



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0034564

(43) 공개일자 2016년03월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/60 (2006.01) A61F 2/10 (2006.01)

A61L 27/22 (2006.01) A61L 27/56 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0125522

(22) 출원일자 2014년09월22일

심사청구일자 2014년09월22일

기술이전 희망 : , 실시권허여, 기술지도

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

박찬흠

강원도 춘천시 지석로 67 현진에버빌2차 204-1302

이옥주

강원도 평창군 진부면 오대천로 703-2

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 4 항

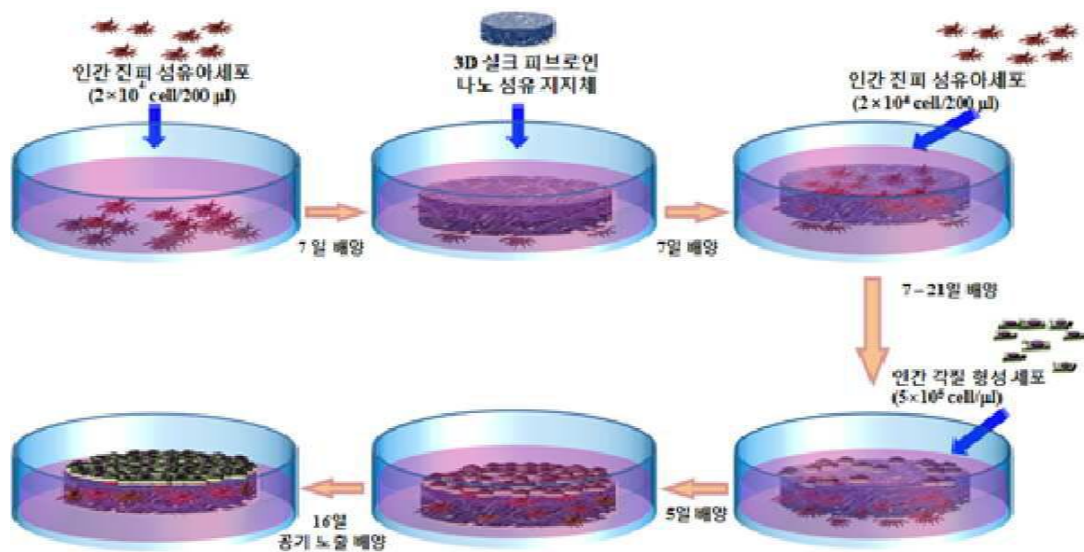
(54) 발명의 명칭 3D 실크 피브로인 전기방사 기법을 이용한 인공 피부 제작

(57) 요약

본 발명은 새로운 전기방사 기법을 통하여 실크 피브로인(또는 실크 단백질)을 전기방사 후 인공 피부에 적합한 공극 크기 및 인공 피부 제작에 용이한 지지체 선정 및 제조방법에 관한 것이다.

본 발명은 인공 피부 제조시 사용된 실크 피브로인은 누에로부터 얻을 수 있는 천연 고분자로서, 세리신 제거 과 (뒷면에 계속)

대표도 - 도9



정을 통해 실크 피브로인을 얻을 수 있는 대량 생산이 가능한 천연 고분자 단백질이다. 실크 피브로인은 다른 합성 물질과는 달리 면역반응을 유발하지 않으며 FDA에서 의료용 소재로 사용 승인을 받은 고분자로 과거부터 의료용 소재로 봉합사 및 기타 의료용 소재로 사용되어 안전성이 입증된 천연 고분자이다. 이러한 장점으로 실크 피브로인은 의료용 소재로 다양한 소재가 최근 들어 속속 개발 되고 있다.

이러한 실크 피브로인의 대량 생산성, 생분해성, 창상 재생 기능, 생체 접착 기능, 뛰어난 생체 적합성 및 생물학적 위험성이 없다는 장점을 이용하여 새로운 인공 피부 지지체를 개발할 수 있다. 또한, 인공 피부는 피부의 기능 및 재생을 도와주는 역할을 한다. 때에 따라선 화장품이나 의약품의 테스트에서 동물실험을 대체 할 수 있는 전임상 재료로 쓰이기도 한다. 인공 피부 제조시 세포 배양이 필수적이며, 세포의 특성상 세포가 부착 할 수 있는 특정 지지체를 필요로 하게 된다. 본 발명은 인공 피부제조시 세포들의 지지체 역할을 해줄 수 있는 실크 3D 나노 섬유 지지체를 제조 하여 인공 피부로써 응용하였다.

