

초음파와 동결/융해에 의한 실크/PVA 하이드로젤의 제조 및 특성 평가

이옥주* · 김정호* · 주형우* · 문보미* · 박현정* · Faheem A. Sheikh* · 박찬흠***†

*한림대학교 나노바이오재생의학 연구소, **한림대학교 춘천성심병원 이비인후과
(2013년 6월 26일 접수, 2013년 8월 3일 수정, 2013년 8월 8일 채택)

Fabrication and Characterization of Silk/PVA Hydrogels by Sonication and Freezing-Thawing Technique

Ok Joo Lee*, Jung-Ho Kim*, Hyung Woo Ju*, Bo Mi Moon*, Hyun Jung Park*,
Faheem A. Sheikh*, and Chan Hum Park***†

*Nano-Bio Regenerative Medical Institute, Hallym University, 1 Hallymdaehak-gil, Chuncheon, Gangwon-do 200-702, Korea

**Departments of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Chuncheon Sacred Heart Hospital, School of Medicine,
Hallym University, 77 Sakju-ro, Chuncheon, Gangwon-do 200-704, Korea

(Received June 26, 2013; Revised August 3, 2013; Accepted August 8, 2013)

초록: 실크 피브로인과 poly(vinyl alcohol)(PVA)는 뛰어난 생체적합성과 수용성을 가져 생체의학 분야에서 주목하는 재료이다. 본 연구에서는 실크 피브로인과 PVA를 초음파와 동결/융해 방법으로 드레싱제로서 사용 가능한 하이드로젤을 제조하고자 하였다. 실크와 PVA를 100/0, 75/25, 50/50, 25/75, 0/100 비율로 혼합하였다. 제작한 하이드로젤을 FE-SEM, TGA, FTIR, 압축 강도 측정 등을 통해 물성을 분석하였다. 실크/PVA 하이드로젤은 PVA 함량이 증가할수록 공극 크기와 팽윤도는 감소하였으며, 젤의 강도는 증가하였다. PVA를 첨가함으로써 실크의 기계적 물성이 향상되는 것을 확인하였다. 본 연구에서 제조된 실크/PVA 하이드로젤은 드레싱제로서 사용 가능성을 제시하였다.

Abstract: Biomaterials like silk fibroin (SF) and poly(vinyl alcohol) (PVA) have received increasing attention in biomedical applications because of their attractive properties such as hydrophobicity and biocompatibility. In this study, efficient systems consisting of interpenetrating SF/PVA hydrogels were prepared as potential candidate for wound dressing applications. A simple approach consisting of sonication and a freezing-thawing technique was adopted to fabricate the hydrogels. Different blend ratios consisting of SF (100, 75, 50, 25 and 0%) with respect to the weight of PVA were prepared. The produced hydrogels were characterized for physico-chemical investigations using various states of techniques like; FE-SEM, TGA, FTIR and tensile strength. The addition of PVA to SF was proved to be beneficial in terms of reducing the pore size and swelling ratio of hydrogels. The mechanical property of SF had been increased by addition of PVA. These results show that SF/PVA hydrogels may serve as potential candidates for wound dressing application.

Keywords: poly(vinyl alcohol), silk, hydrogel, sonication.

서 론

하이드로젤은 친수성 고분자의 사슬들이 결합에 의해 물에 녹지 않고 팽윤되어 3차원 망상 구조 내에 많은 양의 수분을 함유할 수 있다.¹ 하이드로젤은 수용액에서 팽윤된 이후 열역학적으로 안정하고 또한 특유의 친수성과 유연성으로 인해 소프트 렌즈, 바이오센서, 상처 치료용 드레싱, 유착방지막 및 연골 등의 생체 재료 및 약물전달시스템 분야에서 이용되고 있다.^{2,3}

