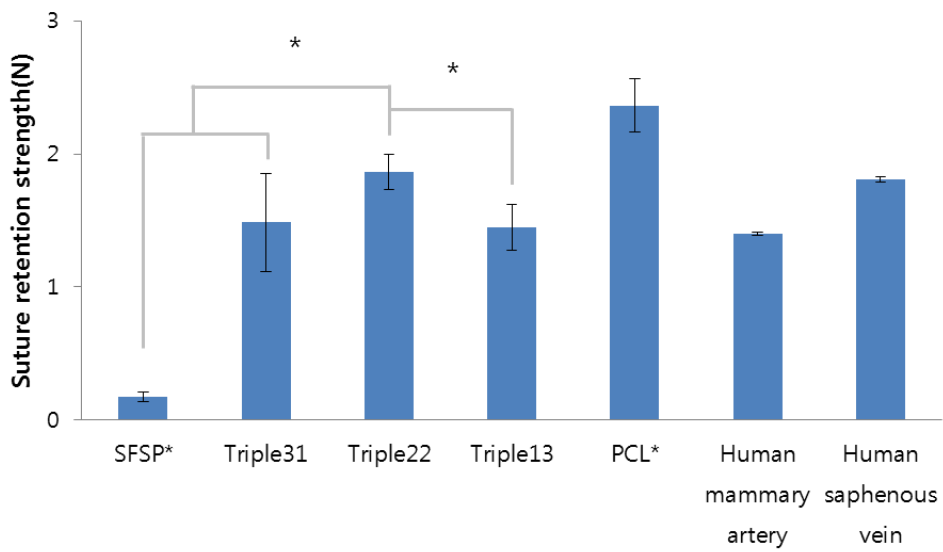


Figure 19. Suture retention strength of tubular type nanofiber scaffold in comparison to that of native blood vessels (*significantly different at $p < 0.05$, $n = 5$)

4.2.3 생물학적 평가

혈관 대체 지지체는 기본적으로 생체적합성이 우수하여야 하므로 SP를 함유하는 SF와 PCL로 구성된 나노섬유 지지체의 생물학적 평가를 수행하였다. 세포 독성, 세포 증식 및 부착능, 그리고 유전자 발현 여부를 살펴봄으로써 제조한 지지체의 세포적합성을 평가하였다. 3층구조 혈관형 나노섬유 지지체를 구성하고 있는 각 층별 나노섬유를 매트 형태로 제작하여 *in vitro* test를 수행하였다.

4.2.3.1 세포 독성

TNF- α assay를 통해 시료의 세포 독성 여부를 측정한 결과를 Figure 20에 나타내었다. 모든 시료에서 3일 동안의 세포 독성을 측정한 결과 대식 세포가 분비하는 염증 인자인 TNF- α 의 양이 감소한 것을 확인하였다. 생체고분자로 널리 사용되어온 SF와 PCL은 세포 독성이 없는 소재로 알려져 있으므로 본 실험 결과는 이들로 구성된 나노섬유 지지체의 경우에도 독성을 갖지 않음을 재확인한 것이다. 특히 내부층을 구성하는 혈관형 지지체는 미세조류 SP를 1%(w/v) 함유하고 있으므로 SFSP 나노섬유 매트 시료의 세포 독성을 살펴보았는데 3일 후 TNF- α 의 농도가 감소하는 것을 확인하였다.

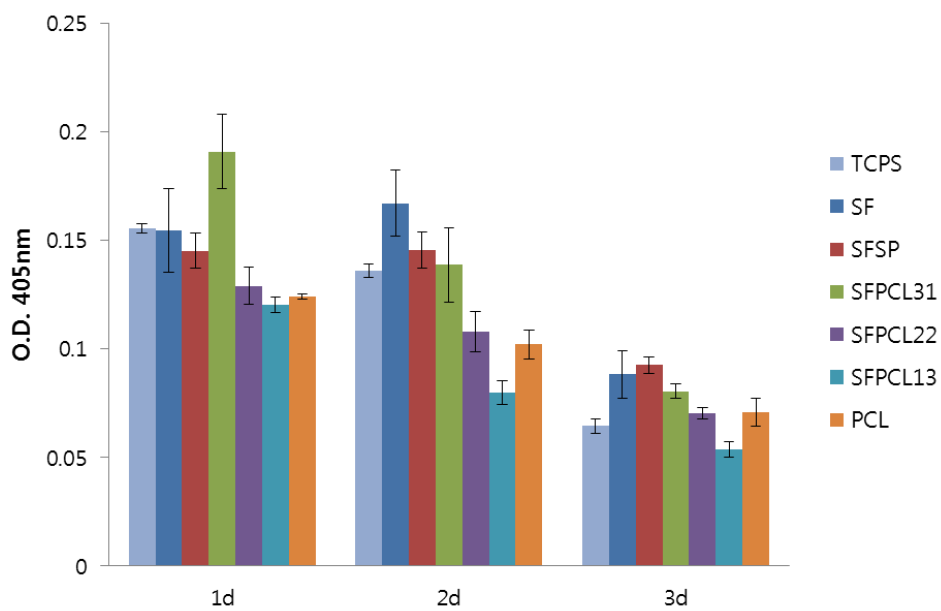


Figure 20. TNF- α assay of SFSP, SF, SF/PCL blend, and PCL nanofiber scaffolds

4.2.3.2 세포 증식능

생체 혈관은 크게 세 층으로 이루어져 있으며 내부층은 혈관내피세포, 중간층은 근육 세포, 외부층은 섬유아세포로 주로 구성되어 있다.[16] 이상적인 혈관형 지지체의 경우 생체 혈관을 구성하는 세포들이 증식하기에 적절한 생체적합성이 요구되며 실제 혈관을 구성하는 세포가 해당 부위에서 높은 증식성을 갖는지에 대한 여부는 혈관형 지지체의 이식 이후 세포 재생 시간에 영향을 미친다고 볼 수 있다. 이에 본 논문에서는 혈관 내부 및 외부를 구성하는 혈관내피세포(HUVEC)와 섬유아세포(fibroblast)를 이용하여 세포 증식 거동을 MTT assay를 통해 살펴보았다.

