

전기방사 나노섬유막을 이용한 배양 피부대체물의 제조 및 평가 Electrospun Nanofibrous Membranes for the Engineering of Cultured Skin Substitutes

박시내 · 김정환 · 김일훈 · 설아람 · 서 활*

Si-Nae Park, Jeong Hwan Kim, Il Hoon Kim, Ah Ram Sul, and Hwal Suh*

연세대학교 의과대학 의학공학교실

Department of Medical Engineering, Yonsei University College of Medicine, Seoul 120-752, Korea

(Received March 7, 2006/Accepted May 17, 2006)

In this study, nanofibrous membranes from biodegradable PLGA and collagen were fabricated to mimic natural extracellular matrix (ECM) and investigated on the morphology, conformational stability, cytotoxicity and cell attachment. The effect of PLGA or collagen nanofibrous membranes incorporating human dermal fibroblasts on wound healing was also evaluated using an *in vivo* full thickness dermal defect model. The circular dichroism measurements showed that electrospun collagen maintained its triple helix structure. In cytotoxicity test using L929 fibroblastic cells, electrospun PLGA or collagen nanofibrous membrane demonstrated no significant toxicity. It was also found that collagen and PLGA nanofibers favored cell attachment and proliferation. *In vivo* testing showed that the regeneration of dermis and epidermis treated with PLGA or collagen nanofibrous membrane incorporating dermal fibroblasts was accelerated. Therefore, this electrospun PLGA or collagen nanofibrous membrane might have potential efficacy in tissue engineering as skin substitutes.

Key words: Skin substitute, Collagen, PLGA, Electrospun nanofiber, Biocompatibility

서 론

1980년대 급속하게 발달하기 시작한 생명공학기술의 발전은 손상된 인체 조직을 인공적으로 수복, 재생하는 기술로 이용되기 시작하여, 최근 조직공학 기술의 발달로 체외 조직배양을 통한 인공피부, 인공연골, 인공간, 인공혈관 등이 실용화되고 있는 등 다양한 조직공학제품이 연구 및 생산에 들어가는 단계에 있다.¹⁻⁴⁾

특히 매년 수백만명이 발생하는 화상환자 및 당뇨 등으로 인한 피부 궤양 환자에게 적용할 수 있는 인공 피부 제품은 손상 피부의 재생 및 회복에 매우 효과적임이 밝혀짐에 따라 인공피부 제품의 지속적인 개발 및 상용화가 촉진되고 있다.⁵⁾

인공피부를 통한 손상 피부 치료법은 현재 사용되고 있는 일반 치료법에 비해 창상의 완전한 치유에 요구되는 공여 부위 면적의 감소, 수술 procedure 및 입원 기간 감소, 흉터 감소 등 환자의 편의 및 의료비 면에 많은 이점을 가져올 수 있다.^{6,7)} 특히 자가 혹은 타가 각질세포와 진피섬유아세포, 콜라겐, 히알루론산과 같은 생물학적 매트릭스 등을 이용하여 제조되는 조직공학적인 인공피부는 넓은 부위의 피부 손상을 치료해 줄 수 있는 방법으로 소개되어 현재 널리 연구되고 있다.⁸⁾ 현

재 조직공학적인 제품에 사용되는 재료로서 생체 조직 가공물 및 타가 세포의 사용이 빈번하다. 현재 체내 사용이 허가되어 있는 합성 고분자 재료의 안전성 뿐만 아니라 이종(xenogenic) 혹은 타가 조직으로부터의 추출된 천연 고분자의 생체 내 안전성, 자가 혹은 세포은행으로부터 제공받은 타가세포의 배양과정에서의 미생물오염 등에 대한 안전성 평가가 요구되고 있다.

따라서 본 연구에서는 국내·외에서 이용되고 있는 대표적인 의료용 고분자 소재인 poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA)와 제 1형 아텔로콜라겐을 전기방사하여 각각 나노섬유막을 제조하고 피부조직의 치환 및 재생을 유도하기 위해 진피섬유아세포를 함께 배양한 나노섬유 기반 인공피부의 체외 및 체내 안전성을 평가하기 위한 실험을 수행하였다.

재료와 방법

PLGA 나노섬유막의 제조

PLGA (LA:GA=75:25, Mw. 90,000-126,000)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며 PLGA 나노섬유막의 제조를 위하여 PLGA(LA:GA=75:25)를 10 ml의 methylene chloride에 35% w/v로 녹인 후 유기용매 필터를 이용하여 여과한 후 총 8 ml의 양을 18 gauge

*책임연락처: hwal@yumc.yonsei.ac.kr

needle을 끼운 10.0 ml syringe에 넣어 전기방사에 사용하였다. 전기방사는 전압 25 kV, 유속 2.5 ml/h, metal collector의 회전속도 300 rpm, spinneret과 metal collector와의 거리 15 cm, 그리고 metal collector의 폭은 2 cm의 조건에서 NanoNC (Seoul, Korea)에서 제조한 전기방사 시스템을 이용하여 시행하였다. 제조된 나노섬유를 진공오븐에서 48시간 동안 건조하여 잔류 유기용매를 제거하고 ion sputter (E1010, HITACHI, Tokyo, Japan) 내에서 300 Å의 두께로 gold/Pt 코팅한 후 시차주사현미경(S-800, HITACHI, Tokyo, Japan)을 이용하여 형태 및 구조를 관찰하였다.

