

3차원 구조의 카본 나노튜브의

생명공학 소재 응용 기술

University of Liverpool

작성자 : 이준영

1. 기술 개요

카본 구조는 플러린과 카본 나노튜브의 발견 이후로 그것들의 독특한 구조와 전기적, 기계적 성질들 때문에 중요한 주목을 받아오고 있으며, 최근에는 서로 다른 카본 구조와의 혼성화와 복합체 [1-2], 센서 [3], 전기화학 [4], 나노스케일 전기장치 [6-10] 등 새로운 응용분야에 적용하려는 연구가 집중되고 있다. 더욱이 바이오 응용 소재로서 카본 나노튜브는 많은 관심을 받고 있다 [11].

본 기술은 유럽 독일 CAESAR 기관의 M. Giersig 그룹에 의해 활발하게 연구되어지고 있다. 구체적으로 화학적으로 모세관력에 의해 박막형태의 다중벽 카본나노튜브를 제조하며, 이 제조 과정 동안 카본나노튜브는 수직으로 재배열 시키며, 서로 연결되어져서 고정되어진 3차원 구조를 이루게 된다. 그러한 나노스케일의 구조적 특성 때문에 조직공학과 같은 바이오 소재에 중요하게 응용될 수 있다. 이는 fibroblast 세포(L929)의 성장, 확산, 접착 등 조직공학용 스캐폴드로서 여러 가능성을 이미 시사하였다. 또한 일례로 수많은 연구가 카본 나노튜브와 살아있는 포유동물 세포를 이용하여 행해졌는데, Webster 그룹은 [12] 폴리카보네이트 우레탄 지지체와 카본 나노섬유로 구성된 복합체에서 신경 및 골세포의 세포 감응 연구를 진행하였다. 본 연구에 의하면 신경 및 골조직 임플란트의 결합에서 성공적으로 세포 감응이 이루어졌다. 또한 Khan 은 연골조직 재생을 위한 카본 나노튜브 복합체의 가능성을 평가하기 위하여 연구를 수행하였다 [13]. Supronowicz 그룹은 [14] 전기적 신호에 의하여 감응하는 세포에 사용될 수 있도록 폴리락틱 액시드와 카본 나노튜브의 블렌드에 의

하여 제조된 나노 복합체의 응용에 대하여 보고하였다. 이에 Mattson 은 [15-16] 카본 나노튜브에 바이오 활성 분자의 코팅에 의하여 제조된 복합체의 신경세포 성장과 전기적 차지의 영향에 따라 어떠한 도움을 줄 수 있는지에 연구를 진행하였다. 또한 카본 나노튜브가 2차원, 또는 3차원적으로 상호 연결되어진 구조로 구현된다면 세포 성장과 조직 모델링에 대한 수많은 응용이 예상되어지고 있다. 특히 다중벽 카본 나노튜브는 기계적 및 전기적 물성뿐만 아니라 그것들은 3차원 구조로 구조화 되어질 수 있다. 그것들은 세포 성장과 vitro 세포 모델링 그리고 생물학적 응용분야에서 새로운 조직 공학적 소재로 이용하기 위한 구조로 이용되기에 이상적인 3차원 구조를 이루고 있다. 본 연구 기술에서는 상호 연결되어진 3차원적 네트워크 구조의 다중벽 카본 나노튜브를 이용하여 쥐 fibroblast 세포 (L929) 성장에 대하여 소개하고자 한다. 사용되어지는 세포의 크기 및 모양에 따라 기공의 규칙적 배열이 세포의 접착 및 성장에 도움이 되도록 최적화 되어졌다. 본 기술의 일반적인 모식도를 그림 1에 소개하였다.