Figure 21은 HUVEC의 세포 시험 측정 결과를 나타낸 MTT 결과이다. 1일, 3일, 5일에 걸쳐면서 세포 증식능을 측정하였는데 SP 함유 SF 나노섬유 및 SF 나노섬유 지지체가 PCL 나노섬유보다 높은 증식능을 갖는 것으로 나타났다. 특히 SP 함유 SF 나노섬유 지지체가 SF 나노섬유에 유사한 세포 증식능을 보이는 것을 통해 미세조류를 함유한 SF 나노섬유는 항혈전성 뿐만 아니라[12] 혈관내피세포에 대한 증식성 또한 높다고 볼 수 있다. 실제 내피세포의 경우에는 지지체의 친수성이 증가함에 따라 그 증식률이 증가한다는 보고가 있다.[69] 이에 기반할 때 SP의 친수성이 HUVEC의 증식률에 일부 영향을 주었다고 볼 수 있다.

혈관 외부를 구성하는 fibroblast에 대한 세포 증식능을 평가하여 MTT assay 결과를 Figure 22에 나타냈는데 PCL 나노섬유 지지체가 SP 함유 SF 나노섬유 및 SF 나노섬유보다 높은 세포 증식성을 나타내었다. 일반적으로 세포는 표면의 화학적, 물리적 및 생물학적 특성과 관련이 있으며 세포의 종류에 따라 세포 부착 및 증식에 차이를 나타낸다고 알려져 있다. PCL 나노섬유 지지체에 fibroblast 증식이 잘

일어나는 이유는 SF(또는 SP 함유 SF)나노섬유 지지체에 비해 상대적으로 소수성을 띠기 때문뿐만 아니라 PCL 자체가 fibroblast와 서로 상호작용을 일으켜 세포 증식능이 높게 나타났다고 여겨진다. 재료의 특성, 특히 화학 조성 차이에 따라 세포와의 상호작용이 영향을 받게 되고 세포 증식능에도 영향을 끼친다고 알려져 있다.[70, 71]

따라서 MTT assay 결과를 통해 HUVEC의 세포 증식능은 내부층을 구성하는 SF(또는 SP 함유 SF) 나노섬유 지지체에서 높게 나타나고 fibroblast의 세포 증식능은 외부층을 구성하고 PCL 나노섬유 지지체에서 높게 나타남을 확인하였다. 이 결과는 지지체의 내부층 및 외부층을 구성할 때 재료의 종류 및 형태학적 구조와 연관이 있을 것으로 추측할 수 있으며 본 논문에서 설계한 3층구조 혈관형 나노섬유 지지체의 경우 in vivo test에서 우수한 성능을 나타낼 것으로 기대된다.

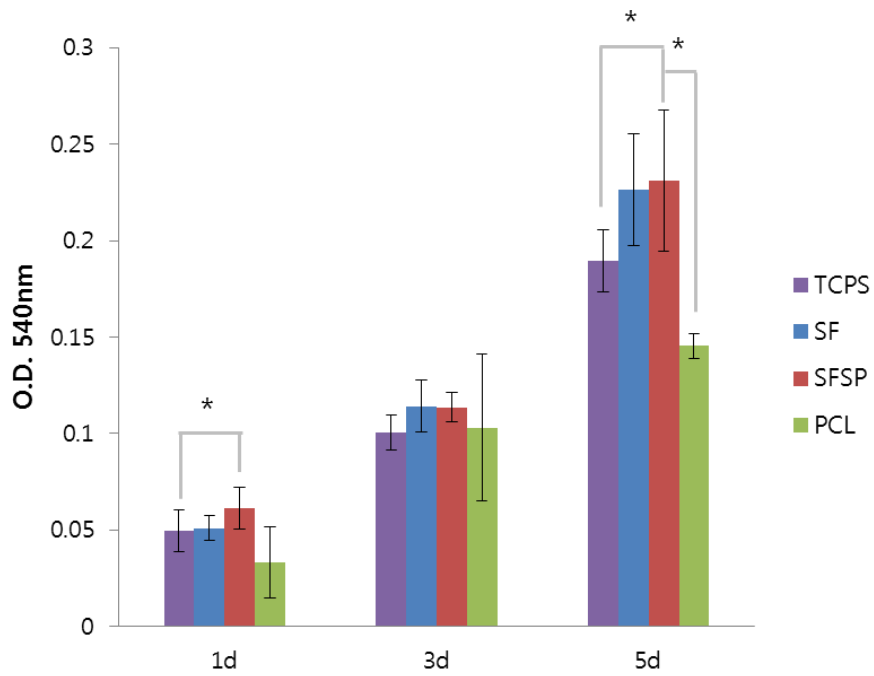


Figure 21. MTT assay of HUVEC cells on SF, SFSP, and PCL nanofiber scaffolds after 1, 3, 5 days cell culture (* significantly different at $p < 0.05$, $n = 6$)

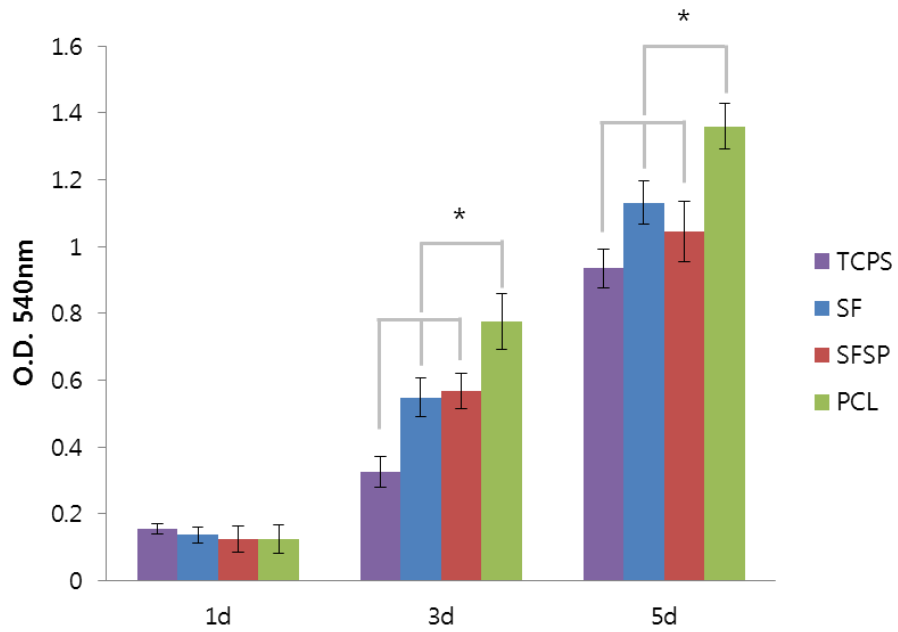


Figure 22. MTT assay of fibroblast cells on SF, SFSP, and PCL nanofiber scaffolds after 1, 3, 5 days cell culture (* significantly different at $p < 0.05$, $n = 6$)