콜라겐 나노섬유막의 제조

제1형 아텔로콜라겐은 Suh 등의 방법을 이용하여 소 피부로부터 추출하였다.⁹⁾ 제1형 아텔로콜라겐 용액은 건조된 제1형 아텔로콜라겐을 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFP)에 7%의 농도로 녹인 후 유기 용매 필터로 여과하여 제조하였다. 이후 콜라겐용액을 18 gauge needle을 끼운 5.0 ml syringe에 채운 후 syringe pump를 통해 PLGA 나노섬유 제조 조건과 같은 조건에서 전기방사하였다. 제조된 콜라겐 나노섬유는 12시간 동안 50 mM 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide (EDC) solution (EtOH: H₂O=95:5) 용액에서 가교시킨 후 세척하였다. 세척된 섬유 다발은 충분한 시간 동안 동결건조기를 이용하여 동결 건조 한 후, PLGA 나노섬유와 같은 방법으로 시차주사현미경을 이용하여 형태 및 구조를 관찰하였다.

콜라겐 나노섬유의 Circular Dichroism (CD) 분석

아텔로콜라겐의 triple helix 구조가 전기방사 및 화학적 가교화 이후에 유지되었는지를 확인하기 위해 CD 분석을 이용하였다. 비처리 아텔로콜라겐과 나노섬유 형태로 제조된 아텔로콜라겐의 CD spectra는 0.01 cm length thermostated cuvette과 Neslab RTE-111 thermostat을 이용하여 Jasco J-715 dicrograph (Jasco Corp, Tokyo, Japan)로 측정하였다. 각 시편을 3 mg/ml의 농도로 0.001 N HCl에 용해시킨 후, 25°C에서 가열해놓은 CD cuvette에 넣고 30분 경과 후 시료에 대한 CD spectra를 기록하였다. 시편(단백질)의 양은 Bradford method를 사용하여 결정하였다.¹⁰⁾

세포독성시험

PLGA 나노섬유막과 가교화된 아텔로콜라겐 나노섬유막의 세포독성 유무를 확인하기 위하여 직접접촉법에 의한 세포독성시험을 실시하였다.¹¹⁻¹³⁾ 먼저 L929 섬유아세포 (ATCC CCL1, NCTC clone 929, from mouse connective tissue)을 6-well plate에 농도가 2×10^5 cells/well 되도록 plating하고, 600 μ l의 10% 태아우혈청 (JBI Inc, Daejeoun, Korea)을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (JBI Inc, Daejeoun, Korea)을 공급하면서 2일 동안 $37 \pm 2^\circ\text{C}$, 5% CO₂, 99% humidity 조건으로 배양시켰다. 그 위에 1

Table 1. Zone description

Zone Index	Description of Zone
0	No detectable zone around or under specimen
1	Zone limited to area under specimen
2	Zone extends less than 0.5cm beyond specimen
3	Zone extends 0.5-1.0 cm beyond specimen
4	Zone extends greater than 1.0 cm beyond specimen but does not involve entire dish
5	Zone involves entire dish

cm × 1 cm 크기의 나노섬유막을 얹고, 배지를 새로 넣은 다음, 같은 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 0.2% crystal violet으로 염색하여 세포의 성장이 억제된 zone size를 측정하였다 (Table 1). 음성대조군과 양성대조군으로서 high-density polyethylene (HDPE) 필름과 Latex 필름을 각각 사용하였다.

세포배양

콜라겐 나노섬유막과 PLGA 나노섬유막 위에 점착 및 배양시킬 세포로서 연세대학교의 The Medical Material Control and Management Committee로부터 허가를 얻어 연세의료원 성형외과로부터 공급받은 인간 섬유아세포를 이용하였다. 인간 진피 섬유아세포는 175 cm² 조직배양 플라스크(NUNC, Roskilde, Denmark)에서 1% 페니실린/스트렙토마이신/암포테리신-B (penicillin/streptomycin/amphotericin-B), 10% 태아우혈청 (JBI Inc, Daejeoun, Korea)을 함유한 DMEM (JBI Inc, Daejeoun, Korea) 성장배지를 이용하여 세포를 배양하였다. 배양은 $37 \pm 2^\circ\text{C}$, 5% CO₂, 99% humidity 환경이 유지되는 배양기에서 이루어졌다. 본 실험을 위해 5와 7 passage 사이의 섬유아세포가 사용되었다.

세포점착성 실험을 위해 1 cm × 1 cm 크기의 PLGA 나노섬유막과 가교화된 콜라겐 나노섬유막을 1×10^7 의 섬유아세포를 함유한 80 ml의 배지가 들어있는 각각의 spinner 형 플라스크에서 60 rpm의 속도로 교반하면서 8시간동안 세포점착을 유도하였다.