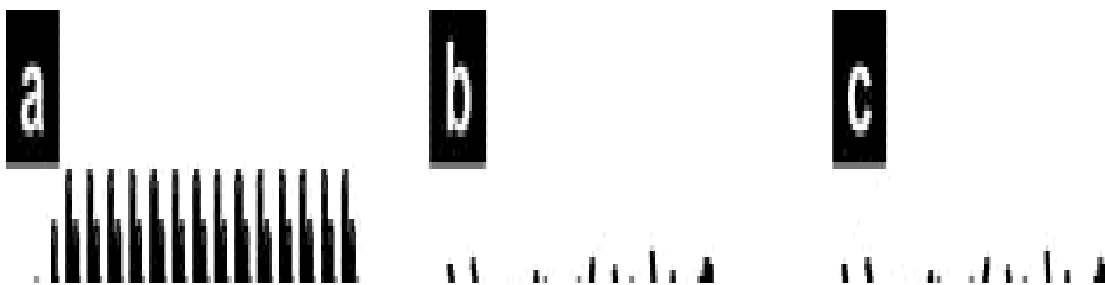


Figure 1. Representation of the general method used to fabricate 3D MWCNT-based network and its application as a scaffold for cell growth. (A) MWCNTs perpendicularly aligned to the substrate. (B) The latter were chemically treated to obtain a cross-linked 3D structure. (C) The 3D network, like a scaffold, favors the cell growth.

2. 3D 구조 다중벽 카본 나노튜브

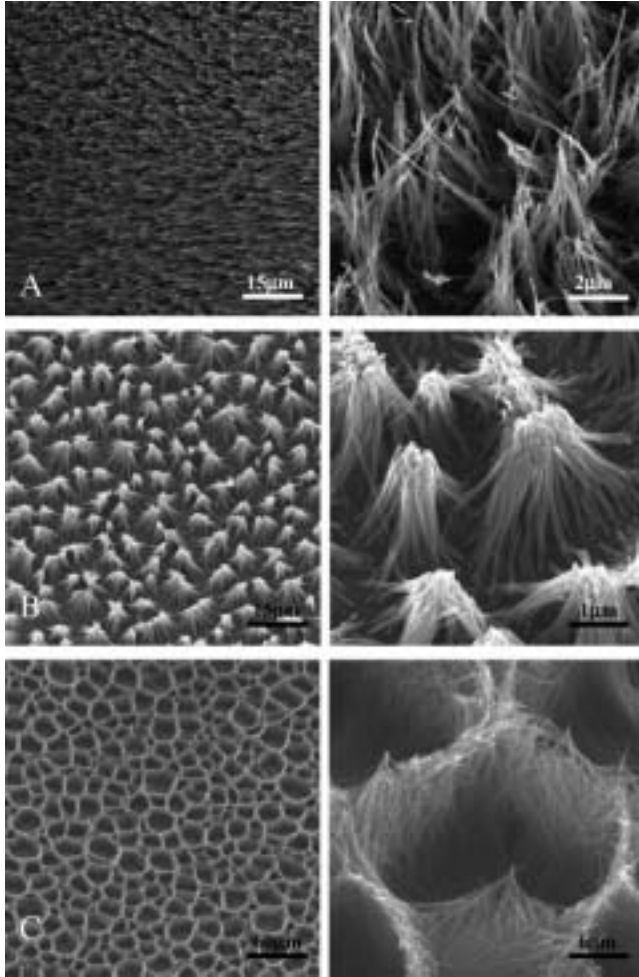
일차적으로 수직으로 배열되어진 다중벽 카본 나노튜브는 촉매로서 니켈을 사용하여 실리콘 지지체 위에 화학적 증기 증착 방법[17]에 의하여 제조되어진다. 또한 수직 배열된 다중벽 카본 나노튜브의 지지체는 그 양쪽 벽의 흡과 양

쪽 끝에 카르복실 그룹을 도입하기 위하여 산화공정 단계를 거친 후 기능화 되어진다. (산 용액: nitric/sulfuric (1:3) acid solution, 12시간)