4.2.3.3 세포 부착

앞선 결과를 통해 나노섬유 매트에서의 각 세포의 증식 거동을 살펴볼 수 있었다. 하지만 이는 살아있는 세포를 정량적으로 분석한 결과이므로 이 세포들이 어떠한 형태로 나노섬유 매트 위에 부착하여 잘 뻗어 증식하는지에 대한 여부는 위의 실험을 통해서 알 수 없다. 세포가 특정 표면에 부착한 후 증식하기에 적절한 환경이라고 판단되면 그 세포는 별 모양으로 표면에 다리를 뻗어 납작한 형태를 유지하며 증식한다. 표면과의 강한 부착(focal adhesion)이 형성되는 것이다.[72] 1일, 3일, 5일차에 나노섬유 매트 위에 증식한 세포의 형태학적 구조를 FE-SEM 이미지를 통해 살펴봄으로써 세포가 잘 뻗어 증식하고 있는지에 대한 여부를 살펴보았다.

Figure 23에서 보는 바와 같이 HUVEC 경우 1일차 부착부터 시료 간의 차이가 나타나는 것을 볼 수 있다. SP 함유 SF 나노섬유 및 SF 나노섬유 지지체에서는 초기부터 HUVEC이 표면에 납작하게 붙어있는 모습을 볼 수 있다. 반면, PCL 나노섬유에서는 세포가 완전히 부착하지 못한 채 원형의 모습을 유지하고 있다. 이를 통해 HUVEC의 초기 세포 부착이 SF 기반의 나노섬유에서 더 잘 되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 경향은 3일차, 5일차 실험에서도 지속적으로 나타나고 있다. PCL 나노섬유의 경우에도 5일차가 되면 일부 부착이 된 세포가 존재하는 것으로 나타났다..

한편 fibroblast에서는(Figure 24) HUVEC과는 상이한 결과가 나타났는데 먼저 세포 seeding 1일차를 보면 PCL 나노섬유에서 세포가 잘 뻗은 상태로 증식하고 있는 모습을 확인할 수 있다. 이는 아직 원형의 상태로 세포가 존재하는 SP 함유 SF 나노섬유 및 SF 나노섬유와는 대조되는 모습이다. PCL 나노섬유에서 세포에 대한 초기 부착능이 높다는 것은 증식을 더 빨리 할 수 있는 발판이 마련된다는 것을 의미하는데 이

는 앞선 MTT assay를 통해 나타난 세포 증식능 결과와 연계하여 볼 때 PCL 나노섬유 지지체에서는 fibroblast에 대한 친화성이 매우 크고 따라서 세포 부착 및 증식이 잘 일어나는 특성을 가지고 있음이 확인되었다.

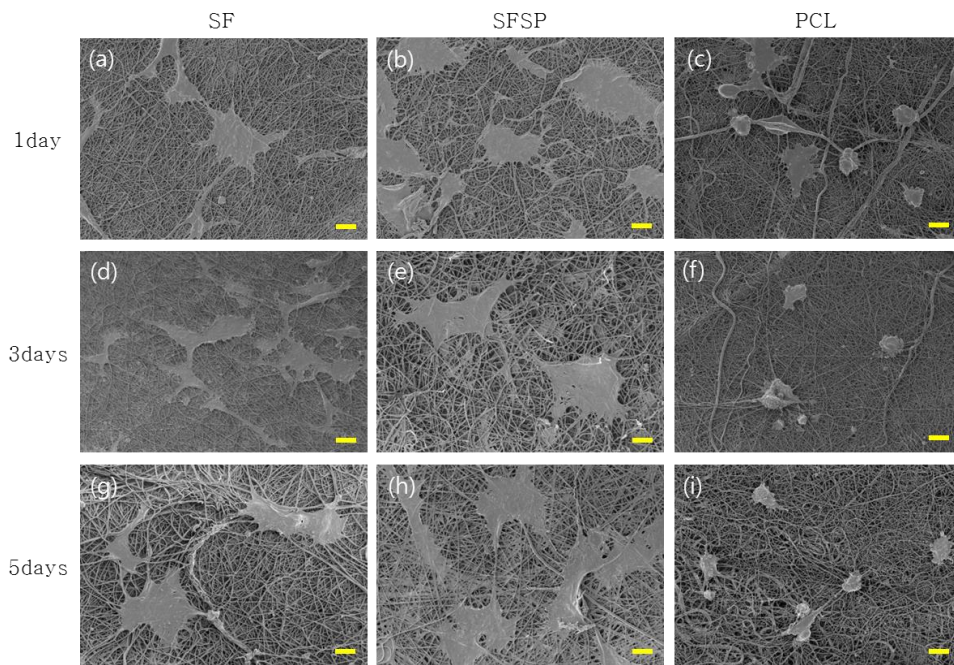


Figure 23. FE-SEM images of HUVEC cells on SF(a, d, g), SFSP(b, e, h), and PCL(c, f, i) nanofiber scaffold for 1(a-c), 3(d-f), and 5(g-i) days after cell seeding ($\times 2000$, scale bar: $10 \mu\text{m}$)