(72) 발명자

주형우

경기도 남양주시 도농로 34 부영아파트1단지
508-2302

이정민

경기도 구리시 원수택로12번길 27, 201호

김정호

강원도 춘천시 복골길 3

문보미

서울특별시 도봉구 마들로 735-8 현대성우아파트
101-808

박현정

인천광역시 중구 하늘달빛로 113 우미린 2단지
753-1501

김동욱

서울특별시 노원구 동일로 1456 주공아파트
712-1506

이민채

경기도 구리시 원수택로 6-15 현암아파트 가동 20
1호

김수현

경기도 남양주시 진건읍 독정로 124-9

정주연

강원도 춘천시 효석로 67 석사아파트 110-507

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ009051062014

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린 21사업

연구과제명 진피용 실크 소재 연구

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2014.01.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

전기방사법을 이용한 인공피부

청구항 2

제 1항에 있어서, 실크 피브로인에 Polyethylene Oxide(PEO) 합성 고분자를 혼합하여 전기방사하는 공정

청구항 3

제 1항에 있어서, 냉각 플레이트를 이용하여 열음과 나노 섬유를 동시에 적층하는 나노 섬유 지지체 제조 공정

청구항 4

제 1항에 있어서, 냉각 플레이트 전기방사를 이용한 지지체를 응용하여 인공 피부 제작 및 배양 조건하는 공정

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 새로운 전기방사 기법을 통하여 실크 피브로인(또는 실크 단백질)을 전기방사 후 인공 피부에 적합한 공극 크기 및 인공 피부 제작에 용이한 지지체 선정 및 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 피부는 외부를 덮고 있는 기관으로 바깥쪽에서부터 표피, 진피 및 피하지방층의 세 개의 층으로 구성되어 있다. 표피는 중층편평상피의 각질형성세포가 대부분을 차지하고 있다. 콜라겐 섬유와 탄력 섬유와 같은 기질 단백질로 이루어진 진피는 표피 아래에 위치하여 진피에는 혈관, 신경, 땀샘 등이 있다. 피하지방층은 지방세포로 구성되어 있다. 피부는 체온 조절과 외부 환경에 대한 장벽으로의 기능 등 다양한 기능을 가지고 있다. 피부는 외부의 유해한 자극에 대한 장벽 역할을 수행하며, 수분과 전해질의 외부 유출을 방지와 체온을 조절한다. 이외에도 촉각, 압각, 통각, 온도 자극 등에 대한 감각기능을 수행하며, 면역기능 및 내부장기의 이상을 표현하는 기관이다.

[0003] 인공 피부는 피부의 기능 및 재생을 도와주는 역할을 한다. 때에 따라선 화장품이나 의약품의 테스트에서 동물 실험을 대체 할 수 있는 전임상 재료로 쓰이기도 한다. 인공 피부 제조시 세포 배양이 필수적이며, 세포의 특성상 세포가 부착 할 수 있는 특정 지지체를 필요로 하게 된다.

[0004] 본 발명은 인공 피부 제조시 세포들의 지지체 역할을 해줄 수 있는 실크 3D 나노 섬유 지지체를 제조 하였다.

[0005] 실크는 누에로부터 얻을 수 있는 천연 고분자로서, 세리신 제거 과정을 통해 실크 피브로인을 얻을 수 있는 대량 생산이 가능한 천연 고분자 단백질이다. 실크 피브로인은 다른 합성 물질과는 달리 면역반응을 유발하지 않으며 FDA에서 의료용 소재로 사용 승인을 받은 고분자로 과거부터 의료용 소재로 봉합사 및 기타 의료용 소재로 사용되어 안전성이 입증된 천연 고분자이다. 이러한 장점으로 실크 피브로인은 의료용 소재로 다양한 소재가 최근 들어 속속 개발 되고 있다.

[0006] 이러한 실크 피브로인의 대량 생산성, 생분해성, 창상 재생 기능, 생체 접착 기능, 뛰어난 생체 적합성 및 생물학적 위험성이 없다는 장점을 이용하여 새로운 인공 피부 지지체를 개발할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 상기 문제점을 해결하기 위한 본 발명은 실크 피브로인의 실크 피브로인의 대량 생산성, 생분해성, 창상 재생 기능, 생체 접착 기능, 뛰어난 생체 적합성 및 생물학적 위험성이 없다는 장점을 이용하여 인체 피부와 유사한

인공 피부를 제공함으로써 피부독성 검사, 화상, 피부궤양 등의 피부 이식에 사용될 수 있는 실크 피브로인 나노 섬유 지지체를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008]

본 발명은 인공 피부에 적합한 지지체를 제조하기 위해, 전기방사와 실크 피브로인을 이용하여 여러가지 공극의 크기 및 배열을 제조, 테스트 하였으며, 세포 증식 및 침투율 테스트, 3차원 세포 배양을 거쳐 인공피부로써 적합한 형태의 지지체를 제조 하였다.

발명의 효과

[0009]

본 발명에 의하면 종래에는 시행 할 수 없었던 나노 섬유 매트와 적절한 공극 크기의 조절, 지지체의 두께 조절, 두 가지 세포를 동시 배양하여 인체 피부와 유사한 인공 피부를 제공함으로써 피부독성 검사, 화상, 피부 궤양 등의 피부 이식에 사용될 수 있는 실크 피브로인 나노 섬유 지지체를 제공하고자 한다.

