

2014년 2월

碩士學位論文

세포친화적 표면을 갖는 3차원 PCL 스캐폴드 제조에 관한 연구

조선대학교 대학원

치 의 학 과

최 익 택

세포친화적 표면을 갖는 3차원 PCL 스캐폴드 제조에 관한 연구

A study on the fabrication of three dimensional
polycaprolactone scaffold with cell affinity

2014年 2月 25日

조선대학교 대학원

치 의 학 과

최 익 택

세포친화적 표면을 갖는 3차원 PCL 스캐폴드 제조에 관한 연구

지도교수 고 영 무

이 논문을 치의학 석사학위신청 논문으로 제출함.

2013年 10月

조선대학교 대학원

치 의 학 과

최 익 택

최익택의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 김 병 훈 印

위 원 조선대학교 교수 유 지 원 印

위 원 조선대학교 교수 고 영 무 印

2013年 11月

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT	iv
제 1장 서 론	1
제 2장 실험재료 및 방법	4
제 1절 3차원 PCL 스캐폴드 제작 ...	4
제 2절 아세톤 표면처리 ...	8
제 3절 표면분석 ...	9
제 4절 조골모세포 배양 ...	10
제 5절 조골모세포 증식 ...	11
제 6절 세포형상 관찰 ...	12
제 7절 통계학적 분석 ...	13
제 3장 실험결과 및 고찰	14
제 1절 표면분석 ...	14
제 2절 조골모세포 부착 및 증식 ...	18
제 4장 고찰	22
제 5장 결론	23
참 고 문 헌	24

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Ring opening polymerization of poly- ϵ -caprolactone.	3
Fig. 2. Schematic diagram of 3D Bio-extruder equipment.	5
Fig. 3. The structure of (a) Top viewed of 3D PCL scaffold sample, (b) Cross section viewed of 3D PCL scaffold sample	6
Fig. 4. The photograph of 3D PCL scaffold sample.....	7
Fig. 5. SEM micrographs of (a) untreated PCL scaffold, (b) acetone etched PCL scaffold for 15 sec, and (c) acetone etched PCL scaffold for 30 sec.....	15
Fig. 6. AFM surface topography of (a) untreated PCL scaffold, (b) acetone etched PCL scaffold for 15 sec, and (c) acetone etched PCL scaffold for 30 sec.....	16
Fig. 7. Water contact angles of (a) untreated PCL scaffold, (b) acetone etched PCL scaffold for 15 sec, and (c) acetone etched PCL scaffold for 30 sec.....	17
Fig. 8. The proliferations of MC3T3-E1 cell seeded on (a) untreated PCL scaffold, (b) acetone etched PCL scaffold for 15 sec, and (c) acetone etched PCL scaffold for 1, 3, and 5 days.	19
Fig. 9. The morphology of MC3T3-E1 cell seeded on (a) untreated PCL scaffold, (b) acetone etched PCL scaffold for 15 sec, and (c) acetone etched PCL scaffold for 2 days.....	20
Fig. 10. Fluorescence images of the MC3T3-E1 cell seeded on (a) untreated PCL scaffold, (b) acetone etched PCL scaffold for 15 sec, and	

(c) acetone etched PCL scaffold for 2 days.21

ABSTRACT

A study on the fabrication of three dimensional polycaprolactone scaffold with cell affinity

Ik-Taek Choi, D.D.S, M.S.D

Advisor : Prof. Yeong-Mu Ko, D.D.S.,Ph.D.

Department of Dental Science

Graduate School of Chosun University

In this study, we fabricated the three-dimensional (3D) polycaprolactone (PCL) scaffolds via bio-extruder equipment and then treated surface modification of scaffolds to improve the preosteoblast cell affinity. The surface treatment of PCL scaffolds was carried out at immersing in solvent solution (dichloromethane and acetone=1:9 vol%) for 15 and 30 sec. The surface modified 3D PCL scaffolds was characterized by water contact angles, scanning electron microscopy (SEM), and atomic force microscopy (AFM). The proliferation and cell morphology of MC3T3-E1 preosteoblast cell cultured on 3D PCL scaffolds surface were evaluated by fluorescence microscope and MTT assay, respectively.

The current findings, the following results were drawn.