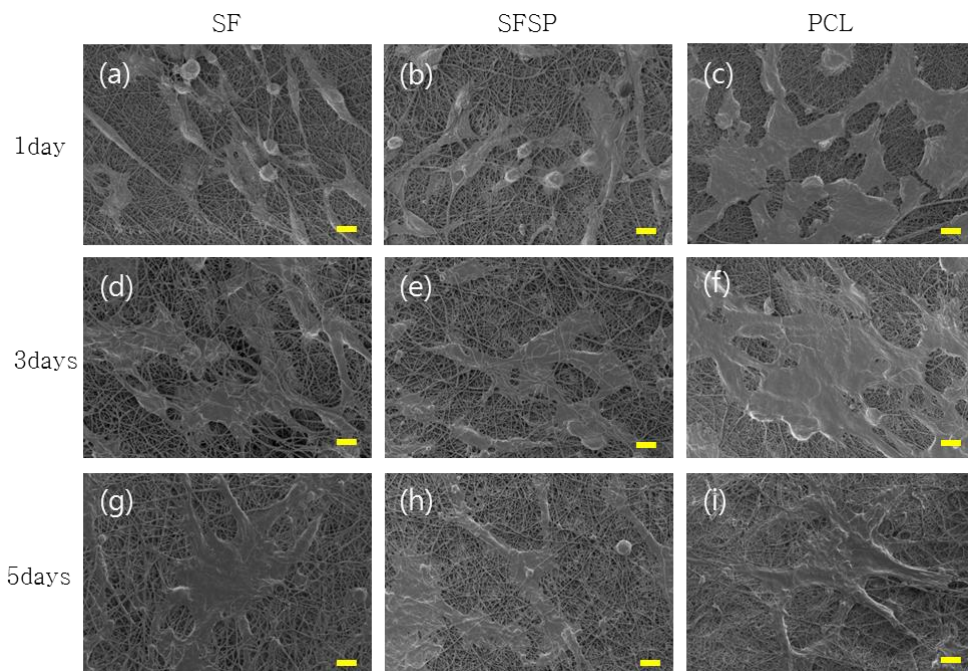


Figure 24. FE-SEM images of fibroblast cells on SF(a, d, g), SFSP(b, e, h), and PCL(c, f, i) nanofibers for 1(a-c), 3(d-f), and 5(g-i) days after cell seeding ($\times 2000$, scale bar: $10 \mu\text{m}$)

4.2.3.4 세포 유전자 발현

지지체는 이식 초기에는 자체적인 항혈전성을 가짐으로써 혈류로 인한 혈전생성을 방지할 수 있어야 하지만 장기적인 관점에서 보면 지지체 내부에 단시간 내에 내피세포를 생성함으로써 항혈전성을 지속적으로 유지할 수 있어야 한다는 점에 기반하여 앞선 결과에서 혈관내피세포의 부착과 증식 거동을 살펴보았다. 그러나 혈관내피세포가 오랜 기간 지지체 표면에 부착하여서 증식함에 있어서도 세포가 여전히 자신의 형질(phenotype)을 유지하는지, 즉 세포의 기능성 유지에 대한 여부 또한 확인할 필요가 있다.[73]

6일 동안 세포를 나노섬유 지지체 위에 배양하였을 때 혈관내피세포가 여전히 자신의 형질을 유지하며 증식하는지를 확인하기 위해 RT-PCR을 이용하여 특정 마커에 대한 유전자 발현 여부를 살펴보았다(Figure 25). 시료로는 SP 함유 SF 나노섬유와 양성 대조군으로 SF 나노섬유, TCPS를 설정하였고 음성 대조군으로는 혈관내피세포가 갖고 있는 유전자를 보유하지 않은 섬유아세포로 설정했다. 그 결과 발현 여부를 측정된 두 유전자(CD31, vWF)에 대해 혈관내피세포의 형질이 SP 함유 SF 나노섬유에서 발현되었음을 확인하였는데 이는 육안을 통해서도 TCPS에서 배양한 혈관내피세포에 대한 유전자 발현 정도와 유사한 것을 관찰할 수 있었고 이를 통해서 해당 나노섬유 지지체 위에서 혈관세포가 자신의 기능성을 유지하며 잘 증식하고 있다는 것을 확인하였다. 반면 섬유아세포에 대한 유전자 발현 여부를 보았을 때 GAPDH는 발현이 된 반면 내피세포에 특정적으로 존재하는 유전자에 대해서는 발현이 되지 않은 것을 관찰함으로써 CD31, vWF가 특정 세포에만 발현되는 유전자라는 것을 확인할 수 있었다.

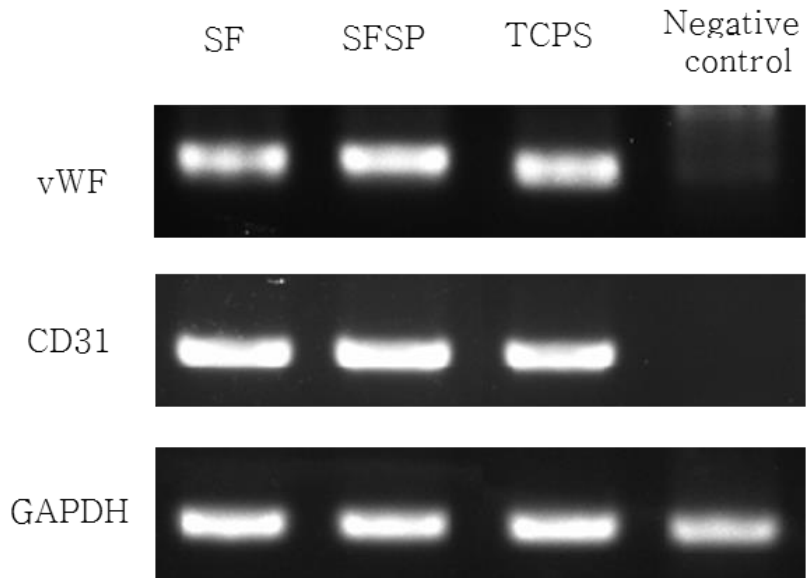


Figure 25. RT-PCR results for expression of vWF and CD31 in HUVEC cells after 6 days cultured on SF and SFSP nanofiber scaffolds (fibroblast cell was used as negative control to expression of HUVEC cell)

제 5 장 결 론

SF와 PCL 나노섬유로 구성된 3층구조의 소구경(내경 1.5mm) 혈관형 지지체를 제조하여 구조 특성, 역학적 성질 및 세포적합성을 측정함으로써 혈관 조직공학분야로의 적용 가능성을 살펴보았다. 내부층은 항혈전성을 갖는 SP 함유 SF 나노섬유로 구성되었고 외부층은 역학적 성질이 우수한 PCL 나노섬유, 그리고 내·외부층을 연결하는 중간층은 그 조성비를 달리한 SF/PCL 블렌드 나노섬유로 구성되도록 설계하였다. 매트 형태 및 혈관 형태의 SF/PCL 복합 나노섬유 지지체를 제조하여 형태학적 구조, 물성, 역학적 성질 및 생물학적 성능 평가를 행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 내부층, 외부층, 중간층을 구성하고 있는 3층구조 혈관형 지지체의 각 층별로 매트 형태의 나노섬유를 제작하여 구조 특성 및 인장 성질을 측정한 결과, 200~400nm의 섬유직경을 갖는 나노섬유 집합체로 구성되어 있음이 관찰되었으며 FT-IR과 DSC 분석을 통해 SF와 PCL의 특징적인 피크를 확인하였고 SF/PCL 블렌드 나노섬유의 인장성질을 측정한 결과 PCL 함량이 증가함에 따라 절단 신도가 현저히 증가하는 경향을 나타냈다. 특히 습윤 상태에서는 PCL을 함유함에 따라 절단 강도, 신도, 영률 모두 현저히 향상되는 결과를 보였다.
2. SF/PCL 블렌드 나노섬유로 구성된 중간층을 도입하여 제조한 3층구조 혈관형 지지체의 단면 형태학적 구조를 FE-SEM을 통해서 살펴본 결과 중간층을 삽입하지 않은 시료와 비교하였을