Poly(vinyl alcohol)(PVA) 하이드로젤은 친수성 고분자로서, 높은 팽윤도와 무독성, 우수한 생체적합성으로 의학 및 제약 분야의 응용에 많은 관심을 받고 있으며, 인공디스크, 인공연골, 콘택트렌즈 등 여러 분야에서 연구되고 있다.^{4,9} PVA 하이드로젤은 제조 방법에 따라 물성 제어가 가능하며, 특히 동결/융해 과정에서 하이드로젤 내의 고분자들의 물리적인 가교를 통해 결정질 형태를 띠게 되고, 우수한 탄성과 강도를 가지게 된다.^{10,11} 이때 PVA의 분자량, 용액의 농도, 동결온도, 시간, 동결반복 횟수에 의해 형성된 하이드로젤의 특성이 달라진다고 알려져 있다.^{12,13}

실크 피브로인은 누에에서 추출한 천연고분자 물질로 오랫동안 직물의 섬유소재 및 봉합사와 같은 의, 공학 소재로 이

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: hlpch@paran.com

용되어 왔다.¹⁴ 실크 피브로인을 생체에 적용할 때 염증반응을 거의 일으키지 않으면서 섬유모세포나 각질 세포 등에 세포 부착 능력과 증식효과가 뛰어나 생체 적합성이 우수한 인공피부의 소재로서 많은 관심이 모아지고 있다.¹⁵⁻¹⁷ 실크 피브로인 하이드로젤은 pH 변화, 초음파를 이용하여 제조할 수 있으며, 연골, 약물 전달체로서의 이용에 관한 연구가 진행되고 있다.¹⁸⁻²¹ 그러나 기계적 물성이 좋지 않아 이용에 제약받고 있다.

이러한 단점을 보완하여 드레싱용 실크 하이드로젤을 개발하고자 본 연구에서는 우수한 기계적 물성을 이용하여 하이드로젤 제조에 사용되는 PVA와 실크 피브로인을 혼합하여 하이드로젤을 제조하였다. 실크/PVA 혼합수용액을 초음파를 가해준 후 동결/용해과정을 3회 반복하여 물리적인 가교를 수행하였다. 제조된 하이드로젤의 물성 분석을 위해 팽윤도, FTIR, 인장강도 측정 등을 수행하였다.

실 험

시료 및 시약. PVA(분자량(Mw) 1.24×10^5 – 1.86×10^5 , hydrolyzed 98-99%)는 Aldrich(USA)사에서 구입하여 사용하였으며, 실크 누에고치(Bombyx mori)는 울진농원으로부터 구입하였다. 세포독성 실험에서는 NIH3T3 세포를 사용했으며, 사용된 배지는 10% fetal bovine serum(FBS, GIBCO, USA)과 1% penicillin-streptomycin(P/S, GIBCO, USA)가 첨가된 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM, Welgene, USA)을 사용하였다. 배양된 세포 처리 시 trypsin-EDTA(GIBCO, USA)와 phosphate buffered saline(PBS, GIBCO, USA)을 사용하였으며, 세포증식률 측정은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Duchefa Biochemie, Netherlands)를 사용하였다.

실크 피브로인 수용액 제조. Bombyx mori의 누에고치를 0.02 M Na_2CO_3 수용액에서 60분 동안 100 °C로 가열하고 증류수로 3회 반복 세척하여 세리신 단백질과 불순물 등을 제거하여 순수한 실크 피브로인을 얻었다. 정련된 실크 피브로인은 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} : \text{EtOH} = 1:8:2$ mol비의 혼합용매에 90 °C에서 2시간 동안 용해시킨 다음 증류수에서 72시간 동안 투석하여 순수한 실크 피브로인 용액(SF)을 얻어 polyethylene glycol(PEG, Yakuri pure chemicals, Japan)로 농축하였다. 제조된 실크 피브로인의 최종 농도는 8 wt%였다.