기능화와 동시에 그 산 용액은 다중벽 카본 나노튜브의 3차원 구조를 야기할 수 있는 모세관력과 인장력을 유도하게 된다. 그러므로 산 용액에 의하여 나노튜브들 사이에 모세관력과 인장력을 이끌 수 있으며, 전체 실리콘 지지체에 산 용액을 확산시켜 줌으로서 배열된 나노튜브의 사이사이 공간을 메꾸어 줄 수 있다. 이러한 공정 기술은 산 용액에 정역학적 팽창 스트레스를 부여하며 그것은 나노튜브의 편평화를 유도하고 또한 더 큰 밀도를 야기시킨다. 반대 방향으로부터 붕괴되는 나노튜브가 낮은 밀도 영역에서 만났을 때 3차원 구조가 형성 되어진다. 즉 실리콘 지지체위에 수직으로 튜브 벽들을 갖는 honeycomb 모양의 다각형으로 구성되어 있다. 그 후에 제조된 스캐폴더 내로 즉, 3차원 구조의 표면으로 fibroblast 세포의 도입은 수행되어진다.

Figure 2. Examination by SEM of the different MWCNT-based structures. (A) Perpendicular aligned carbon nanotubes. (B) The latter after a physicochemical treatment forming pyramid-like structure with basal planes of ca. 3 μm . (C) Network of crosslinked carbon nanotube walls forming cavities.

그림 2 는 나노튜브의 기능화 공정 이후에 3차원 스캐폴더를 형성하는 실리콘 지지체에 결합되어진 50 μm 길이(Figure 2A)로 배열되어진 카본 나노튜브의 SEM 이미지들을 보여준다. 또한 배열되어진 다중벽 카본 나노튜브의 길이에 따라 그것들의 공간적 분포를 조절할 수 있다. 즉, 본 기술은 피라미드 형태의 구조로(Figure 2B) 제조하는 곳에도 사용될 수 있으며, 또한 특정 세포들을



도입시키기에 충분한 상호 연결된 기공들의 공간을 갖는 구조를 구현할 수 있다(Figure 2C).

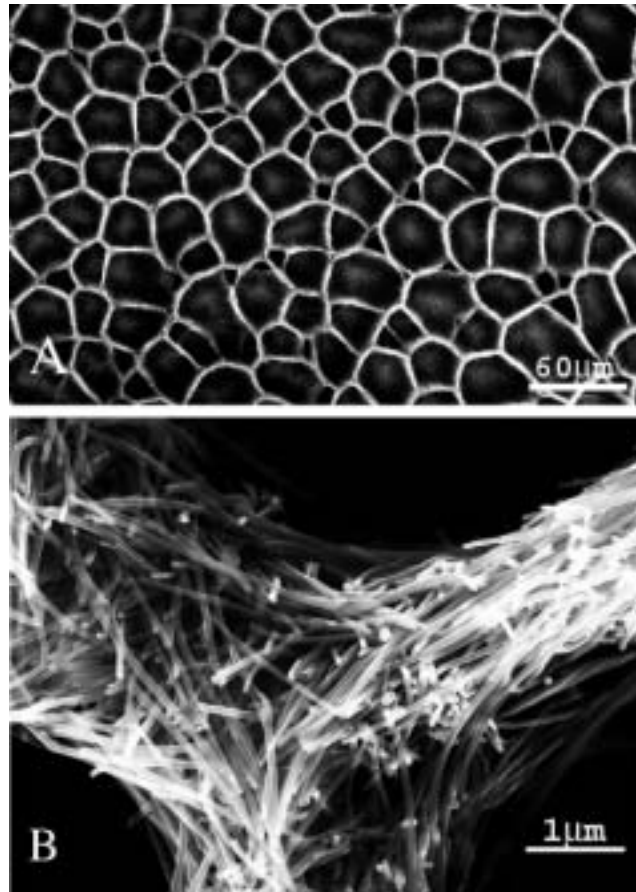


Figure 3. Examination by SEM of the MWCNT-based walls. (A) 3D networks of 50 μm length carbon nanotubes. (B) High magnification image of intercrossed carbon nanotubes in the walls of the cavities.