때 내부층과 외부층의 층간 박리가 감소하였으며 단면에 대한 형태 안정성 또한 향상된 모습을 확인하였다. 특히 중간층의 SF/PCL 조성비가 동일한 Triple22 시료에서 층간 박리가 최소화된 모습을 확인하였으며 이에 따른 형태 안정성은 우수한 인장 성질을 야기시키는 구조적 요인으로 작용할 수 있다.

3. 습윤 상태에서 3층구조 혈관형 지지체의 길이방향 및 원주방향 인장강도, 터짐 압력 강도 및 봉합 유지 강도를 측정하여 지지체의 역학적 특성을 생체 혈관 조직과 비교하였다. 인장 시험 결과, 3층구조 지지체에 있어서 길이방향으로의 파단은 내부층, 중간층, 외부층 순으로 단계적으로 진행되었으며 PCL 함유뿐만 아니라 중간층의 도입으로 인한 절단 강도 및 영률의 증가가 현저히 나타났다. 터짐 압력 강도 및 봉합 유지 강도 또한 중간층을 구성하는 SF/PCL 조성비에 관계없이 SF 자체 혈관형 지지체와는 비교할 수 없을 만큼 매우 우수한 성능을 보였고 생체 혈관과 비교하여도 떨어지지 않는 매우 우수한 역학적 성질을 갖고 있는 것으로 확인되었다.
4. $TNF-\alpha$ assay를 통해서 지지체가 세포 독성을 갖지 않는다는 것을 확인하였다. 또한 MTT assay를 통한 세포 증식능과 세포의 형태학적 구조를 측정한 결과, HUVEC의 경우는 SP 함유 SF 나노섬유에서 높은 증식률을 보였을 뿐만 아니라 세포의 초기 부착 거동에 있어서도 나노섬유 지지체에 잘 뻗어서 증식하는 것을 확인하였다. 또한 PCR을 통한 세포의 유전자 발현 분석 결과로는 SP 함유 SF 나노섬유에서의 유전자 발현 정도가 양성대조군인 TCPS와 유사한 것을 확인하였다.

따라서 SF와 PCL로 구성된 3층구조 혈관형 나노섬유 지지체는 SF 나노섬유 내부층과 PCL 나노섬유 외부층 외에 중간층을 도입함으로써 형태학적 구조의 안정성을 증진시킬 뿐만 아니라 역학적 성질 또한 향상시키는 결과를 나타냈고 세포 부착 및 증식능에도 특이성을 나타냈으므로 혈관 조직공학 분야에 적용 가능성이 매우 높은 것으로 사료된다.

참고 문헌

- [1] Marelli B, Alessandrino A, Farè S, Freddi G, Mantovani D, and Tanzi MC, Compliant Electrospun Silk Fibroin Tubes for Small Vessel Bypass Grafting. *Acta Biomaterialia* 6, 10, 4019–4026 (2010)
- [2] Bergmeister H, Schreiber C, Grasl C, Walter I, Plasenzotti R, Stoiber M, Bernhard D, and Schima H, Healing Characteristics of Electrospun Polyurethane Grafts with Various Porosities. *Acta Biomaterialia* 9, 4, 6032–6040 (2013)
- [3] Lu G, Cui S-J, Geng X, Ye L, Chen B, Feng Z-G, Zhang J, and Li Z-Z, Design and Preparation of Polyurethane–Collagen/Heparin–Conjugated Polycaprolactone Double–Layer Bionic Small–Diameter Vascular Graft and Its Preliminary Animal Tests. *Chinese Medical Journal* 126, 7, 1310–1316 (2013)
- [4] McClure MJ, Sell SA, Simpson DG, and Bowlin GL, Electrospun Polydioxanone, Elastin, and Collagen Vascular Scaffolds: Uniaxial Cyclic Distension. *Journal of Engineered Fabrics & Fibers (JEFF)* 4, 2, (2009)
- [5] Huang C, Wang S, Qiu L, Ke Q, Zhai W, and Mo X, Heparin Loading and Pre–Endothelialization in Enhancing the Patency Rate of Electrospun Small–Diameter Vascular Grafts in a Canine Model. *ACS Applied Materials & Interfaces* 5, 6, 2220–2226 (2013)
- [6] He W, Hu Z, Xu A, Liu R, Yin H, Wang J, and Wang S, The Preparation and Performance of a New Polyurethane Vascular Prosthesis. *Cell Biochemistry and Biophysics* 66, 3, 855–866 (2013)

- [7] Lee SJ, Liu J, Oh SH, Soker S, Atala A, and Yoo JJ, Development of a Composite Vascular Scaffolding System That Withstands Physiological Vascular Conditions. *Biomaterials* 29, 19, 2891–2898 (2008)
- [8] Ghezzi CE, Marelli B, Muja N, and Nazhat SN, Immediate Production of a Tubular Dense Collagen Construct with Bioinspired Mechanical Properties. *Acta Biomaterialia* 8, 5, 1813–1825 (2012)
- [9] Vaz C, Van Tuijl S, Bouten C, and Baaijens F, Design of Scaffolds for Blood Vessel Tissue Engineering Using a Multi-Layering Electrospinning Technique. *Acta Biomaterialia* 1, 5, 575–582 (2005)
- [10] Maidoub H, Ben Mansour M, Chaubet F, Roudesli MS, and Maaroufi RM, Anticoagulant Activity of a Sulfated Polysaccharide from the Green Alga *Arthrospira Platensis*. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1790, 10, 1377–1381 (2009)
- [11] Son M-H, Park K-H, Choi A-R, Yoo G-J, In M-J, Kim D-H, and Chae H-J, Investigation of Biological Activities of Enzymatic Hydrolysate of Spirulina. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* 38, 2, 136–141 (2009)
- [12] Cha BG, Kwak HW, Park AR, Kim SH, Park SY, Kim HJ, Kim IS, Lee KH, and Park YH, Structural Characteristics and Biological Performance of Silk Fibroin Nanofiber Containing Microalgae Spirulina Extract. *Biopolymers* 101, 4, 307–318 (2014)
- [13] Marieb EN 저, 최명애 외 6인 역, 인체 구조와 기능. 2006, 서울, 대한민국, 계축문화사, 530–532.
- [14] 아사노고로 저, 김종대, 주경복 역, 우리 몸 사전. 2005, 서울,

대한민국, 북스힐, 278–281.