세포의 부착능 및 증식능은 교반 배양 이후 0시간, 4시간 및 24시간이 지났을 때 3-(4, 5-dimethylthiazolyl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay¹⁴⁾법에 의해 ELISA reader (Spectra Max 340, Molecular Device Inc. CA, USA)로 측정되었다. 통계학적 유의성은 Student's t-test를 통하여 평가하였다.

PCR 기법을 이용한 Mycoplasma 검사

PLGA 나노섬유막과 콜라겐 나노섬유막에서 세포를 배양한 후 PCR assay kit (Mycosensor™ PCR Assay Kit, Stratagene, La Jolla, CA, USA)을 이용하여 mycoplasma 오염 여부를 측정하였다. 먼저 세포 배양액 100 μ l를 microcentrifuge tube에서 5분간 끓이고 60초간 원심분리한 후 Manual에 따라 template을 준비하였다. PCR amplification을 위해 5 μ l의 sample template, kit에서 제공하는 양성 대조군 또는 음성대

조균 (증류수)을 $MgCl_2$ (최종농도 20 mM), $10\times$ Tag reaction buffer 5 μ l, dNTP/dUTP mix 1 μ l, Mycoplasma primer mix 2 μ l, Internal control template 4 μ l, Tag DNA polymerase 2.5 U 및 멸균수를 포함하는 45 μ l의 reaction mixture에 가하였다. PCR 프로그램의 thermal profile은 $94^\circ C$ 에서 30초간 denaturation, $55^\circ C$ 에서 1분간 primer annealing, $72^\circ C$ 에서 1분간 primer extension으로 구성되어 각각 35 cycle씩 실시하였다. 이후 반응물은 2% agarose gel을 이용한 전기영동에 사용되었고, gel 상에 나타난 banding pattern을 분석하였다.

동물이식시험

섬유아세포가 배양된 PLGA 나노섬유막과 콜라겐 나노섬유막을 각각 15마리의 athymic mice (BALB/c-nu)에 이식 후 이식재와 host cells와의 상호작용 및 분해거동을 평가하고자 하였다. 이를 위해 약 6-8 주령의 athymic mice (NIH Swiss nude) (24-32 g)를 ketamine과 xylazine (각각 200 μ g/g과 10 μ g/g)로 마취시킨 후, 각 동물의 등 중앙부위에 약 1 cm^2 직경의 full-thickness skin wound를 만들고 제조된 나노섬유막을 손상부위에 수술실로 고정하였다. 이후 투명 필름 (TegadermTM, 3M, St. Paul, MN, USA)으로 수술 부위를 감쌌다. 모든 동물 실험은 연세대학교의 the Guidelines and Regulations for Use and Care of Animals에 따라 시행되었다.

수술 후 7, 14, 21일째에 동물들을 희생시키고 인접 손상시키지 않은 정상피부와 근육층을 포함하여 채취한 후 포르말린 고정, 수세, 파라핀 포매과정을 거쳐 5 μ m 두께로 박절하여 hematoxylin-eosin (H-E) 염색을 통한 조직학적 검사를 시행하였다.

결과 및 고찰

PLGA 나노섬유막과 콜라겐 나노섬유막

지금까지 조직공학적인 이식재의 임상 결과를 향상시키기 위하여 콜라겐, poly (l-lactic acid)와 poly (glycolic acid)등의 재료를 지지체나 합성 매트릭스 구조체로서 이용하는 시도가 있어왔다. 특히 최근에는 인체의 세포외기질 구조를 모방하기 위하여 천연 고분자 용액의 전기방사를 통해 제조된 구조체를 조직공학적으로 이용하는 연구가 활발히 진행되고 있다.¹⁵⁻¹⁷⁾ 본 연구에서는 조직공학적인 인공진피막의 지지체로서 PLGA 나노섬유막과 콜라겐 나노섬유막을 제조하기 위하여 전기방사법을 이용하였다. 예비실험을 통해 3% 농도 이하의 콜라겐 용액은 나노섬유를 형성하지 못하는 것을 확인하였으며 이에 따라 용액의 농도를 결정하였다. 전기방사된 후 각각의 나노섬유막들은 실질적 구조 연결성을 갖고 있기 때문에 metal collector로부터 쉽게 떼어낼 수 있었다. 시차주사현미경을 통한 관찰을 통해 전기방사된 PLGA 섬유막 및 콜라겐 섬유막은 서로 연결되고 교차하는 섬유 네트워크와 공극들로 이루어진 구조를 나