- 1) Acetone treated 3D PCL scaffolds surface showed the rough surface than that of untreated 3D PCL scaffolds. In addition, as the increasing of immersing time, surface roughness was increased.
- 2) Acetone treated 3D PCL scaffolds surface showed the hydrophilic surface property.
- 3) The cell proliferation test showed that roughness of 3D PCL scaffolds surface was significantly affect cell proliferation.

4) The results of fluorescense stained cell morphology revealed that acetone treated 3D PCL scaffolds provide the excellent surface for MC3T3-E1 cells spreading and colonization.

From this point of view, the acetone treated 3D PCL scaffolds are expected to be useful for the polymer scaffolds in bone tissue engineering applications.

제 1 장 서 론

조직공학(tissue engineering)은 질병 또는 사고로 인해 손상된 인체의 생체조직(tissue)이나 장기(organ)를 재생 또는 대체할 수 있는 방법으로 알려져 왔다(Lee 와 Lee, 2011).

조직공학의 주된 목표는 생체에서 완전히 흡수되고 세포 친화력이 있는 고분자 지지체를 생체조직에 이식함으로써 인체에 거부반응 없이 새로운 장기의 완벽한 조직을 형성하게 하는 것이다. 조직공학에서 생체재료로 제조한 지지체(scaffold)에 대한 관심이 증가하고 있는데, 지지체의 필수조건으로는 세포를 부착하고 물질을 전달할 수 있어야 하고, 조직성장을 유도, 촉진시켜야 하며, 생분해성이고 생체적합성이 뛰어나야 한다는 것이다. 이러한 지지체는 세포가 성장하거나 조직이 분화하는데 이상적인 환경을 제공하기 때문에 조직공학 적용에서 중요한 요소이다(Wang 등, 2010).

지금까지 연구된 지지체 제작 방법에는 가스 발포법(gas foaming), 상 분리법(phase separation), 염 침출법(salt leaching) 등이 있다. 하지만 이 제작 방법은 지지체 내부 기공과 형태가 일정하지 않아 재현성이 떨어진다는 점과 생체재료를 녹이기 위해 유기용매를 사용한다는 단점이 있다. 이러한 단점을 보완하기 위해 최근에 쾌속 조형기술과 3D bioplotting 기술 등을 이용한 많은 연구가 진행되고 있다. 이 제작 방법은 용매를 사용하지 않고 지지체 내부 기공과 형태를 제어할 수 있어, 원하는 기공과 형태를 가진 지지체를 제작할 수 있다는 장점이 있다. 하지만 세포 파종 효율이 떨어지는 단점이 있어, 물리·화학적 개질을 통해 이를 보완하기 위한 연구가 지속적으로 진행되고 있다.

조직공학용 지지체로 쓰이는 합성 고분자 중에서 poly (lactic acid), poly (glycolic acid), poly (ϵ -caprolactone)(PCL) 그리고 이들의 공중합체는 뛰어난 생분해성, 생체적합성, 물리적 특성을 조절할 수 있다는 장점으로 인해 조직공학용 지지체 재료로 널리 사용되고 있다(Duan Y 등, 2007). 이들 합성고분자들로 제작된 지지체와 세포 사이의 상호작용은 matrix의 구조적, 기계적, 화학적 특성에 영향을 받는다고 알려져 있다. 그 중에서도 재

료, pore size, degradation rate, geometry, compliance, elasticity 등 지지체의 물리적 특성이 세포의 성장, 이동, 점착과 같은 활동에 영향을 준다는 사실은 많은 연구자들로부터 보고된 사실이다(Shin, 2011).

생체재료로 많이 연구되고 있는 poly- ϵ -caprolactone (PCL)은 Fig. 1과 같이 ϵ -caprolactone을 개환 중합반응 시켜 만든 생분해성 고분자로, 무독성이고 생체적합성이 우수한 장점이 있다.

본 연구에서는 3D bioplotting 기술을 도입하고, 생체재료인 PCL을 사용하여 지지체를 제작하고, PCL 지지체 표면에 물리적 에칭인 용매 에칭 방법으로 지지체 표면에 거칠기를 발생시켜 조골모세포 파종 효율을 높이고, 생체적합성을 향상시키는 방법에 대하여 연구하였다.