[15] Patton K, Thibodeau G, Douglas M 저, 최명애 외 8인 역, 인체의 구조와 기능. 2011, 서울, 대한민국, 엘스비어코리아, 377–380.

[16] Stegemann JP, Kaszuba SN, and Rowe SL, Review: Advances in Vascular Tissue Engineering Using Protein-Based Biomaterials. *Tissue Engineering* 13, 11, 2601–2613 (2007)

[17] Del Gaudio C, Ercolani E, Galloni P, Santilli F, Baiguera S, Polizzi L, and Bianco A, Aspirin-Loaded Electrospun Poly (*ε*-Caprolactone) Tubular Scaffolds: Potential Small-Diameter Vascular Grafts for Thrombosis Prevention. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 24, 2, 523–532 (2013)

[18] Blit PH, Battiston KG, Yang M, Paul Santerre J, and Woodhouse KA, Electrospun Elastin-Like Polypeptide Enriched Polyurethanes and Their Interactions with Vascular Smooth Muscle Cells. *Acta Biomaterialia* 8, 7, 2493–2503 (2012)

[19] Andukuri A, Kushwaha M, Tambralli A, Anderson JM, Dean DR, Berry JL, Sohn YD, Yoon Y-S, Brott BC, and Jun H-W, A Hybrid Biomimetic Nanomatrix Composed of Electrospun Polycaprolactone and Bioactive Peptide Amphiphiles for Cardiovascular Implants. *Acta Biomaterialia* 7, 1, 225–233 (2011)

[20] Mckenna KA, Hinds MT, Sarao RC, Wu P-C, Maslen CL, Glanville RW, Babcock D, and Gregory KW, Mechanical Property Characterization of Electrospun Recombinant Human Tropoelastin for Vascular Graft Biomaterials. *Acta Biomaterialia* 8, 1, 225–233 (2012)

[21] Browning M, Dempsey D, Guiza V, Becerra S, Rivera J,

- Russell B, Höök M, Clubb F, Miller M, and Fossum T, Multilayer Vascular Grafts Based on Collagen–Mimetic Proteins. *Acta Biomaterialia* 8, 3, 1010–1021 (2012)
- [22] Liu S, Dong C, Lu G, Lu Q, Li Z, Kaplan DL, and Zhu H, Bilayered Vascular Grafts Based on Silk Proteins. *Acta Biomaterialia* 9, 11, 8991–9003 (2013)
- [23] Nguyen T–H and Lee B–T, The Effect of Cross–Linking on the Microstructure, Mechanical Properties and Biocompatibility of Electrospun Polycaprolactone–Gelatin/Plga–Gelatin/Plga–Chitosan Hybrid Composite. *Science and Technology of Advanced Materials* 13, 3, 035002 (2012)
- [24] Wong CS, Liu X, Xu Z, Lin T, and Wang X, Elastin and Collagen Enhances Electrospun Aligned Polyurethane as Scaffolds for Vascular Graft. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 24, 8, 1865–1874 (2013)
- [25] Sell S, McClure MJ, Barnes CP, Knapp DC, Walpoth BH, Simpson DG, and Bowlin GL, Electrospun Polydioxanone–Elastin Blends: Potential for Bioresorbable Vascular Grafts. *Biomedical Materials* 1, 2, 72 (2006)
- [26] Xiao S, Xu W, and Ma H, Fabrication and Characterization of Mechano–Modulated Pet/Bpu Nanofibrous Mats as Potential Vascular Grafts Materials. *Fibers and Polymers* 13, 5, 618–625 (2012)
- [27] Pignatello R, Biomaterials Science and Engineering. 2011, Rijeka, Croatia, InTech., 424
- [28] Holzwarth JM and Ma PX, Biomimetic Nanofibrous Scaffolds

for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials* 32, 36, 9622–9629 (2011)

[29] Zhu H, Liu N, Feng X, and Chen J, Fabrication and Characterization of Silk Fibroin/Bioactive Glass Composite Films. *Materials Science and Engineering: C* 32, 4, 822–829 (2012)

[30] Kim HI, Matsuno R, Seo J–H, Konno T, Takai M, and Ishihara K, Preparation of Electrospun Poly (L–Lactide–Co–Caprolactone–Co–Glycolide)/Phospholipid Polymer/Rapamycin Blended Fibers for Vascular Application. *Current Applied Physics* 9, 4, e249–e251 (2009)

[31] Liu B, Xu F, Guo M–Y, Chen S–F, Wang J, and Zhang B, Electrospun Plla Fibers Coated with Chitosan/Heparin for Scaffold of Vascular Tissue Engineering. *Surface and Coatings Technology* 228, S568–S573 (2013)

[32] Wang S and Zhang Y, Preparation, Structure, and in Vitro Degradation Behavior of the Electrospun Poly (Lactide–Co–Glycolide) Ultrafine Fibrous Vascular Scaffold. *Fibers and Polymers* 13, 6, 754–761 (2012)

[33] Ferrand A, Eap S, Richert L, Lemoine S, Kalaskar D, Demoustier-Champagne S, Atmani H, Mély Y, Fioretti F, and Schlatter G, Osteogenetic Properties of Electrospun Nanofibrous Pcl Scaffolds Equipped with Chitosan-Based Nanoreservoirs of Growth Factors. *Macromolecular Bioscience* 14, 1, 45–55 (2014)

[34] Xie J, Macewan MR, Liu W, Jesuraj N, Li X, Hunter D, and Xia Y, Nerve Guidance Conduits (Ngcs) Based on Double–Layered Scaffolds of Electrospun Nanofibers for Repairing the Peripheral