도면의 간단한 설명

[0010]

도1은 냉각 나노 섬유 매트 제조 과정, a)DC 전압공급기, b)전기방사용매, c)전기방사된 나노 섬유 매트, d)수집기, e)냉각판, f)나노 섬유 매트 확대 g)냉각기이다.

도2는나노 섬유 지지체의 불용화 공정이다.

도3은 전기방사 방법에 따른 육안적 비교 및 냉각 방사의 응용 예시를 나타낸다.

A: 왼쪽부터 전기방사, 염화나트륨 전기방사, 냉각 전기방사, B: 냉각 전기 방사의 두께 관찰 및 응용 예시

도4는 실크 피브로인 나노 섬유 지지체 주사 전자 현미경 소견이다.

A : 실크 피브로인 전기방사 표면 관찰, B: 실크 피브로인 전기방사 측면 관찰, C: 실크 피브로인 염화 나트륨 전기방사 표면, D: 실크 피브로인 염화 나트륨 전기방사 측면, E: 실크 피브로인 냉각 전기방사 표면, F: 실크 피브로인 냉각 전기방사 측면

도5 각각 지지체의 팽윤력, 물 흡수도, 공극률 측정 결과이다.

도6은 각각 지지체에서 증식한 세포의 전자 주사 현미경 관찰결과이다.

A : 실크 피브로인 전기방사 표면 관찰, B: 실크 피브로인 전기방사 측면 관찰, C: 실크 피브로인 염화 나트륨 전기방사 표면, D: 실크 피브로인 염화 나트륨 전기방사 측면, E: 실크 피브로인 냉각 전기방사 표면, F: 실크 피브로인 냉각 전기방사 측면

도7은 각각 지지체에서 증식한 세포의 형광 현미경 관찰결과이다.

A, B : 실크 피브로인 전기방사, C, D : 실크 피브로인 염화 나트륨 전기방사, E, F : 실크 피브로인 냉각 전기방사, 파란색: 세포핵, 녹색: 실크 피브로인

도8은 습도 조건에 따른 냉각 전기방사의 전자주사 현미경 관찰 결과이다.

A : 습도 30% 전기방사 표면 관찰, B: 측면 관찰, C: 습도 50% 전기방사 표면, D: 측면 관찰, E: 습도 90% 전기방사 표면 관찰, F: 측면 관찰

도9는 제작된 인공 피부의 제작 과정에 관한 도표이다.

도 10은 제작된 인공 피부의 조직학적 관찰 결과이다.

A: 세포배양 6주차, B: 세포배양 7주차, C, D: 세포배양 8주차, A,B,C : Hematocytin Eosin 염색, D: Massons Trichome 염색

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011]

본 발명에 의하면 적절한 공극 크기와 두께 조절이 가능한 지지체를 적용하여 유지하고 세포 증식률 및 세포가 침투가 빠르며, 인체 피부조직과 유사하여 피부독성 검사, 화상, 피부궤양 등의 피부 이식에 사용될 수 있고, 생분해성을 가지고 있어서 지지체 제거를 위한 2차 과정이 필요 없는 인공 피부를 제공한다.