하이드로젤 제조. PVA를 8 wt%로 80 °C에서 1시간 동안 용해시켰다. 실크 피브로인 수용액 8 wt%에 PVA 수용액을 각각 100:0, 75:25, 50:50, 25:75, 0:100의 비율로 균일하게 섞는다. 실크/PVA 혼합 수용액의 총량은 20 mL이었다. 제조된 실크/PVA 용액을 각각 single well plate에 부어 20% amplitude로 10분 동안 초음파(VC750, Sonics&Materials, USA)를 처리해준 후 -80 °C에서 급속냉동, 상온에서 해동하

는 동결/용해 과정을 3회 거쳐 하이드로젤을 제조하였다.

Scanning Electron Microscope(SEM). 하이드로젤을 동결건조 후 단면을 잘라 Au-Pd로 코팅 후 주사전자현미경(UPRA55V VP-FESEM, Carl Zeiss, Germany)으로 관찰하였다. 주사전자현미경 관찰은 기초과학연구원(춘천)에서 이루어졌다.

하이드로젤의 물리적 특징. 팽윤도: 건조된 실크/PVA 하이드로젤을 상온에서 PBS buffer에 침지시킨 후 무게변화가 평형에 이를 때까지 측정하였다. 팽윤도는 식 (1)에 나타낸 바와 같이 팽윤된 젤의 무게(W_s)와 건조된 젤의 무게(W_d) 차를 건조된 젤의 무게로 나누어 백분율로 나타냈다.

$$\text{팽윤도}(\%) = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100 \quad (1)$$

압축 강도: 하이드로젤의 강도를 알아보기 위해 범용 테스트 기계(QM100S, Qmesys, Korea)를 이용하여 압축 강도를 측정하였다. 각 조성마다 5개의 시편을 준비하였고, 각 시료의 두께를 평균화하였다. 압축 강도 측정 시 크로스 헤드(cross head) 속도는 5 mm/min이었으며, 시편의 변형이 50% 이루어질 때의 값을 측정하였다.²²

Fourier Transform Infrared Spectroscopy(FTIR): 제조된 실크/PVA 하이드로젤의 구조변화를 측정하기 위해 FTIR(FT-3000, BIO-RAD, USA)을 사용하였고, 2000-400 cm^{-1} 파장범위에서 분석하였다.

Thermogravimetric Analysis(TGA): 실크/PVA 하이드로젤의 온도 변화에 따른 질량변화를 살펴보기 위하여 TGA(SDT Q600, TA instruments, USA)를 이용하여 질소 기류하에서 10 °C/min의 승온 속도로 50~700 °C의 범위 내에서 열중량 분석을 행하였다.

세포 독성 실험. 실크/PVA 하이드로젤의 세포 독성을 확인하기 MTT assay를 시행하였다. NIH3T3 세포를 각 하이드로젤에 2×10^5 cell/mL로 파종하였다. 1, 3, 5일 째 MTT 용액(5 mg/mL)을 배양액의 1/10씩 넣은 다음 2시간 동안 인큐베이터에서 배양한 후 1.5 mL 튜브에 하이드로젤을 옮겨 dimethyl sulfoxide(DMSO, sigma) 용액을 1 mL씩 넣어 보라색 결정이 완전히 녹을 때까지 초음파 세척기로 30분 용해하였다. 용액을 96 well에 100 μL 씩 분주하고 ELISA 플레이트 리더(molecular devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 토론

SEM 관찰 및 팽윤도. 실크/PVA 하이드로젤의 단면을 SEM을 통해 관찰하였다(Figure 1). 하이드로젤 단면에서 다공성 구조(porous structure)가 관찰되었다. PVA 함량이 높을수록 공극 크기가 작아지는 것으로 나타났다. 하이드로젤의 공극