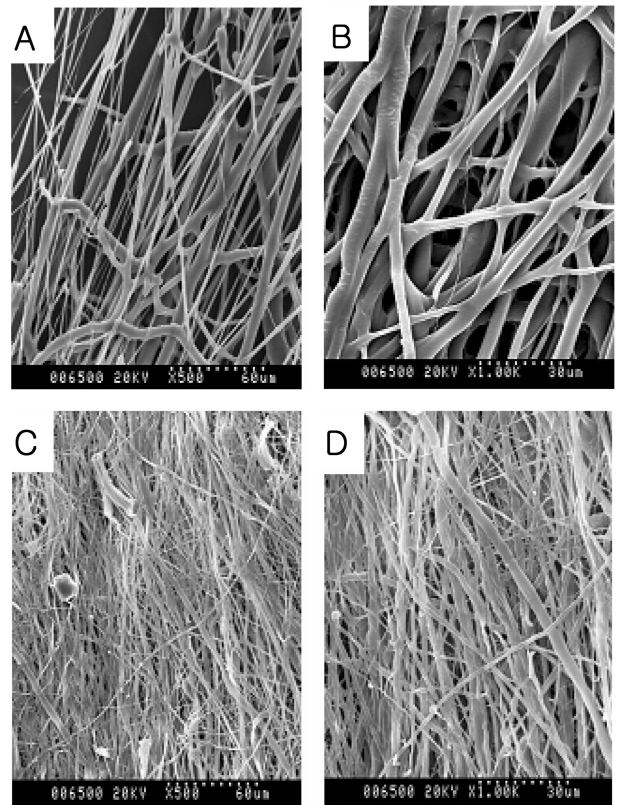


Figure 1. (A and B) Electrospun PLGA collected on a mandrel revolving at 300 RPM (Magnification 500X with the inserted scale bar at 60 microns (A)), (Magnification 100X with the inserted scale bar at 30 microns (B)), (C and D) Electrospun collagen collected on a mandrel revolving at 300 RPM (Magnification 500X with the inserted scale bar at 60 microns (C)), (Magnification 100X with the inserted scale bar at 30 microns (D)).

타내고 있었으며 직경이 각각 0.3-3 μ m 및 0.1-0.5 μ m인 것을 확인하였다(Figure 1(A-D)).

콜라겐의 Triple Helix 구조 확인

콜라겐의 구조는 기본적으로 triple helical structure를 이루고 있으며 이 구조의 유지는 생체 내 세포와의 상호작용 시 매우 중요한 요소로 여겨지고 있다. CD는 단백질 구조에서의 형태적 변화를 연구하기 위해 널리 사용되는 방법이며, 콜라겐 분자의 구조적 folding은 매우 독특하여 CD spectra역시 다른 단백질과 차이를 보인다. 따라서 triple helix 구조의 변화는 CD spectra를 통해 쉽게 관찰될 수 있다. 콜라겐의 CD spectrum에 나타나는 특징은 221 nm에서 보이는 작은 positive band와 197 nm에서 보이는 보다 큰 negative band이다.¹⁸⁾ 본 실험결과에서 나노섬유화 콜라겐은 219 nm에서 $34516 \text{ deg} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$ 크기의 positive peak와 213 nm에서 $140236 \text{ deg} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$ 크기의 negative peak를 나타냈다(Figure 2). 나노섬유화 콜라겐은 비교를 위해 사용된 비처리 콜라겐의 spectrum과 비교하였을 때 molar ellipticity의 강도에서만 차이를 나타냈을 뿐 전체 spectrum은 유사하였

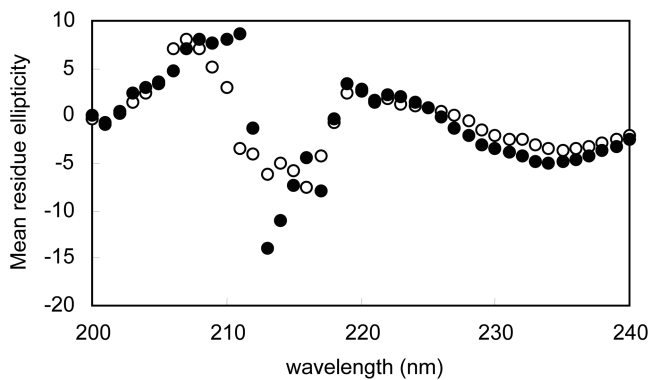


Figure 2. CD spectra of native type I collagen (open circle) and electrospun type I collagen (closed circle).

고 이는 다른 연구들에서의 결과와 일치하는 것이다.¹⁹⁾ 따라서 본 실험을 통하여 전기방사와 화학적 가교화 과정을 거친 콜라겐 분자의 triple helix 구조가 그대로 유지되었다는 것을 확인하였다.

생체 외 세포독성

직접접촉법에 의거하여 인공피부용 재료로 사용된 PLGA 나노섬유막과 콜라겐 나노섬유막의 세포독성 정도를 zone index 로써 살펴보았다. 양성 대조군과 음성 대조군의 zone index 결과를 보면, 적정시험조건에서 실험이 수행되었음을 알 수 있었다(Table 2). 양성대조군인 Latex 필름이 놓인 아랫면과 그 주변의 세포들은 cell lysis가 일어나서 culture dish 바닥면에 붙어있지 못하고 배지위로 떨어져 주변으로 0.45 ± 0.04 cm 크기의 zone이 형성된 반면 HDPE 음성대조군이나 PLGA 나노섬유막 혹은 콜라겐 나노섬유막의 경우에는 배양접시에서 자란 세포들의 모양과 동일한 상태로 필름의 아랫면과 그 주변에 그대로 붙어있으면서 zone을 형성하지 않는 것으로 보아 세포독성이 없는 것으로 확인되었다.