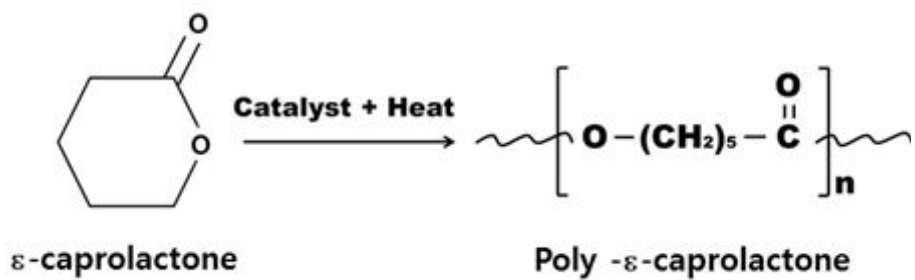


Fig. 1. Ring opening polymerization of poly- ϵ -caprolactone.

제 2 장 실험재료 및 방법

제 1 절 3차원 PCL 스캐폴드 제작

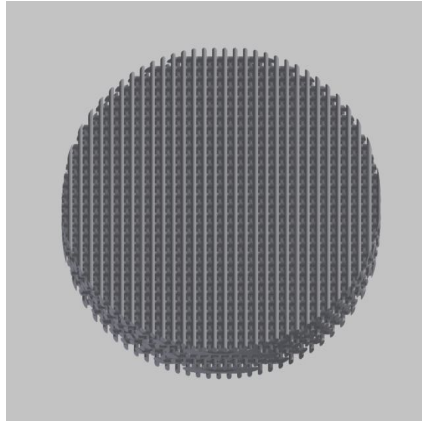
본 실험에서는 3차원 바이오 플로팅 시스템(M4T-100, M4T, Korea)를 이용하였다. 3차원 PCL($M_n=45,000$ Sigma-Aldrich, USA) 스캐폴드의 제작은 PCL을 실린지에 채운 후 90 °C까지 승온시켜 충분히 용융시킨 뒤 3차원 바이오 플로팅 기계의 노즐에서 공기압을 이용하여 일정한 속도로 사출하여 350 μm 의 기공 크기를 갖는 3D PCL 지지체를 제작하였다(Fig. 2). 제작한 스캐폴드는 직경 20 mm, 두께 2 mm 크기를 갖는다. Fig. 3는 3차원 PCL 스캐폴드의 전체적인 구조를 나타내는 모식도이다. (a)는 평면 모식도이고, (b)는 단면을 나타낸 것으로써 기공의 크기는 350 μm 이며, 스트럿은 300 μm 이다.

방출되는 PCL Fiber는 300 μm 의 두께를 가지며, 첫 번째 층이 적층된 이후 다음 층은 90° 교차하여 적층하여 7 층의 두께를 가진다.

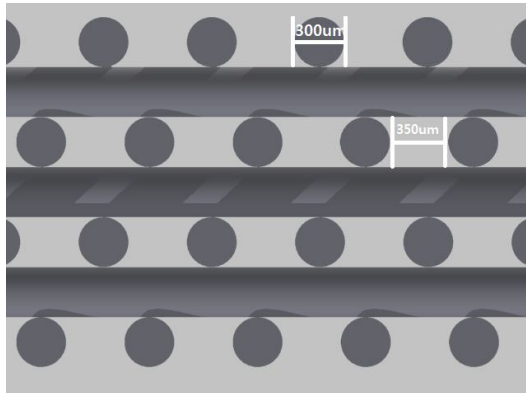
Fig. 4은 본 연구에서 샘플로 사용된 3차원 PCL 스캐폴드의 실물 사진을 나타낸 것이다.



Fig. 2. 3D Bio-extruder equipment.



(a)



(b)

Fig. 3. The structure of 3D PCL scaffold sample.

Fig. 3(a). Top viewed of 3D PCL scaffold sample.

Fig. 3(b). Cross section viewed of 3D PCL scaffold sample.

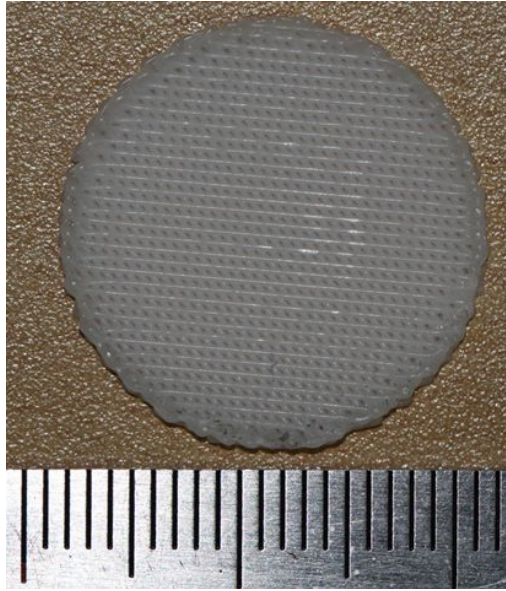


Fig. 4. The photograph of 3D PCL scaffold sample.