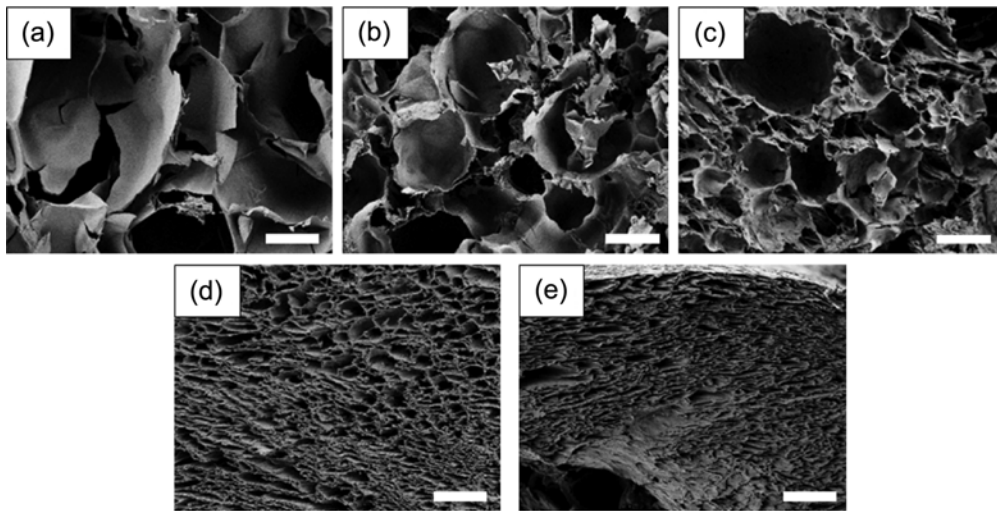


Figure 1. SEM images of the cross-sections of porous SF/ PVA hydrogels: (a) 100/0; (b) 75/25; (c) 50/50; (d) 25/75; (e) 0/100; Scale bars: 100 μ m.

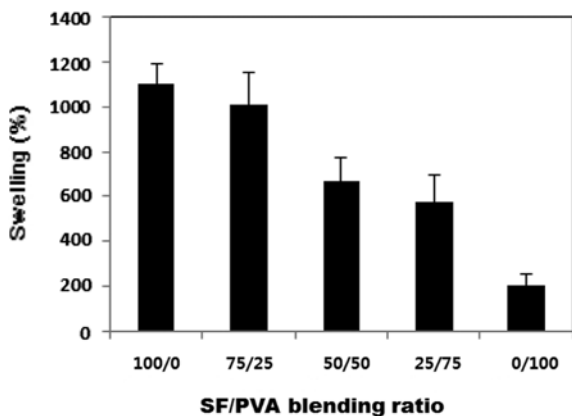


Figure 2. Swelling ratio of different SF/PVA hydrogels (100/0, 75/25, 50/50, 25/75 and 0/100) in PBS buffer at room temperature. The results are represented as means \pm standard deviation (n = 3).

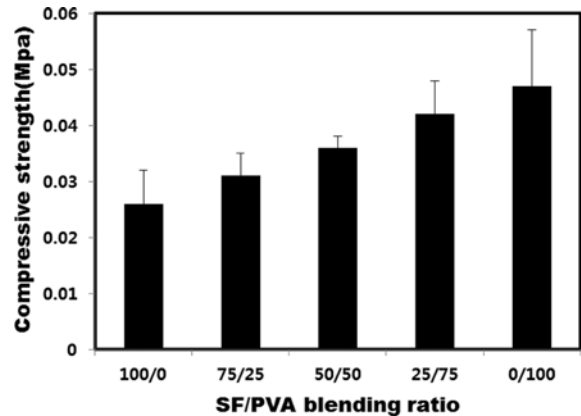


Figure 3. Compressive strength of different SF/PVA hydrogels (100/0, 75/25, 50/50, 25/75 and 0/100). The results are represented as means \pm standard deviation (n = 5).