세포 부착능 및 증식능

나노섬유 구조가 세포의 점착과 증식을 유도할 수 있음이 널리 알려져 있으며 이미 많은 이들이 PLGA, Polycaprolactone (PCL) 등의 합성 고분자 또는 천연 고분자로 이루어진 나노섬유 상에서 섬유세포, 연골세포, 골수 유래 줄기세포 등을 배양하는 시도를 하였다.²⁰⁻²²⁾ 한편 Schindler, M. et al.은 실험을 통해 섬유세포와 normal rat kidney 세포의 점착 및 증식에 영향을 주는 것이 polyamide 나노섬유의 3차원적 지형이라고

Table 2. The numerical values for zone index of the materials

시험 대상	형성된 Zone 크기 (cm)	Zone Index
음성 대조군	-	0
양성 대조군	0.45 ± 0.04	3
PLGA nanofibrous membrane	-	0
Collagen nanofibrous membrane	-	0

주장하였고, J. VENUGOPAL et al. 등은 콜라겐 나노섬유와 PCL 나노섬유 상에서의 세포의 거동을 비교하여 본 결과 PCL 재료 단독 보다는 생체 고분자인 콜라겐 분자가 코팅된 나노섬유 상에서 세포의 증식 및 이주능이 향상되었다고 보고하였다.^{22,23)} 본 연구에서 MTT assay를 통한 세포 배양 실험 결과, dynamic seeding 이후 모든 종류의 나노섬유 상에서 세포가 초기에 잘 점착하고 7일간 크게 증식하는 것을 관찰하였고 (Figure 3), 예상한 바와 같이 1일과 7일째에 콜라겐 나노섬유가 PLGA 나노섬유와 비교하였을 때 더 향상된 증식능을 보여주는 것을 확인할 수 있었다($p < 0.05$).

Mycoplasma 검사

현재 세포가 포함된 조직 공학적 제품을 최종 ‘멸균화’ 시키는 어렵기 때문에 공여 물질이나 제조단계에서의 첨가물로 부터의 어떠한 감염도 공정 중 증식을 통해 치료받는 환자에게 치명적인 영향을 줄 수 있다. 특히 mycoplasma 오염은 세포배양과 생물학적 재료에 흔히 되풀이되는 위험 요소로서 Mollicutes (Mycoplasma, Ureaplasma, Acholeplasma species 포함) 감염은 실험결과의 신뢰도를 떨어뜨리고 생물학적 제품에 손상을 주게 된다.²⁴⁾ Mollicute 감염은 박테리아 수의 증가에 따라 배지 탁도가 달라지지 않으며 세포병리적 영향이 거의 없기 때문에 검사하기가 쉽지 않다.²⁵⁾ 이에 따라 이미 유럽약전(European Pharmacopoeia)과 USP(United States Pharmacopoeia)에 멸균 및 mycoplasma에 대한 시험 규격이 제정되어 있지만, 1개월 이상의 시험기간이 소요되며 그 동안 세포 혹은 조직공학적 제품의 성장능(viability)이 유지되지 못할 것이다.²⁶⁾

반면, PCR 기술은 다른 종류의 primer set의 제작을 통해 일반적인 mycoplasma 감염원을 수 시간 내 검색 할 수 있는 장점이 있으므로 이미 mycoplasma 검사의 한 방법으로 받아들여지고 있다.²⁷⁾ 따라서 본 실험에서는 세포배양 중에 흔히 발견되는 mycoplasma species의 16S rRNA에 대한 gene sequence를 annealing하는 primer mixture를 이용한 PCR 분

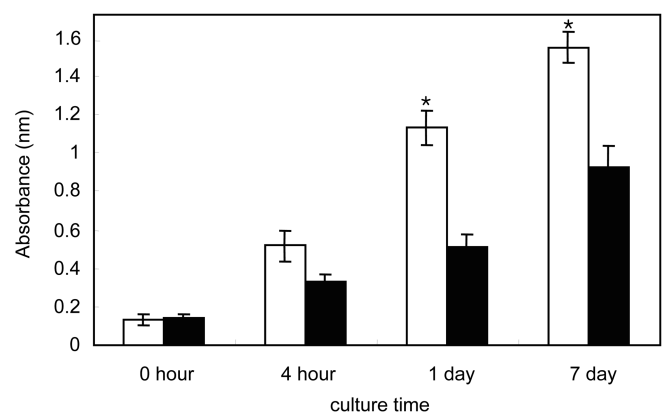


Figure 3. Cell attachment and proliferation assessed by MTT testing performed 0 hr, 4 hr, 1 day and 7 day after dynamic seeding. The data reported are means \pm SD for $n = 5$.