50 - 35 μm 의 길이를 갖는 다중벽 카본 나노튜브를 조절하는 것에 의해 5-60 μm 와 5-15 μm 의 직경들 사이에서 다양한 기공들은 얻어질 수 있다. 네트워크 구조의 카본 나노튜브(Figure 3A) 벽들의 High-resolution SEM 이미지는 세포들의 접촉이 가능한 커다란 표면적을 가지고 있음을 보여준다(Figure 3B). 또한 가교되어진 네트워크 구조는 다중벽 카본 나노튜브의 기계적 물성의 향상에 더욱 도움을 준다.

3. 다중벽 카본 나노튜브의 3차원 조 내 세포(L929) 배양

위에서 언급한 것처럼 다중벽 탄소 나노튜브의 3차원 구조 위에 쥐의 fibroblast 세포 L929 (상호 연결된 조직 세포들)의 감응을 관찰하였다. 즉 본 실험을 위해 스캐폴더는 30분 동안 UV 자외선에 살균되었다. 그 이후에 다중벽 탄소 나노튜브 스캐폴더($\sim 0.5 \text{ cm}^2$)는 육면 플레이트 위에 놓여지며, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)과 10% fetal calf serum, 2 mmol/L glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 g/mL streptomycin의 보충 하에 L929 의 세포들을 배양하였다(5% CO_2 를 포함하는 다습한 공간, 1 일 또는 7 일간). 다중벽 탄소 나노튜브 네트워크 구조위에서 세포의 성장과 그 형태는 SEM에 의해 측정되어졌다. 그 시료들은 Earle's buffered saline solution으로 세척되며, 2.5% glutardialdehyde 에 의해 고정화되었다. (0.1 mol/L cacodylate buffer, pH 7.4, 2 시간, 4 $^{\circ}\text{C}$). 또한 반복적으로 여러 번 세척 과정을 거친 후 그 시료들은 에탄올로 탈수시켜주며, 공매질로서 hexamethyldisilazane 을 사용하여 건조시켜준다. 7 nm 의 골드 스퍼터링에 의해 샘플을 코팅한 후 SEM에 의하여 그 구조 및 세포의 모폴로지를 관찰한다.

그림 4 는 다중벽 탄소 나노튜브 네트워크 구조위에 형성된 L929 세포들의 특정 모폴로지를 보여준다. 1일 후에 대부분의 L929 세포들은 다중벽 탄소 나노튜브 표면에 접촉되어있다 (Figure 4A, B). 분리되어져서 크게 뻗어있는 세포들은 기공들의 벽면에 붙어있으며 가늘고 길게 세포질이 돌출되어 있는 모습을 보여준다(Figure 4B). 또한 세포들은 더 낮은 표면으로부터 짧게 돌출되어 있는 모양으로 기공의 바닥면에 붙어있는 것을 볼 수 있다(arrows, magnified inset Figure 4B). 세포 성장 7일 후에 fibroblast 는 다중벽 탄소 나노튜브 네트워크 표면을 한층으로 완전히 덮고 있다(Figure 4C, D).