제 2 절 아세톤 표면처리

지지체 표면처리 시 용액은 디클로로메탄 (Dichloromethane; 99.0%, Duksan, Korea)과 아세톤 (Acetone; 99.0%, Sigma-Aldrich, USA)을 사용하였다. 용액에 개질시키기 위하여 아세톤 용액과 디클로로메탄과 아세톤 (10% Vol 디클로로메탄과 90% Vol 아세톤) 비로 혼합한 용액 두 가지를 준비하였다(Kumar 등, 2012). 제조한 스캐폴드를 디클로로메탄과 아세톤에 혼합한 용액에 각각 15 초, 30 초 반응시켰다. 반응시킨 스캐폴드를 꺼내 표면에 묻은 잔여 용액을 제거한 후 다시 아세톤에 15 초 반응시켰다. 처리된 샘플은 상온에서 1 시간 동안 건조를 실시하였다.

제 3 절 표면분석

디클로로메탄과 아세톤으로 표면처리 한 3차원 PCL 스캐폴드와 무 처리 3차원 PCL 스캐폴드의 표면형상을 관찰하기 위하여 주사전자현미경(SEM: scanning electron microscopy, SNE-3200M, SEC, Korea)과 원자력간 현미경(AFM: atomic force microscopy, XE-100, Park Systems, Korea)을 사용하였다.

표면개질 된 3차원 PCL 스캐폴드와 무 처리 3차원 PCL 스캐폴드표면의 화학결합 변화를 분석하기 위하여 총 반사율 퓨리에 변환 적외선분광기(ATR-FTIR : Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform-Infrared Spectrometer, Nicolet 380, Thermo Scientific, USA)를 사용하였다.

무 처리 3차원 PCL 스캐폴드 및 표면개질 처리 된 3차원 PCL 스캐폴드 시편의 친수성을 측정하기 위하여 스캐폴드를 상온에서 24시간 건조한 후 물 접촉각을 측정하였다. 각 시편의 접촉각 변화를 관찰하기 위하여 증류수 약 5 μ l를 시편에 떨어뜨린 후, 접촉각 측정기(GS, Surfacetech, Korea)로 5초 후에 접촉각을 측정하였다.

제 4 절 조골모세포 배양

본 실험에 사용된 세포는 생쥐 두개골에서 유래한 조골모세포 MC3T3-E1을 ATCC에 구입하여 사용하였고, 세포배양은 α -MEM (alpha minimum essential medium with ribonucleosides, deoxyribonucleosides, 2mM L-glutamine and 1mM sodium pyruvate, but without ascorbic acid/GIBCO, Custom Product, Catalog NO. A1049001)배지에 growth factor를 제공하는 10% (w/v) fetal bovine sereum (FBS, PAA Laboratoris, Inc. A15-751)과 항생제인 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin이 혼합된 세포배양액을 혼합하여 5% CO₂가 공급되는 37℃, 100% 습도가 유지되는 CO₂ incubator에서 배양하였다. 그리고 3일 마다 80% confluence 할 때 계대 배양 하여 3세대 세포를 실험에 사용하였다.

제 5 절 조골모세포 증식

조골모세포 증식은 MTT assay를 이용하여 평가하였으며, 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 배양된 MC3T3-E1 세포는 α -MEM 배지를 모두 제거한 후 PBS (Phosphate buffered saline, Sigma, USA)를 이용하여 세척하였으며 trypsin/EDTA를 소량 첨가하여 배양접시로부터 분리시켰다. 분리된 세포에 FBS가 포함된 배지를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 원심분리기를 이용하여 세포를 수집하였다. 세포에 배지를 첨가하여 다시 부유 시킨 후 준비된 샘플이 담겨진 12-well plate에 각각 1×10^5 cells/well을 파종하였다. 1, 3, 5일이 되면 MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide, Sigma-aldrich, M2128)시약을 각 well 당 $100 \mu\text{l}$ 첨가하여 청자색의 결정이 생성되는 것을 확인하였다. 4 시간 후 DMSO (dimethyl sulfoxide, Junsei, 35535-0350)를 $1,000 \mu\text{l}/\text{well}$ 을 넣은 후 실온에서 30 분간 배양하였다.