- [0012] 한편, 제조된 실크 피브로인 지혈제에 대해서는 불용화 처리 공정이 추가적으로 수행될 수 있다. 본 발명에서는 메탄올, 에탄올, 프로판올로 처리하거나, 또는 수화 과정 혹은 고온 처리를 함으로써 실크 피브로인 함유 지혈제의 지지체 구조를 유지한다.
- [0013] 이하 실시예를 통해 본 발명을 설명한다. 그러나, 이는 발명의 이해를 용이하게 하기 위한 것일 뿐, 본 발명이 이에 한정되는 것으로 여겨져서는 안된다.
- [0014] 각 단계에 대해 구체적으로 설명한다.
- [0015] 1. 인공 피부 지지체로 응용 가능한 전기방사 나노 섬유 지지체의 물리적 특징 및 세포 증식률에 대한 지지체 선정
- [0016] 1.1. 나노 섬유 지지체의 제조
- [0017] 1.1.1. 실크 피브로인 단백질 제조
- [0018] 누에고치 (*Bombyx mori*)로부터 세리신 단백질 및 불순물 등을 제거했다. 이를 위해 잘게 건삭 한 자른 후 0.02 M Na₂CO₃이나 염기성 수용액에 넣고 1시간 동안 100로 가열하고 증류수로 2-3번 세척하는 과정을 거쳤다. 상기 과정을 거친 실크 피브로인을 clean bench에서 하루 동안 건조 시켰으며, 건조된 실크 피브로인은 CaCl₂/Ethanol/H₂O (1:2:8, mole ratio) 용액에 15wt%의 농도로 95에서 40분간 동안 용해시켰다. 다음 한번 더 불순물 제거를 위해 miracloth (Calbiochem, San Diego, CA, USA)로 걸러 주었다. 걸러진 실크 피브로인 용액을 12,000-14,000 Da (Spectra/Por, Rancho Dominguez, CA, USA) 투석막에 넣고 증류수에서 3일 동안 투석하여 순수한 실크 피브로인 용액(SF)을 제조하였다. 이때 제조된 실크 피브로인의 최종 농도를 7-9 wt%로 했다.
- [0019] 1.1.2. 3D 나노 섬유 매트 제조 과정 (냉각 전기방사 방법)
- [0020] 지지 구조체의 공극 크기 및 공극률을 향상 시키기 위해 실크 피브로인에 PEO(polyethylene oxide)를 혼합하여 실크 피브로인 혼합 수용액을 제조한다. 이때, 첨가되는 폴리머와 실크 피브로인의 중량비는 3:7 내지 4:6로 한다. 제조된 실크 피브로인/폴리머 수용액을 거품이 생성되지 않도록 혼합한다. 혼합된 용액으로 전기 방사 과정을 시행하며, 이때 스테인레스 스틸 바늘(22 게이지, 0.7mm OD X 0.4mm ID)이 장착 된 플라스틱 주사기에 용액을 준비한 후 주사기 펌프로 1.2ml/hr으로 토출하여 준다. 이때 스테인레스 스틸 바늘에는 고전압 전류를 인가하여 주고 바늘과 수집기의 거리는 15cm를 유지하여 준다. 사용된 전압은 20kV를 사용하였다.
- [0021] 위의 일반적인 전기방사 방법으로 전기방사를 시행하되 온도를 -90까지 냉각 가능한 수집기를 사용하여 전기방사를 시행하였다. 이때 나노 섬유의 퇴적과 함께 수집기 위에 습기로 인한 얼음 결정의 축적이 동시에 진행되며 이 얼음으로 인한 비교적 일정한 공극 구조를 가지는 나노 섬유 지지체를 획득 할 수 있었다.
- [0022] 1.1.3. 나노 섬유 지지체의 불용화 처리
- [0023] 상기 제작된 나노 섬유 지지체의 실크 피브로인은 친수성으로 물에 쉽게 녹아 구조를 유지하기 어렵기 때문에, 생체내 분해도 조절 및 물성 유지를 위해 불용화 공정을 거쳤다. 완성된 지지체를 동결 건조를 통해 얼음 결정과 수분을 모두 날려버린 후에 알코올에 15-30분 담귀 불용화 처리 해주었다. 이후 알코올의 제거를 위해 점차적으로 물로 치환해 주었다. 또 다른 불용화 공정으로는 메탄올, 에탄올, 프로판올로 처리하거나, 수화 처리 또는 고온 처리를 함으로써 나노 섬유 지지체의 구조를 유지할 수도 있다. 나노 섬유 지지체의 세포 침투 효과 및

구조적 특징, 물성 분석을 위해 대조군으로 각각 일반적인 전기방사법, NaCl을 이용한 전기방사법을 사용하여 제작한 지지체를 사용하여 비교했으며 대조군의 제조 방법으로는 다음과 같이 진행 하였다.

1.1.4. 2D 나노 섬유 지지체 제작 과정 (전기방사 방법)

위와 동일한 방법으로 전기방사를 시행하되 수집기에 특별한 장치를 하지 않았다. 제작된 후 상기 기술된 방법으로 불용화 처리 하였다. 이후 2-3일간 물에 담궈서 PEO를 제거해 주었고 동결건조 방법을 통하여 완성된 지지체를 제작하였다.

1.1.5. 3D 나노 섬유 지지체 제작 과정(염화 나트륨 전기방사 방법)

위와 동일한 방법으로 전기방사를 시행하되 드럼 모양의 수집기와 염화 나트륨(200mm 크기)입자를 사용하여 전기방사를 시행하였다. 회전하는 드럼 수집기에 전기방사를 시행하며, 드럼 상단부에서 염화 나트륨 입자를 떨어 뜨려 주어 나노 섬유와 염화 나트륨 입자가 혼합 되도록 시행하였다. 이때 35 g/hr 속도로 염화 나트륨을 떨어 뜨려 주었으며, 제작된 후 상기 기술된 방법으로 불용화 처리하였다. 이후 2-3일간 물에 담궈서 염화 나트륨과 PEO를 제거해 주었고 동결건조 방법을 통하여 완성된 지지체를 제작하였다.

각각의 다른 방법으로 제작한 나노 섬유 지지체를 인공 피부로 응용하기 위한 기초적인 물성 평가 및 구조적 특징을 분석하기 위해 육안적 관찰, 전자 주사현미경, 팽윤도, 물 흡수율, 공극률, 세포 증식 및 침투율을 확인 하였다.