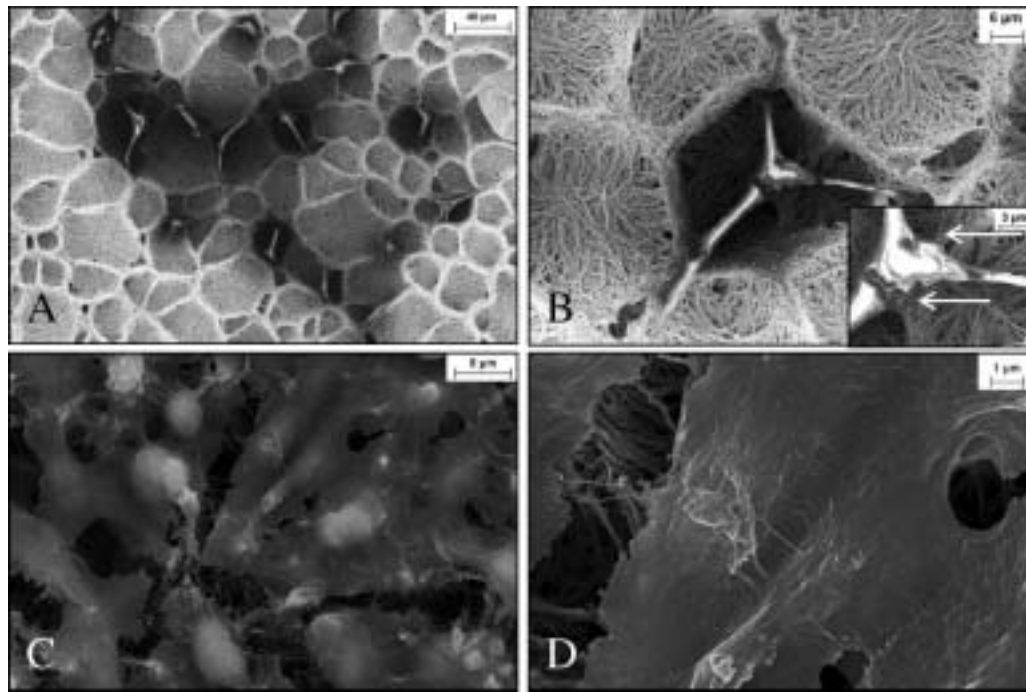


Figure 4. Scanning electron micrographs of L929 mouse fibroblasts growing on MWCNT-based network. (A,B) After 1 day. (C,D) After 7 days.

다중벽 카본 나노튜브 위에서 배양되었을 때 L929 세포의 생명력은 [3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazoliumbromide] (MTT) 를 사용하여 평가한 것과 비교 시 동일한 것으로 나타났다[18-19]. 특히 다중벽 카본 나노튜브는 L929 세포들에 독성을 보이지는 않음을 알 수 있다. 비록 다중벽 카본 나노튜브가 강력한 결합 성질을 가지고 있다고 알려졌을지라도 Giersig 그룹은 어떠한 추가적 결합력을 개선하는 것 없이 3차원 구조에서 다중벽 카본 나노튜브와 세포들의 적합성을 고찰하였다. 한마디로 이에 대한 결과는 초기의 가설과 일치한다. 3차원 구조를 갖는 다중벽 카본 나노튜브 네트워크는 고도로 바이오 친화성을 가지고 있으며 또한 조직 형성에 있어서 매우 강력한 구조를 제공한다.

4. 결론

본 기술의 목표는 세포의 배양과 성장을 위하여 표면 나노조직, 구조적 측면

에서 3차원 구조의 다중벽 카본 나노튜브를 특성화하는 것이다. 3차원 구조의 다중벽 카본 나노튜브 네트워크는 그 구조 위에 세포들의 개수, 크기, 잘 배열된 공간들을 조절하여 중요한 세포들과의 친화성 등 조직공학용 스캐폴더로서 응용할 수 있음을 보여준다. 마지막으로 그 구조는 기능적, 기계적, 물질 전달 측면에서 여러 가지 요구조건을 만족해야 하는데 3차원 구조의 스캐폴더는 이러한 제한조건을 만족시킬 수 있다. Kotov 그룹[20]은 최근에 규칙적인 상호연관 기공 배열 구조를 갖는 합성 3D 스캐폴더의 중요성을 지적하였다. 다양한 세포들의 배양을 위한 스캐폴더는 조직 구조에 부합되어야 하며 또한 조직 재생동안 세포들의 상호작용과 운동성의 연구가 수반되어야 한다[20-21]. 다중벽 카본 나노튜브의 3차원 네트워크 구조는 fibroblast 세포의 성장과 접착에 있어서 스캐폴더로 중요하게 이용되어질 수 있다. 합성고분자와 다르게 다중벽 카본 나노튜브는 유독성의 부산물을 발생시키지 않는다. 또한 다중벽 카본 나노튜브의 3차원 네트워크는 vivo 테스트에서 어떠한 외부 힘에 대해서도 그 모양을 유지할 수 있는 기계적 성질과 구조적 완전함, 안정성을 가지고 있다. 그것들은 생체적합성이 우수하며, 약물 전달체 또는 손상되어지고 약화되어진 조직들의 재생에 있어서 중요한 역할을 할 수 있다.