흡광도를 측정하기 위해 반응액을 96-well plate에 각각 $200 \mu\text{l}$ 씩 분주한 후 ELISA reader (Thermal Fisher SCIENTIFIC)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

제 6 절 세포형상 관찰

1. 주사전자현미경에 의한 관찰을 위한 세포 전처리

준비된 샘플이 담겨진 12 well plate에 배양된 MC3T3-E1 세포를 2×10^5 cells/mL의 농도로 파종하였다. 그리고 3일 후 2.5%의 Paraformaldehyde(Electron Microscopy Sciences 15714)와 Glutaraldehyde(SIGMA ALDRICH G5882)의 혼합용액으로 2시간 전 고정을 하여 주었고 10분 동안 PBS를 이용하여 세척하여 준 후 Osmium tetroxide(SIGMA ALDRICH 201030)를 이용하여 30분 동안 후 고정을 진행하였다. 70%, 90%, 95%, 100% 알코올을 준비하여 건조시켜 주었고 HMDS(Fluka 52619)를 이용하여 샘플위에 남아있는 알코올을 제거하였다.

2. 형광현미경에 의한 관찰을 위한 세포전처리

준비된 샘플이 담겨진 12 well plate에 배양된 MC3T3-E1 세포를 1×10^5 cells/mL의 농도로 파종하였다. 3일 후 4% Paraformaldehyde(Electron Microscopy Sciences 15714) 용액을 이용하여 세포를 고정하여 준 후 5분 동안 PBS를 이용하여 세척하였다. 0.1% Triton X-100(바이오 세상 T1020)과 1% BSA(SIGMA A9647) 용액을 이용하여 5분 동안 투과 처리하여 주었고 Rhodamine-phalloidin(Life technologies, R415) 시약을 15분 동안 처리하여 세포를 염색하였다. 3번에 걸쳐 각각 5분 동안 PBS로 세척하여 준 후 세포 핵 염색을 위한 Fluorescence mounting media(VECTOR H-1200)와 함께 PCL 필름 샘플을 cover glass 위에 부착하여 형광현미경으로 관찰하기 전까지 4°C에서 보관하였다.

제 7 절 통계학적 분석

모든 실험 데이터는 T-test 분석을 통하여 신뢰도 95% ($p < 0.05$) 내에서 변수의 비교를 통하여 각각의 유의성 차이를 비교하였다.

제 3 장 실험결과

제 1 절 표면분석

Fig.5는 3차원 PCL 스캐폴드와, 디클로로메탄과 아세톤을 혼합한 용액에 각각 15 초, 30 초 동안 표면처리 한 3차원 PCL 스캐폴드의 주사전자현미경 사진이다. 무 처리 PCL 스캐폴드의 표면은 비교적 평탄한 모습을 보이는 반면에 아세톤 혼합용액으로 표면처리 한 PCL 스캐폴드 표면은 거칠기가 상당히 증가되었음을 알 수 있었다. 그리고 표면처리 시간(용매 담지시간)이 증가할수록 표면의 거칠기가 증가한 것을 관찰 할 수 있었으며, 30초 이상 용매에 넣어 두었을 때는 PCL 고분자물성이 변하여 스캐폴드로서 사용할 수가 없었다.

Fig. 6은 3차원 PCL 스캐폴드의 표면 거칠기를 AFM으로 관찰한 사진이다. 거칠기는 Rq값 (제곱평균 거칠기)으로 나타내었다. 아세톤 혼합 용액에 의해 처리되는 시간에 따라 Rq 값이 증가함을 알 수 있었다. 무 처리 3차원 PCL 스캐폴드의 경우 Rq 값은 175 nm 에 불과한 반면에 아세톤 혼합용액에 각각 15 초, 30 초 동안 처리 한 3차원 PCL 스캐폴드의 경우 Rq 값이 981 nm, 1158 nm 로 약 5.6배, 약 6.6배 향상됨을 알 수 있었다.

이러한 결과로부터 아세톤 혼합용액 담지법은 3차원 PCL 고분자 스캐폴드의 표면 거칠기 부여에 상당히 효과적인 방법임을 확인 할 수 있었다.