1.2. 관찰 결과

1.2.1. 전자 주사 현미경 관찰 결과

전자 주사 현미경으로 제작된 나노 섬유 지지체의 두께 관찰 결과, 일반적인 전기 방사의 경우 0.033 ~ 0.01mm로 관찰 되었고, 염화 나트륨을 사용하여 제조한 전기 방사는 0.14 ~ 0.25mm, cold plate 수집기를 사용하여 제조된 냉각 전기 방사는 8.53 ~ 1.82mm로 매우 두껍게 제조 할수 있었다. 또한 냉각 전기 방사 기술을 이용하여 (도 3A) 최대 10mm의 두께를 가지는 지지체를 제조 할 수 있었으며, plate의 곡선 면에 따라 얼굴, 귀(도 3B)의 형태를 가진 나노 섬유 지지체를 제작 할 수 있었다.

1.2.2. 팽윤도, 물 흡수도 측정

상기 실시 예에서 제작된 나노 섬유 지지체의 접착력을 확인하기 위해, 팽윤도, 물 흡수도 측정기를 이용하여 각 지지체의 팽윤도, 물 흡수도를 확인하였다. 대조군으로는 일반적인 전기방사 지지체와 염화 나트륨을 이용한 전기방사 지지체를 사용하였다.

나노 섬유 지지체를 1x1 cm 크기로 잘라 Saline에 3시간동안 충분히 침지시킨 후 팽윤력을 측정하였다. 팽윤도는 식 (1)에 나타낸 바와 같이 팽윤된 지지체의 무게(W_s)와 건조된 지지체의 무게(W_d)차를 건조된 지지체의 무게로 나누어 백분율로 나타냈다. 물 흡수도는 식 (2)에 나타낸 바와 같이 물을 흡수한 지지체의 무게(W_s)와 건조된 지지체의 무게(W_d)차를 물을 흡수한 지지체의 무게로 나누어 백분율로 나타냈다.

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

$$\text{물 흡수도 (\%)} = \frac{W_s - W_d}{W_s} \times 100$$

1.2.3. 공극률 측정

나노 섬유 지지체를 1x1 cm 크기로 잘라 Saline에 3시간동안 충분히 침지시킨 후 공극률을 측정하였다. 지지체를 넣기전, Saline가 담겨있는 실린더 볼륨을 측정하여 V1으로 기록하였다. 지지체를 넣고 5분간 침지 후 Saline의 총 볼륨을 측정하여 V2로 기록하고, Saline에 침지된 지지체를 제거하고 난 후 실린더의 볼륨을 측정하여 V3로 기록하였다. 마지막으로 지지체의 공극률 측정을 위하여 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{공극률 (\%)} = \frac{(V1 - V3)}{(V2 - V3)} \times 100$$

각각 측정된 팽윤도, 물 흡수율, 공극률은 그림 4에 표로 나타내었다. 팽윤도는 각각 16.97, 2.7, 29.2, 4.9, 31.22, 4.7, 물 흡수도는 94.38, 7.6, 96.63, 2.5, 96.85, 2.4, 공극률은 72.69, 1.4, 75.14, 3.5, 95.46, 6.5로 측정되었다.

지지체의 공극이 커질수록 팽윤도, 물흡수율, 공극률이 높아지는 것을 확인 하였으며, 이것은 세포와 세포 사이의 물질대사가 비교적 쉽게 일어 날 수 있는 가능성과 신호 및 세포 분화에 필요한 단백질을 지지체가 좀 더 오래 포집 할 수 있을 것으로 예상된다.

1.2.4. 세포 부착력 및 지지체 침투력 테스트

세포 부착력 및 지지체 침투력을 테스트하기 위하여 세포 배양을 진행하였다. 각각의 지지체는 지름 6mm로 절단한 후 70 % 알코올 및 자외선에서 멸균 후 96well에 넣어 두었다. 세포는 랫트의 섬유아세포(NIH 3T3)를 사용하였으며 2×10^5 cell/ml의 세포를 각각의 지지체에 100ml (2×10^4 cell/100ml)씩 분주 하였다. 세포의 지지체 부착이 쉽도록 30분동안 37, 5% CO₂인큐베이터에서 배양하고 난 후 새로운 배지(media)를 100ml씩 더 넣어 주었다. 세포배지는 DMEM (10% FBS, 1% A/A)을 사용하였고, 주 2회 새로운 배지로 갈아주며 37도, 5% CO₂ 인큐베이터에서 14일 배양하였다. 관찰 시기에 세포를 고정한 후 전자 주사 현미경으로 관찰 하였다.

표면 관찰결과 차이점 없이 모두 세포가 잘 자라고 있는 것으로 판단되며, 실크 피브로인 냉각 전기방사의 구조가 일반적인 전기 방사에 비해 지지체 안쪽으로 세포가 파고 들어가 증식하고 있는 것을 확인 할 수 있음.