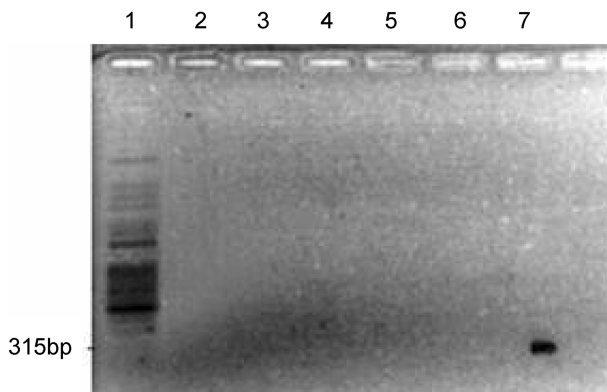


Figure 4. Electrophoretic analysis of mycoplasma polymerase chain reaction (PCR). Supernatants from cell cultures on PLGA or collagen nanofibrous membrane were subjected to the sample preparation. Lane 1: size marker (100bp DNA ladder), lane 2: collagen nanofiber with cells, lane 3: PLGA nanofiber with cells, lane 4: medium with cells, lane 5: medium without cells, lane 6: negative control (water) and lane 7: positive control.

석을 통해 1주간 세포가 배양된 PLGA 나노섬유막과 콜라겐 나노섬유막이 mycoplasma에 감염되었는지 알아보려고 하였다. 그 결과, 진피섬유세포가 부착된 PLGA 나노섬유막과 콜라겐 나노섬유막의 배양 상층액 모두 mycoplasma DNA가 함유되어 있지 않은 것이 확인되었다(Figure 4). 본 검사를 통해 mycoplasma에 의해 감염되지 않은 것으로 확인된 진피섬유세포 부착 PLGA 나노섬유막과 콜라겐 나노섬유막은 다음 동물 이식시험에 적용되었다.

동물이식시험

실험적으로 유발한 athymic mice의 창상에 각종 진피섬유세포가 부착된 나노섬유막 인공피부를 이식한 후 창상크기의 변화를 관찰하고 사진 촬영하였다(Figure 5). 또한 피부 생검의 조직학적 소견상 인공피부 이식 후 급성 염증반응이 심하고 7일째 상처 부위 아래쪽에서의 혈관형성이 활발해지는 것을 관찰하였다. 초기에 염증세포들이 진피조직 전체에서 관찰되었고

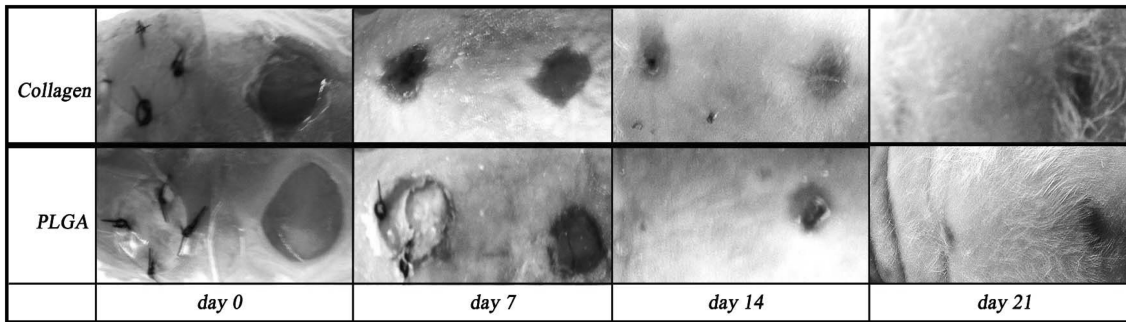


Figure 5. Macroscopic observation of wounds treated with fibroblast seeded collagen nanofibrous or PLGA nanofibrous membrane at day 0, day 7, day 14 and day 21 after implantation.