Fig. 7 은 3차원 바이오 플로팅 방법을 이용하여 제작한 3차원 PCL 스캐폴드와, 디클로로메탄과 아세톤을 혼합한 용액에 각각 15 초, 30 초 처리 한 후 아세톤에 30 초 동안 재 처리 한 3차원 PCL 스캐폴드의 접촉각 변화를 나타낸 그래프이다. 표면개질시간이 증가할수록 무 처리 3차원 PCL 스캐폴드에 비하여 접촉각이 감소함을 알 수 있었다. 이것은 표면처리에 의해서 PCL 스캐폴드 표면이 친수성으로 변화되었음을 의미한다.

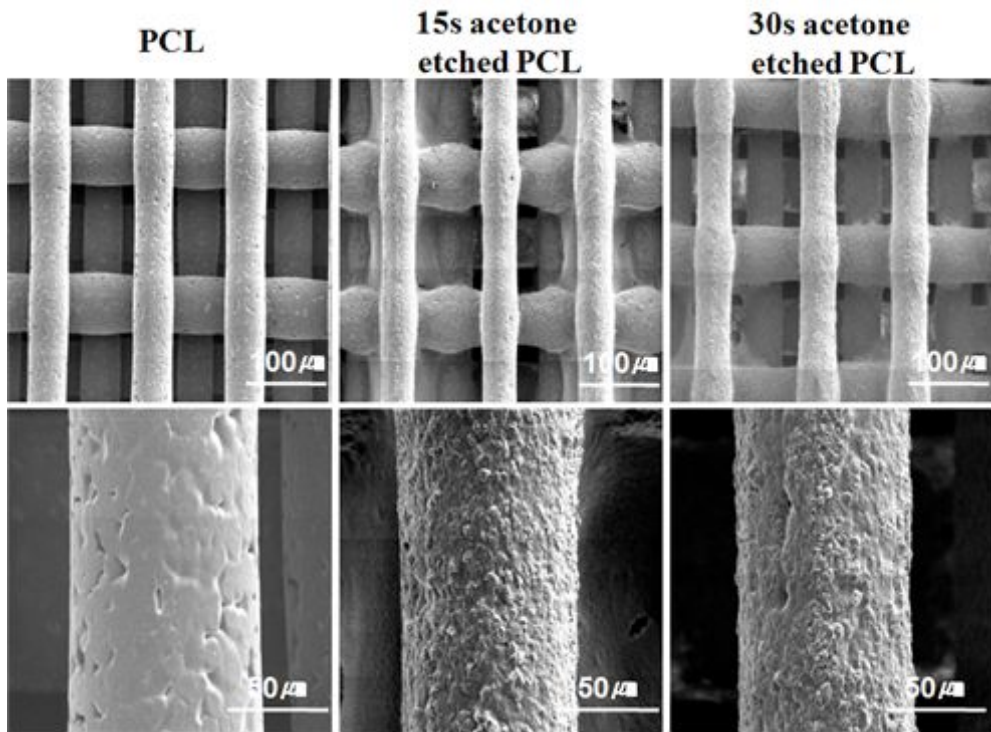


Fig. 5. SEM micrographs of (a) untreated PCL scaffold, (b) acetone etched PCL scaffold for 15 sec, and (c) acetone etched PCL scaffold for 30 sec.

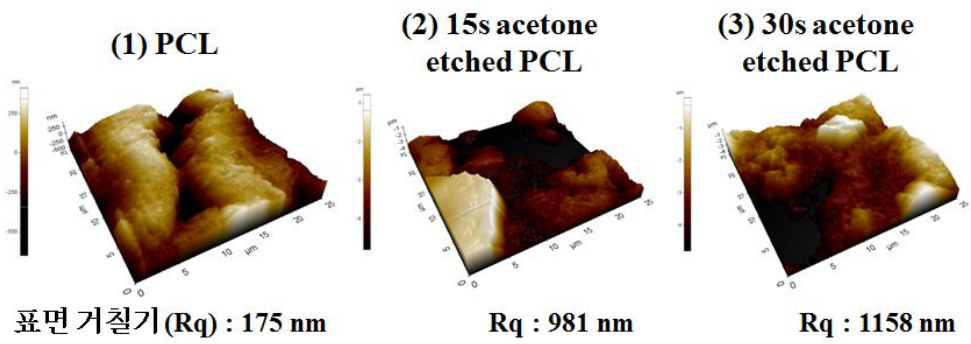


Fig. 6. AFM surface topography of (a) untreated PCL scaffold, (b) acetone etched PCL scaffold for 15 sec, and (c) acetone etched PCL scaffold for 30 sec.