크기는 각각 202.18 \pm 75.13, 105.96 \pm 37.83, 59.42 \pm 20.43, 21.87 \pm 6.6, 12.06 \pm 6.41 μ m(실크/PVA 혼합비율 100/0, 75/25, 50/50, 25/75, 0/100)이었다. 팽윤도 또한 PVA 함량이 높아질수록 낮은 것으로 나타났다(Figure 2). PVA 함량이 높을수록 공극 크기는 작아지고 그 수는 증가하며, 물을 함유할 수 있는 체적이 감소하므로 팽윤도가 낮아진다.

압축 강도. 실크/PVA 하이드로겔의 압축 강도를 측정하였다(Figure 3). PVA 함량이 높을수록 크게 나타났다. 이는 PVA 수용액의 반복적인 동결-융해 과정으로 인해 하이드로겔의 압축 강도가 높은 값을 갖게 되는 것으로 판단된다.^{12,13} 순수 실크 하이드로겔보다 PVA 혼합 시 팽윤도는 떨어지나 압축 강도 증가로 인해 형태 유지가 가능하여 드레싱제로서의 응용은 가능할 것으로 본다.

FTIR 및 TGA. 실크와 PVA간의 분자 수준에서의 상호작용을 살펴보기 위하여 하이드로겔 조성 변화에 따른 FTIR을

행한 후 그 결과를 Figure 4에 나타냈다. 순수 실크 하이드로겔(100/0)의 경우 1622 cm^{-1} (C=O stretch, amide I), 1518 cm^{-1} (N-H bond, amide II), 1232 cm^{-1} (C-N stretch, amide III) 피크가 강하게 나타났다.²³ 순수 PVA 하이드로겔(0/100)의 경우 1419, 1328, 1089 cm^{-1} 피크가 강하게 나타났다.²⁴ 그래프 상에서 실크/PVA 하이드로겔에서의 함량에 따른 피크 위치의 변화는 나타나지 않았다. 이는 초음파에 의한 실크 결정화의 경우 PVA 함량에는 영향을 받지 않고 하이드로겔을 형성하고 있음을 나타낸다.

TGA는 고분자 물질의 열 안정성을 분석하는 방법으로써 온도에 따른 실크/PVA 하이드로겔의 질량 변화를 살펴보았다. Figure 5에서 보여지듯이, TGA 측정 결과 순수 실크 하이드로겔과 PVA 하이드로겔은 각각 260, 213 $^{\circ}\text{C}$ 에서 7% 질

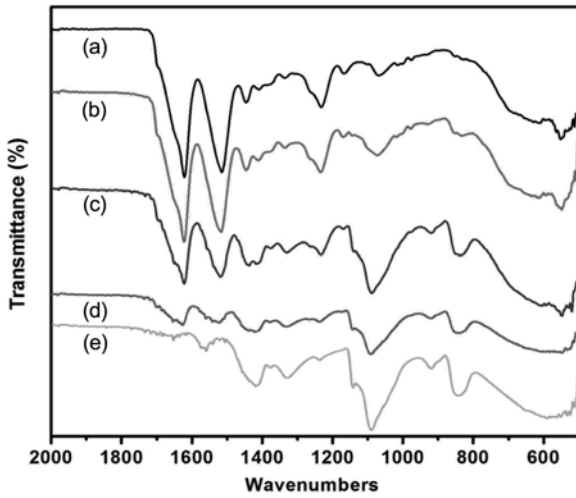


Figure 4. FTIR spectra profiles of different SF/PVA hydrogels: (a) 100/0; (b) 75/25; (c) 50/50; (d) 25/75; (e) 0/100.