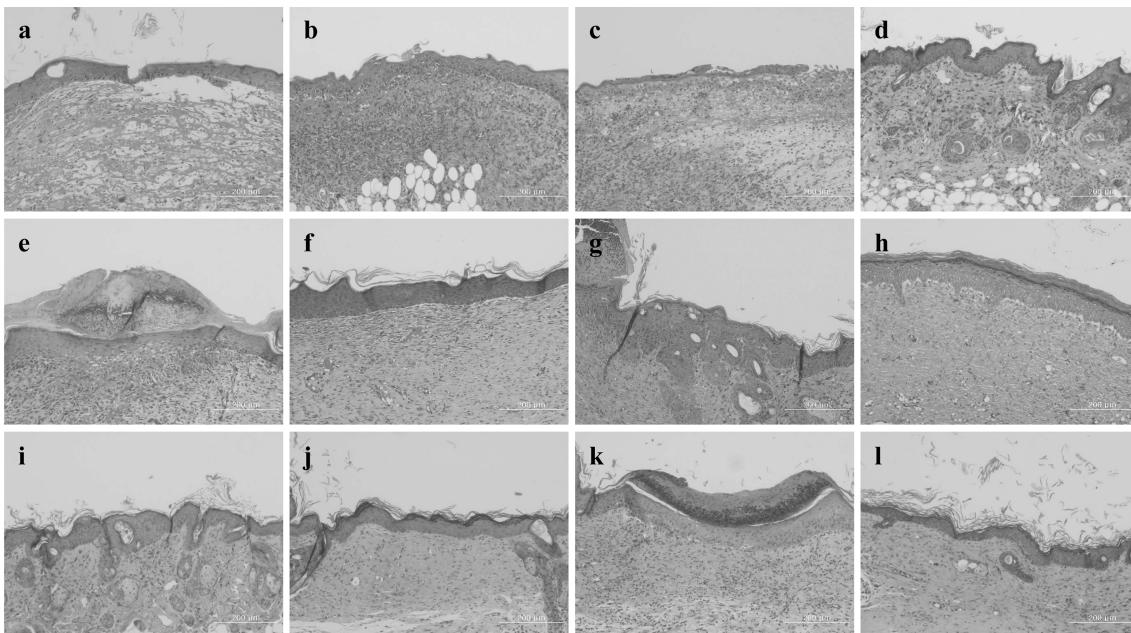


Figure 6. Photomicrographs of biopsy specimens from a wound treated with fibroblast seeded collagen nanofibrous (A, B, E, F, I, J) or PLGA nanofibrous membrane (C, D, G, H, K, L) on the postoperative 7th day (A-D), 14th day (E-H), and 21th day (I-L). Nanofibrous membrane implantation (B, D, F, H, J, L) and sham-operation controls (A, C, E, G, I, K) were compared (Magnification 40X).

(Figure 6(A-D)), 14일째에는 섬유아세포의 뚜렷한 증식과 콜라겐 생성이 관찰되었으며 진피의 혈관은 감소하기 시작하고 표피의 재생이 뚜렷했다(Figure 6(E-H)). PLGA 나노섬유막 기반 인공피부와 콜라겐 나노섬유막 기반 인공피부를 비교했을 때 염증 정도의 의미 있는 차이는 보이지 않았으며 콜라겐 나노섬유막 기반 인공피부가 적용된 군의 경우 표피재생이 대조군에 비해 빨리 시작되었다(Figure 6(I-L)). 21일째에는 모든 실험군의 조직에서 성숙된 표피 및 진피 형성을 관찰할 수 있었다. 특히 나노섬유막 기반 인공피부를 적용한 경우 더 두껍게 형성된 각질층(Stratum corneum)을 확인하였으며 잘 배열된 표피층을 통해 재생의 plateau 단계에 이르고 있음을 확인할 수 있었다.

결론

본 연구에서는 대표적 의료용 고분자인 PLGA와 콜라겐을 전기방사 기법을 통해 나노섬유막 형태로 제조하였고, 콜라겐 나노섬유의 경우 물성 유지를 위해 화학적으로 가교화하였다. CD 분석을 통해 콜라겐의 triple helix 구조가 전기방사 및 화학적 가교화 처리 이후에 유지되었음을 확인하였다. 또한 제조된 PLGA 혹은 콜라겐 나노섬유막이 세포독성을 나타내지 않으며 콜라겐 나노섬유막의 경우 PLGA 나노섬유막과 비교하여 세포 증식능이 1일째와 7일째 유의적으로 향상된 것을 관찰하였다. PCR 기법을 통해 mycoplasma 감염여부를 검사한 후 세포를 포함하는 PLGA 나노섬유막과 콜라겐 나노섬유막을 athymic mice에 이식한 결과 초기 급성 염증반응이 심하고 7일째 상처 부위 아래쪽에서의 혈관형성이 활발해지는 것을 관찰하였다. 14일째에는 섬유아세포의 뚜렷한 증식과 콜라겐 생성이 관찰되었으며 콜라겐 나노섬유막 기반 인공피부가 적용된 군의 경우 표피재생이 대조군에 비해 빨리 시작되었다. 21일째에는 모든 실험군의 조직에서 성숙된 표피 및 진피 형성을 관찰할 수 있었다. 따라서 본 연구를 통해 PLGA 혹은 콜라겐 나노섬유막의 조직공학적인 인공피부로서의 생체적합성과 효용 가능성을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 식품의약품안전청(KFDA2005-5036)의 지원으로 이루어진 것으로 이에 감사 드립니다.