Nervous System. *ACS Applied Materials & Interfaces* 6, 12, 9472–9480 (2014)

[35] Uppal R, Ramaswamy GN, Arnold C, Goodband R, and Wang Y, Hyaluronic Acid Nanofiber Wound Dressing—Production, Characterization, and in Vivo Behavior. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 97, 1, 20–29 (2011)

[36] Park SY, Ki CS, Park YH, Lee KG, Kang SW, Kweon HY, and Kim HJ, Functional Recovery Guided by an Electrospun Silk Fibroin Conduit after Sciatic Nerve Injury in Rats. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* , in press

[37] Park SY, Ki CS, Park YH, Jung HM, Woo KM, and Kim HJ, Electrospun Silk Fibroin Scaffolds with Macropores for Bone Regeneration: An in Vitro and in Vivo Study. *Tissue Engineering Part A* 16, 4, 1271–1279 (2010)

[38] Liu X, Lin T, Gao Y, Xu Z, Huang C, Yao G, Jiang L, Tang Y, and Wang X, Antimicrobial Electrospun Nanofibers of Cellulose Acetate and Polyester Urethane Composite for Wound Dressing. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 100, 6, 1556–1565 (2012)

[39] Blakeney BA, Tambralli A, Anderson JM, Andukuri A, Lim D–J, Dean DR, and Jun H–W, Cell Infiltration and Growth in a Low Density, Uncompressed Three–Dimensional Electrospun Nanofibrous Scaffold. *Biomaterials* 32, 6, 1583–1590 (2011)

[40] Lovett M, Cannizzaro C, Daheron L, Messmer B, Vunjak–Novakovic G, and Kaplan DL, Silk Fibroin Microtubes for Blood Vessel Engineering. *Biomaterials* 28, 35, 5271–5279 (2007)

- [41] Yang H, Xu W, Ouyang C, Zhou F, Cui W, and Yi C, Circumferential Compliance of Small Diameter Polyurethane Vascular Grafts Reinforced with Elastic Tubular Fabric. *Fibres & Textiles in Eastern Europe* 17, 6, 89–92 (2009)
- [42] Nakazawa Y, Sato M, Takahashi R, Aytemiz D, Takabayashi C, Tamura T, Enomoto S, Sata M, and Asakura T, Development of Small-Diameter Vascular Grafts Based on Silk Fibroin Fibers from Bombyx Mori for Vascular Regeneration. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 22, 1–3, 195–206 (2011)
- [43] Lai ES, Anderson CM, and Fuller GG, Designing a Tubular Matrix of Oriented Collagen Fibrils for Tissue Engineering. *Acta Biomaterialia* 7, 6, 2448–2456 (2011)
- [44] Diban N, Haimi S, Bolhuis-Versteeg L, Teixeira S, Miettinen S, Poot A, Grijpma D, and Stamatialis D, Hollow Fibers of Poly (Lactide-Co-Glycolide) and Poly (E-Caprolactone) Blends for Vascular Tissue Engineering Applications. *Acta Biomaterialia* 9, 5, 6450–6458 (2013)
- [45] Uchida T, Ikeda S, Oura H, Tada M, Nakano T, Fukuda T, Matsuda T, Negoro M, and Arai F, Development of Biodegradable Scaffolds Based on Patient-Specific Arterial Configuration. *Journal of Biotechnology* 133, 2, 213–218 (2008)
- [46] Wang H, Feng Y, Fang Z, Yuan W, and Khan M, Co-Electrospun Blends of Pu and Peg as Potential Biocompatible Scaffolds for Small-Diameter Vascular Tissue Engineering. *Materials Science and Engineering: C* 32, 8, 2306–2315 (2012)
- [47] Stitzel J, Liu J, Lee SJ, Komura M, Berry J, Soker S, Lim G,

- Van Dyke M, Czerw R, and Yoo JJ, Controlled Fabrication of a Biological Vascular Substitute. *Biomaterials* 27, 7, 1088–1094 (2006)
- [48] Yin A, Zhang K, McClure MJ, Huang C, Wu J, Fang J, Mo X, Bowlin GL, Al-Deyab SS, and El-Newehy M, Electrospinning Collagen/Chitosan/Poly (L-Lactic Acid-Co- ϵ -Caprolactone) to Form a Vascular Graft: Mechanical and Biological Characterization. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 101, 5, 1292–1301 (2013)
- [49] Bonani W, Maniglio D, Motta A, Tan W, and Migliaresi C, Biohybrid Nanofiber Constructs with Anisotropic Biomechanical Properties. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 96, 2, 276–286 (2011)
- [50] Thomas V, Zhang X, and Vohra YK, A Biomimetic Tubular Scaffold with Spatially Designed Nanofibers of Protein/Pds® Bio-Blends. *Biotechnology and Bioengineering* 104, 5, 1025–1033 (2009)
- [51] McClure MJ, Simpson DG, and Bowlin GL, Tri-Layered Vascular Grafts Composed of Polycaprolactone, Elastin, Collagen, and Silk: Optimization of Graft Properties. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 10, 48–61 (2012)
- [52] Chu W-L, Lim Y-W, Radhakrishnan AK, and Lim P-E, Protective Effect of Aqueous Extract from *Spirulina Platensis* against Cell Death Induced by Free Radicals. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 10(2010)
- [53] Han F, Jia X, Dai D, Yang X, Zhao J, Zhao Y, Fan Y, and Yuan X, Performance of a Multilayered Small-Diameter Vascular Scaffold Dual-Loaded with Vegf and Pdgf. *Biomaterials* 34, 30, 7302–7313 (2013)