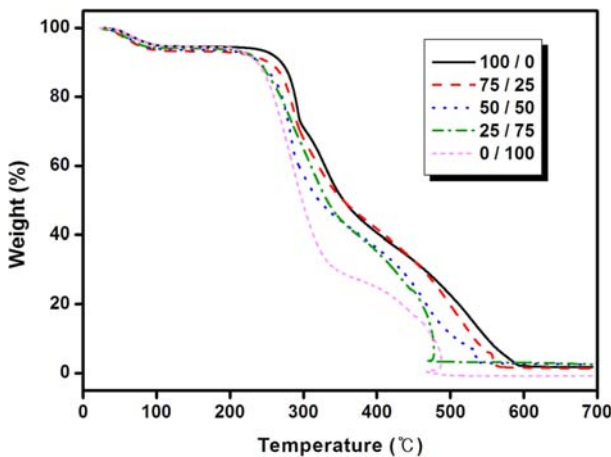


Figure 5. TGA profiles of different SF/PVA hydrogels (100/0, 75/25, 50/50, 25/75 and 0/100).

량 감소를 보였고, 실크 하이드로젤은 354°C, PVA 하이드로젤은 298°C에서 50%의 질량 감소를 나타내는 것으로 보아 순수 실크 하이드로젤이 PVA 하이드로젤보다 열 안정성이 뛰어난 것을 확인할 수 있다. 실크/PVA 혼합 하이드로젤의 경우, 질량 감소율은 순수 실크와 PVA 하이드로젤 사이에서 나타나는 것으로 보아 순수 PVA보다는 높고 실크 하이드로젤보다는 낮은 열 안정성을 나타내는 것으로 판단된다.

세포 독성. MTT assay를 통해 실크/PVA 하이드로젤의 세포 독성을 평가하였다(Figure 6). 모든 하이드로젤에서 세포 증식률의 큰 차이는 보이지 않아 세포 독성은 없는 것으로 보인다. 실크와 PVA 모두 독성이 없는 생체 적합성이 높은 물질로 알려져 있어, 본 연구에서 제작한 하이드로젤 역시 세포 독성이 없는 것을 예측할 수 있다.^{25,26} 따라서 본 실험에 이용된 실크/PVA 하이드로젤은 드레싱제로의 사용이 가능하

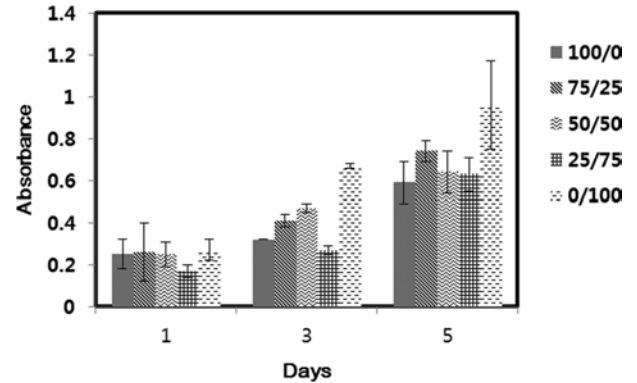


Figure 6. Cytotoxicity of different SF/PVA hydrogels after incubation for 1, 3 and 5 days. The results are represented as means \pm standard deviation ($n = 3$).

며, 하이드로젤 소재를 다루는 의학 및 제약 분야에서 다양한 생체 재료로의 응용도 예측할 수 있다.

결론

실크와 PVA의 비율을 달리하여 혼합한 수용액을 이용하여 하이드로젤을 제조하였다. 실험 결과 PVA 함량이 높은 실크/PVA 하이드로젤의 팽윤도는 낮은 값을 보였으며, 인장강도는 높게 나타났다. FTIR을 이용하여 분석한 결과 초음파 및 동결/융해에 의한 구조적인 변화는 없는 것을 확인하였다. 세포 증식률 실험을 통해 나타난 결과 제조된 하이드로젤의 독성이 없는 것으로 나타났다. 따라서 실크/PVA 하이드로젤은 초음파를 통해 젤화된 실크에 반복적인 동결/융해 과정으로 인한 PVA의 탄성과 강도를 증가시켜 순수 실크 피브로인 하이드로젤에 비해 기계적 물성을 높였다. 이와 같이 본 연구에서 제작한 하이드로젤은 PVA 혼합을 통하여 실크의 기계적 물성의 단점을 보완하고 신축성을 향상시킴으로써 드레싱 재료로서의 개발 가능성을 보였다.