1.2.5. 형광염색을 통한 조직학적 관찰

위와 동일한 조건으로 세포 배양한 관찰 시기에 지지체를 4% 파라포름알데하이드 (paraformaldehyde, PFA)에 4 시간동안 보관하여 세포를 고정 시켰다. 일반적인 파라핀 섹션 (paraffin section) 과정을 진행하여 지지체의 단면적을 관찰하였으며, 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)로 세포의 핵을 염색하였다. 관찰은 DAPI 필터와 FITC 필터를 사용하였으며 세포의 핵은 파란색으로, 실크피브로인은 자발형광 (autofluorescent)을 가지기 때문에 녹색으로 관찰되었다. 관찰 결과 냉각 전기 방사를 사용한 나노 섬유 지지체에서 많은 세포의 개수와 지지체 깊숙히 파고들어 증식 한 것으로 관찰되었다.

1.2.6. 지지체 세포의 침투력

위와 동일하게 섬유아세포(NIH 3T3)를 4 주 동안 배양한 후, 4% 파라포름알데하이드 (paraformaldehyde, PFA)에 4시간동안 보관하여 세포를 고정 시켰다. 일반적인 파라핀 섹션 (paraffin section) 과정을 진행하여 지지체의 단면적을 관찰하였으며, 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)로 세포의 핵을 염색하였다. 관찰은 DAPI 필

터와 FITC 필터를 사용하였으며 세포의 핵은 파란색으로, 실크피브로인은 자발형광 (autofluorescent)을 가지기 때문에 녹색으로 관찰되었다. 관찰 결과 냉각 전기방사에서 많은 세포의 개수와 지지체 깊숙히 파고들어 증식한 것으로 관찰되었고, 따라서 본 발명에 따른 인공 피부 배양시 세포 증식률 및 침투력이 탁월 할 것으로 생각된다.

2. 인공 피부 제작

2.1. 습도의 조절로 변화 가능한 공극구조와 이를 응용한 인공 피부에 적합한 냉각 전기방사

상기 기술한 냉각 전기방사방법을 이용하여 서로 다른 습도에서 지지체를 제작하였다. 위와 동일한 조건에서 시행되었지만 습도를 달리하면 얼음이 생성되는 시간이 달라지며, 결과적으로 공극 크기의 변화를 유도 한다. 각각 습도 30%, 50%, 90%로 제작하였으며 전자주사 현미경을 이용하여 지지체를 관찰하였다.

2.2. 냉각 전기방사 지지체를 이용한 인공피부 제작

인공 피부를 제작하기 위하여 세포 배양을 진행하였다. 각각의 지지체는 지름 6mm로 절단한 후 70 % 알코올 및 자외선에서 멸균 후 96well에 넣어 두었다. 세포는 인간 진피 섬유아세포와 인간 피부 각질 형성 세포를 사용하였다.

세포배지는 DMEM (10% FBS, 1% A/A)을 사용하여 96 well 배양 접시에 2×10^4 cell/1 분주하고 37, 5% CO₂인큐베이터에서 7일동안 배양하였다. 멸균된 지지체를 세포 위에 얹고 다시 7일간 배양하였다. 같은 양의 인간 진피 섬유아세포를 지지체 위에 한번 더 분주하고 각각 7, 14, 21동안 배양하였다. 그 후 인간 피부 각질 형성 세포를 5×10^5 cell/1001를 지지체 위에 분주하고 5일동안 배양하였다. 이 후 16동안 지지체의 상단 부분만 공기에 노출되도록 배양하여 각질 형성 세포의 각질화를 유도하였다.

관찰 시기에 세포를 고정한 후 염색하여 현미경으로 관찰하였다.

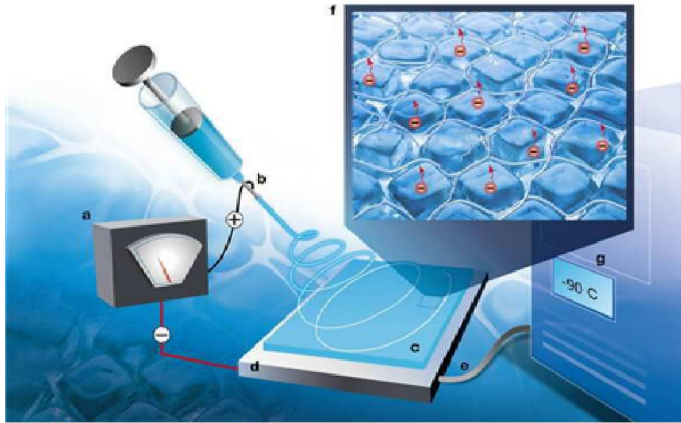
2.3. 인공피부의 조직학적 관찰

관찰을 위해 제작된 인공피부를 4% 파라포름알데하이드 (paraformaldehyde, PFA)에 4시간동안 보관하여 세포를 고정 시켰다. 일반적인 파라핀 섹션 (paraffin section) 과정을 진행하여 Hematocyclin Eosin 염색 후 관찰하였다. 또한 Massons Trichrom 염색을 통하여 콜라겐 침착을 관찰하였다.