- [54] Nieponice A, Soletti L, Guan J, Deasy BM, Huard J, Wagner WR, and Vorp DA, Development of a Tissue-Engineered Vascular Graft Combining a Biodegradable Scaffold, Muscle-Derived Stem Cells and a Rotational Vacuum Seeding Technique. *Biomaterials* 29, 7, 825-833 (2008)
- [55] Du F, Zhao W, Zhang M, Mao H, Kong D, and Yang J, The Synergistic Effect of Aligned Nanofibers and Hyaluronic Acid Modification on Endothelial Cell Behavior for Vascular Tissue Engineering. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 11, 8, 6718-6725 (2011)
- [56] He W, Yong T, Teo WE, Ma Z, and Ramakrishna S, Fabrication and Endothelialization of Collagen-Blended Biodegradable Polymer Nanofibers: Potential Vascular Graft for Blood Vessel Tissue Engineering. *Tissue Engineering* 11, 9-10, 1574-1588 (2005)
- [57] Doshi H, Ray A, and Kothari I, Biosorption of Cadmium by Live and Dead Spirulina: Ir Spectroscopic, Kinetics, and Sem Studies. *Current Microbiology* 54, 3, 213-218 (2007)
- [58] Pugazhendy K, Fourier Transform Infrared Ft-Ir Spectroscopic Analysis of Spirulina. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive* 3, 4, 969-972 (2012)
- [59] Elzein T, Nasser-Eddine M, Delaite C, Bistac S, and Dumas P, Ftir Study of Polycaprolactone Chain Organization at Interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* 273, 2, 381-387 (2004)
- [60] Zhou W, He J, Du S, Cui S, and Gao W, Electrospun Silk Fibroin/Cellulose Acetate Blend Nanofibres: Structure and Properties.

Iran Polym J 20, 5, 389–397 (2011)

[61] Zoccola M, Aluigi A, Vineis C, Tonin C, Ferrero F, and Piacentino MG, Study on Cast Membranes and Electrospun Nanofibers Made from Keratin/Fibroin Blends. *Biomacromolecules* 9, 10, 2819–2825 (2008)

[62] Rosa D, Lopes D, and Calil M, Thermal Properties and Enzymatic Degradation of Blends of Poly (*E*-Caprolactone) with Starches. *Polymer Testing* 24, 6, 756–761 (2005)

[63] Sarasam A and Madihally SV, Characterization of Chitosan–Polycaprolactone Blends for Tissue Engineering Applications. *Biomaterials* 26, 27, 5500–5508 (2005)

[64] Minoura N, Tsukada M, and Nagura M, Physico–Chemical Properties of Silk Fibroin Membrane as a Biomaterial. *Biomaterials* 11, 6, 430–434 (1990)

[65] Lehoux S and Tedgui A, Cellular Mechanics and Gene Expression in Blood Vessels. *Journal of Biomechanics* 36, 5, 631–643 (2003)

[66] Sarkar S, Salacinski H, Hamilton G, and Seifalian A, The Mechanical Properties of Infrainguinal Vascular Bypass Grafts: Their Role in Influencing Patency. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 31, 6, 627–636 (2006)

[67] Billiar K, Murray J, Laude D, Abraham G, and Bachrach N, Effects of Carbodiimide Crosslinking Conditions on the Physical Properties of Laminated Intestinal Submucosa. *Journal of Biomedical Materials Research* 56, 1, 101–108 (2001)

[68] Konig G, Mcallister TN, Dusserre N, Garrido SA, Iyican C,

Marini A, Fiorillo A, Avila H, Wystrychowski W, and Zagalski K, Mechanical Properties of Completely Autologous Human Tissue Engineered Blood Vessels Compared to Human Saphenous Vein and Mammary Artery. *Biomaterials* 30, 8, 1542–1550 (2009)

[69] Kottk–Marchant K, Veenstra AA, and Marchant R, Human Endothelial Cell Growth and Coagulant Function Varies with Respect to Interfacial Properties of Polymeric Substrates. *Journal of Biomedical Materials Research* 30, 2, 209–218 (1996)

[70] Asran AS, Razghandi K, Aggarwal N, Michler GH, and Groth T, Nanofibers from Blends of Polyvinyl Alcohol and Polyhydroxy Butyrate as Potential Scaffold Material for Tissue Engineering of Skin. *Biomacromolecules* 11, 12, 3413–3421 (2010)

[71] Altankov G, Richau K, and Groth T, The Role of Surface Zeta Potential and Substratum Chemistry for Regulation of Dermal Fibroblasts Interaction. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* 34, 12, 1120–1128 (2003)

[72] Murphy–Ullrich JE, The De–Adhesive Activity of Matricellular Proteins: Is Intermediate Cell Adhesion an Adaptive State? *Journal of Clinical Investigation* 107, 7, 785–790 (2001)

[73] Liu H, Li X, Zhou G, Fan H, and Fan Y, Electrospun Sulfated Silk Fibroin Nanofibrous Scaffolds for Vascular Tissue Engineering. *Biomaterials* 32, 15, 3784–3793 (2011)

Abstract

Structure, mechanical property, and cytocompatibility of tri-layered nanofiber scaffold composed of silk fibroin and poly(ϵ -caprolactone) for vascular graft

A Reum Park

Major in Biomaterials Engineering

Department of Biosystems & Biomaterials Science and Engineering

The Graduate School

Seoul National University

In this study, tri-layered nanofiber scaffold of silk fibroin(SF) and poly(ϵ -caprolactone)(PCL), composed of inner, middle, and outer layer, was fabricated using sequential electrospinning method for examining its possible application in vascular tissue engineering. The middle layer of SF/PCL blend nanofiber was introduced to minimize delamination of each layer of the scaffold while the inner layer was composed of SF nanofiber and the outer layer was of PCL nanofiber. The 2-dimensional(2D) mat type as well as 3D tubular type scaffold(1.5mm of inner diameter and 200 μ m of thickness)

was fabricated and structure, mechanical property, and cytocompatibility were evaluated. Morphological structure of each layer and delamination between the layers of the scaffold were examined using FE-SEM. As a result of mechanical test, the tri-layered nanofiber scaffold with middle layer of SF/PCL blend nanofiber showed excellent longitudinal and circumferential tensile strength, burst pressure strength, and suture retention strength, which are comparable to those of human carotid artery and saphenous vein. No cytotoxicity was observed for the scaffolds, and MTT assay showed that a higher cell proliferation of HUVEC cells was observed for the inner layer(SFSP nanofiber), while that of fibroblast cells was for the outer layer(PCL nanofiber) of the scaffold. Especially, gene expression of HUVEC cells on the inner layer was comparable to positive control. Therefore, the tri-layered tubular type SF/PCL nanofiber scaffold, which is composed of SF/PCL blend nanofiber in middle layer, has a high potential for applying to vascular tissue engineering due to its excellent mechanical property and good cytocompatibility in vitro.

Keywords: Silk Fibroin, Poly(ϵ -caprolactone), Nanofiber, Tri-layer, Scaffold, Vascular tissue engineering

Student Number: 2012-23357