감사의 글: 본 연구는 농림수산식품기획평가원 생명기술개발사업(111100-03-2-SB010과 112007-05-1-SB010)과 한림대학교 교비연구비의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. J. Chen, S. Jo, and K. Park, *Handbook of Biodegradable Polymers*, Overseas Publishers Association, Amsterdam, p 203 (1997).
2. N. A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, and H. Ichikawa, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **50**, 27 (2000).
3. S. J. Park and C. H. Kim, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **4**, 471 (2007).
4. K. Burczak, T. Fujisato, M. Hatada, and Y. Ikada, *Biomaterials*,

- 15, 231 (1994).
5. T. Hirai, T. Okinaka, Y. Amemiya, K. Kobayashi, M. Hirai, and S. Hayashi, *Angew. Makromol. Chem.*, **240**, 213 (1996).
 6. E. K. Choi, H. I. Kim, K. R. Park, and Y. C. Nho, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **14**, 505 (2003).
 7. K. R. Park and Y. C. Nho, *Polymer(Korea)*, **26**, 792 (2002).
 8. Y. Zheng, M. K. Nguyen, C. He, C. T. Huynh, and D. S. Lee, *Macromol. Res.*, **18**, 1096 (2010).
 9. M. K. Nguyen and D. S. Lee, *Macromol. Res.*, **18**, 284 (2010).
 10. E. Pines and W. Rins, *Macromolecules*, **6**, 888 (1973).
 11. C. M. Hassan, J. H. Ward, and N. A. Peppas, *Polymer*, **41**, 6729 (2000).
 12. W. E. Hennink and C. F. van Nostrum, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**, 13 (2002).
 13. G. Khang, M. S. Kim, and B. H. Min, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **3**, 376 (2006).
 14. I. C. Ueno, H. Y. Kweon, Y. H. Park, and S. Hudson, *Int. J. Biol. Macromol.*, **29**, 91 (2001).
 15. N. Minoura, M. Tsukada, and M. Nagura, *Polymer*, **31**, 265 (1990).
 16. N. Minoura, S. Aiba, M. Higuchi, Y. Gotoh, M. Tsukada, and Y. Imai, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **208**, 511 (1995).
 17. M. Santin, A. Motta, G. Freddi, and M. Cannas, *J. Biomed. Mater. Res.*, **46**, 382 (1999).
 18. Z. H. Ayub, M. Arai, and K. Hirabayashi, *Polymer*, **35**, 2197 (1994).
 19. Z. H. Ayub, M. Arai, and K. Hirabayashi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 1910 (1993).
 20. P. H. Chao, S. Yodmuang, X. Wang, L. Sun, D. L. Kaplan, and G. Vunjak-Novakovic, *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, **95**, 84 (2010).
 21. K. Numata, S. Yamazaki, and N. Naga, *Biomacromolecules*, **13**, 1383 (2012).
 22. E. K. Choi, H. I. Kim, K. R. Park, and Y. C. Nho, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **14**, 505 (2003).
 23. X. Hu, Q. Lu, L. Sun, P. Cebe, X. Wang, X. Zhang, and D. L. Kaplan, *Biomacromolecules*, **11**, 3178 (2010).
 24. T. Jannongkan and S. Kaewpirom, *J. Polym. Environ.*, **18**, 413 (2010).
 25. S. J. Bryant, K. A. Davis-Arehart, N. Luo, R. K. Shoemaker, J. A. Arthur, and K. S. Anseth, *Macromolecules*, **37**, 6726 (2004).
 26. C. Vepari and D. L. Kaplan, *Prog. Polym. Sci.*, **32**, 991 (2007).