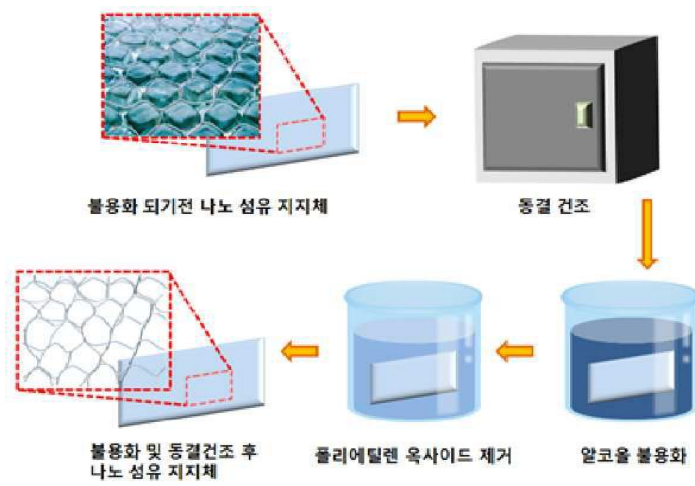
관찰결과 습도 50% 조건에서 냉각 전기방사한 지지체의 인공피부가 우수했다. 6,7,8 주 배양결과 배양 기간이 늘어남에 따라 인간 피부 각질 형성 세포의 각질화가 진행되는 것이 관찰 되었고, 8주차 Masson's Trichoem의 결과 콜라겐의 침착 형성이 관찰됨에 따라, 이것은 피부로써의 구조적 형태와 유사해 졌다는 것을 확인 할 수 있었다.