참고문헌

- S. Kaihara and J. P. Vacanti, "Tissue engineering toward new solutions for transplantation and reconstructive surgery," *Arch. Surg.*, **134**, 1184-1188 (1999).
- R. Langer and J. P. Vacanti, "Tissue engineering," *Science*, **260**, 920-926 (1993).
- T. Shinoka, C. K. Breuer, and R. E. Tanel, et al., "Tissue engineered heart valves," *Ann. Thorac. Surg.*, **60**, S513-S516 (1995).
- C. A. Vacanti and J. P. Vacanti, "Bone and cartilage reconstruction with tissue engineering approaches," *Otolaryngol. Clin. North Am.*, **27**, 263-276 (1994).
- S. L. Hansen, D. W. Voigt, P. Wiebelhaus, and C. N. Paul, "Using skin replacement products to treat burns and wounds," *Adv. Skin Wound Care*, **14**, 37-46 (2001).
- D. Heimbach, A. Luterma, and J. F. Burke, "Artificial dermis for major burns. A multi-center randomized clinical trial," *Ann. Surg.*, **208**, 313-320 (1988).
- R. Stern, M. McPherson, and M. Longaker, "Histologic study of artificial skin used in the treatment of full-thickness thermal injury," *J. Burn Care Rehab.*, **11**, 7-13 (1990).
- R. E. Horsch, J. Kopp, U. Kneser, J. Beier, and A. D. Bach, "Tissue engineering of cultured skin substitutes," *J. Cell. Mol. Med.*, **9**, 592-608 (2005).
- H. Suh, S. W. Suh, and B. G. Min, "Anti-infection treatment of a transcutaneous device by a collagen-rifampicine composite," *ASAIO J.*, **40**, M406- M411 (1994).
- X. Liu, H. Wu, M. Byrne, J. Jeffrey, S. Krane, and R. Jaenisch, "A targeted mutation at the known collagenase cleavage site in mouse type I collagen impairs tissue remodeling," *J. Cell. Bio.*, **130**, 227-237 (1995).
- S. N. Park, J. C. Park, H. O. Kim, M. J. Song, and H. Suh, "Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking," *Biomaterials*, **23**, 1205-1212 (2002).
- "Biological evaluation of medical device, part 5. Test for cytotoxicity: in vitro methods," ISO 10993, 1992.
- "Biological reactivity tests," USP 24 <87>, 2000.
- H. W. Sung, I. L. Liang, C. N. Chen, R. N. Huang, and H. F. Liang, "Stability of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin)," *J. Biomed. Mater. Res.*, **55**, 538-546 (2001).
- J. Matthews J, D. Simpson, G. Wnek, and G. Bowlin, "Electrospinning of collagen nanofibers," *Biomacromolecules*, **3**, 232-238 (2002).
- W. S. Kim, J. P. Vacanti, L. Cima, D. Mooney, J. Upton, W. C. Puelacher, and C. A. Vacanti, "Cartilage engineered in predetermined shapes employing cell transplantation on synthetic biodegradable polymers," *Plast. Reconstr. Surg.*, **94**, 233-237 (1994).
- Y. Cao, J. P. Vacanti, K. T. Paige, J. Upton, and C. A. Vacanti, "Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear," *Plast. Reconstr. Surg.*, **100**, 297-302 (1997).
- M. H. Li, P. Fan, B. Brodsky, and J. Baum, "Two-dimensional NMR assignments and conformation of (Pro-Hyp-Gly)₁₀ and a designed collagen triple-helical peptide," *Biochemistry*, **32**, 7377-7387 (1993).
- K. A. Piez and M. R. Sherman, "Characterization of the product formed by renaturation of alpha 1-CB2, a small peptide from collagen," *Biochemistry*, **9**, 4129-4133 (1970).
- W. J. Li, C. T. Laurencin, E. J. Caterson, R. S. Tuan, and K. K. Frank, "Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering," *J. Biomed. Mater. Res.*, **60**, 613-621, (2001).
- W. J. Li, R. Tullia, C. Okafor, A. Derfoul, K. G. Danielson, D. J. Hall, and R. S. Tuan, "A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells," *Biomaterials*, **26**, 599-609 (2005).
- S. Melvin, A. Ijaz, K. Jabeen, N. Alam, H. Timothy, H. Grafec, C. Young, and M. Sally, "A synthetic nanofibrillar matrix promotes in

- vivo-like organization and morphogenesis for cells in culture,” *Biomaterials*, **26**, 5624-5631 (2005).
23. J. Venugopal and S. Ramakrishna, “Biocompatible nanofiber matrices for the engineering of a dermal substitute for skin regeneration,” *Tissue eng.*, **11**, 847-854 (2005)
 24. H. G. Drexler and C. C. Uphoff, “Contamination of cell culture, mycoplasma,” in *The Encyclopedia of Cell Technology*: E. Spier (Ed.), Wiley, New York, 2000, pp. 609-627.
 25. I. Bruchmuller, E. Pirkl, R. Herrmann, M. Stoermer, H. Eichler, H. Kluter, and P. Bugert, “Introduction of a validation concept for a PCR-based Mycoplasma detection assay,” *Cytotherapy.*, **8**, 62-69 (2006).
 26. D. N. Galbraith, “Regulatory and microbiological safety issues surrounding cell and tissue-engineering products,” *Biotechnol. Appl. Biochem.* **40**, 35-39 (2004).
 27. C. C. Uphoff and H. G. Drexler, “Detection of mycoplasma contaminations in cell cultures by PCR analysis,” *Hum. Cell*, **12**, 229-236 (1999).