5. 참고문헌

- (1) Biercuk, M. J.; Llaguno, M. C.; Radosavljevic, M.; Hyun, J. K.; Johnson, A. T.; Fischer, J. E. *Appl. Phys. Lett.* **2002**, *80*, 2767.
- (2) Qian, D.; Dickey, E. C.; Andrews, R.; Rantell, T. *Appl. Phys. Lett.* **2000**, *76*, 2868.
- (3) Kempa, K.; Kimball, B.; Rybczynski, J.; Huang, Z. P.; Wu, P. F.; Steeves, D.; Sennett, M.; Giersig, M.; Rao, D. V. G. L. N.; Carnahan, D. L.; Wang, D. Z.; Lao, J. Y.; Li, W. Z.; Ren, Z. F. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 13.
- (4) Kim, P.; Lieber, C. M. *Science* **1999**, *286*, 2148.
- (5) An, K. H.; Kim, W. S.; Park, Y. S.; Moon, J. M.; Bae, D. J.; Lim, S. C.; Lee, Y. S.; Lee, Y. H. *Adv. Funct. Mater.* **2001**, *11*, 387.
- (6) Bachtold, A.; Hadley, P.; Nakanishi, T.; Dekker, C. *Science* **2001**, *294*, 1317.
- (7) Yao, Z.; Postma, H. W. Ch.; Balents, L.; Dekker, C. *Nature* **1999**, *402*, 273.

- (8) Fuhrer, M. S.; Nygard, J.; Shih, L.; Forero, M.; Yoon, Y. G.; Mazzoni, M. S. C.; Choi, H. J.; Ihm, J.; Louie, S. G.; Zettl, A.; McEuen, P. L. *Science* **2000**, *288*, 494.
- (9) Rueckes, T.; Kim, K.; Joselevich, E.; Tseng, G. Y.; Cheung, C. L.; Lieber, C. M. *Science* **2000**, *289*, 94.
- (10) Franklin, N. R.; Li, Y. M.; Chen, R. J.; Javey, A.; Dai, H. J. *Appl. Phys. Lett.* **2001**, *79*, 4571.
- (11) Rojas-Chapana, J. A.; Correa-Duarte, M. A.; Ren, Z.; Kempa, K.; Giersig, M. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 985.
- (12) Webster, T. J.; Waid, M. C.; McKenzie, J. L.; Price, R.; Ejiogor, J. U. *Nanotechnology* **2004**, *15*, 48.
- (13) Khan, S. S. <http://dspace.library.drexel.edu/handle/1860/220>.
- (14) Supronowicz, P. R.; Ajayan, P. M.; Ullmann, K. R.; Arulanandam, B. P.; Metzger, D. W.; Bizios, R. J. *Biomed. Mater. Res.* **2002**, *5*, 499.
- (15) Mattson, M. P.; Haddon, R. C.; Rao, A. M. *J. Mol. Neurosci.* **2000**, *14*, 175.
- (16) Hu, H.; Ni, Y.; Montana, V.; Haddon, R. C.; Parpura, V. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 507.
- (17) Li, W. Z.; Wen, J. G.; Tu, Y.; Ren, Z. F. *Appl. Phys. A* **2001**, *73*, 259.
- (18) Ciapetti, G.; Granchi, D.; Stea, S.; Savarino, L.; Verri, E.; Gori, A.; Savioli, F.; Montanaro, L. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *42*, 485.
- (19) Mockers, O.; Deroze, D.; Camps, J. *Dent. Mater.* **2002**, *18*, 311.
- (20) Kotov, N. A.; Liu, Y.; Wang, S.; Cumming, C.; Eghtedari, M.; Vargas, G.; Motamedi, M.; Nichols, J.; Cortiella J. *Langmuir* **2004**, *20*, 7887.
- (21) Sachlos, E.; Czernuska, J. T. *Eur. Cells Mater.* **2003**, *5*, 29.