도면

도면1



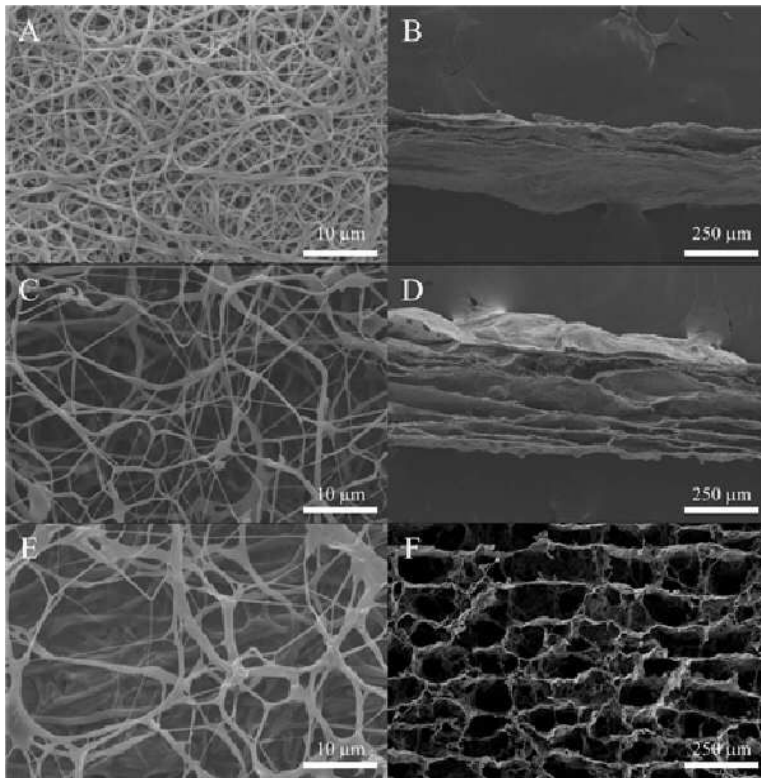
도면2



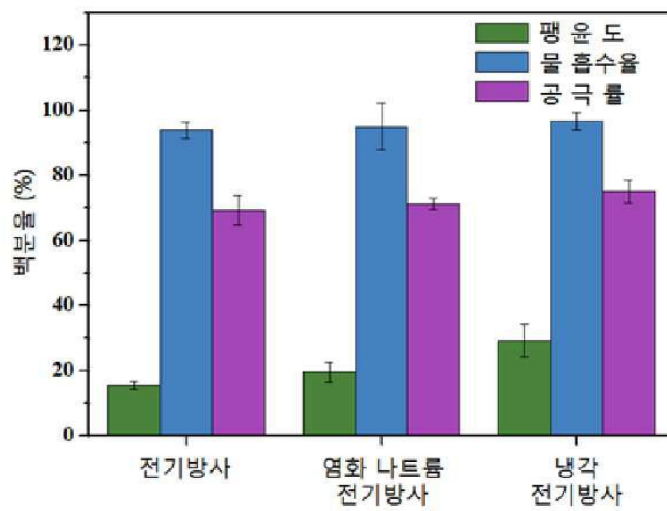
도면3



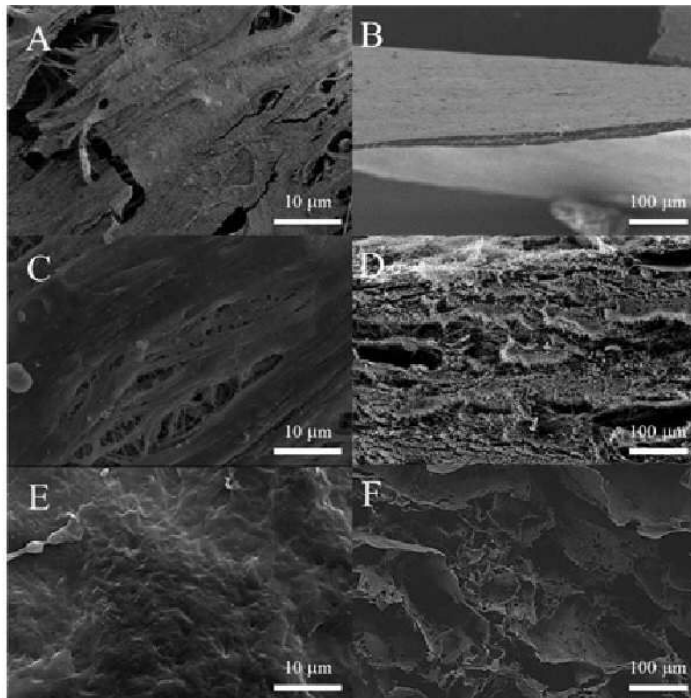
도면4



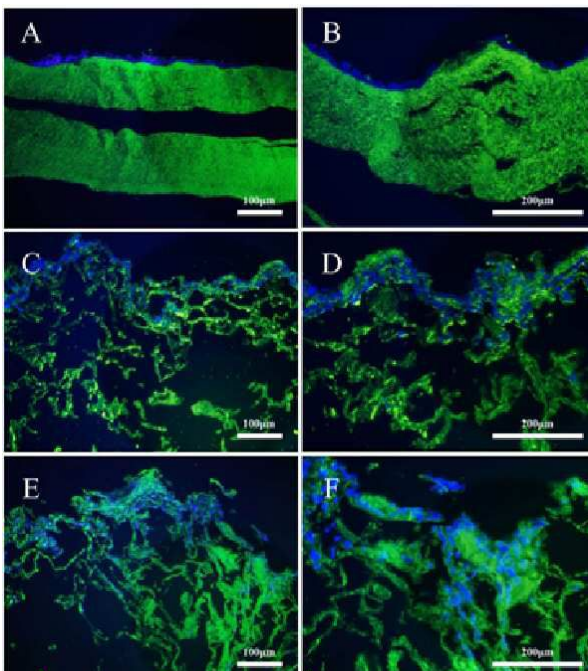
도면5



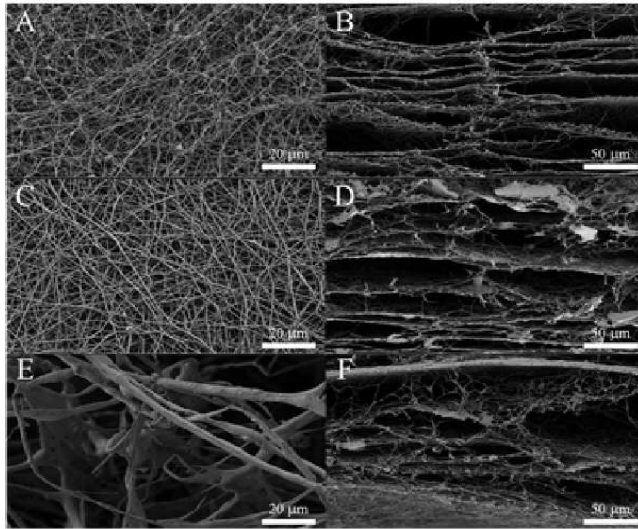
도면6



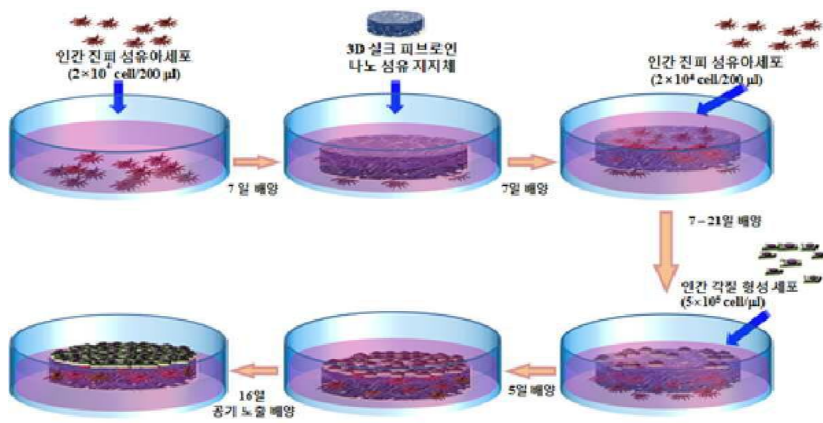
도면7



도면8



도면9



도면10