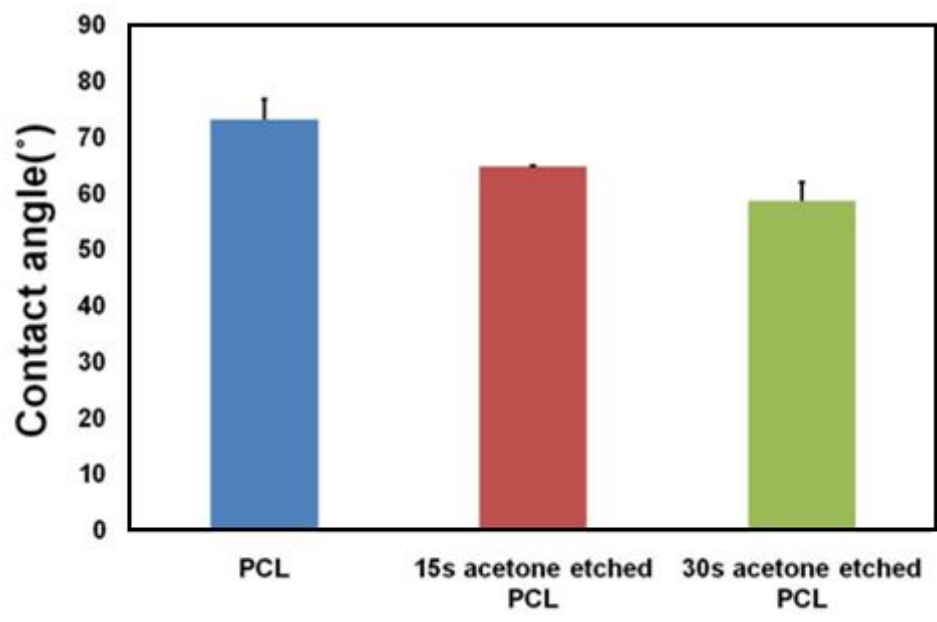


Fig. 7. Water contact angles of (a) untreated PCL scaffold, (b) acetone etched PCL scaffold for 15 sec, and (c) acetone etched PCL scaffold for 30 sec.

제 2 절 조골모세포 부착 및 증식

아세톤 혼합용액으로 표면처리 한 PCL 스캐폴드 표면에서 조골모세포, MC3T3-E1 세포증식에 미치는 영향을 평가하기 위하여 MTT법을 이용하여 관찰하였다.

Fig. 8은 무 처리 PCL 스캐폴드(대조군)와 표면처리 한 PCL 스캐폴드(실험군)에 조골모세포를 1, 3, 5일 배양한 후 MTT 결과를 나타낸 그림이다. 무 처리 PCL 스캐폴드에 비해 아세톤 혼합용액에서 표면처리 한 PCL 스캐폴드가 세포 증식이 향상되었음을 알 수 있었다. 유의성 검정을 위해 T-test 분석을 통하여 신뢰도 95% ($p < 0.05$) 내에서 변수의 비교를 통하여 각각의 유의성 차이를 비교하였으나, 1 일째에서는 무 처리 PCL 스캐폴드와 30 초 동안 표면처리 한 PCL 스캐폴드를 제외하고는 유의성이 나타나지 않았다.

Fig. 9은 각각 무 처리 PCL 스캐폴드와 아세톤 혼합용액에서 15 초 동안 표면처리 한 PCL 스캐폴드 그리고 30 초 동안 표면처리 한 PCL 스캐폴드의 세포 형태를 관찰한 것이다. 15 초와 30 초 동안 표면처리 한 PCL 스캐폴드의 경우 무 처리 PCL 스캐폴드에 비해 세포가 잘 부착되어 증식이 향상됨을 확인할 수 있었다. 특히 30초 에칭한 경우에는 세포부착이 더욱 활발히 일어난 것으로 확인되었다.

Fig. 10은 MC3T3-E1 세포의 형광 사진을 나타낸 것이다. 세포의 핵과 세포골격을 팔로이딘-로다민과 DAPI로 염색하여 세포의 성장 상태를 자세하게 관찰할 수 있었다. 무 처리 PCL 스캐폴드에 비해 15 초 동안 표면처리 한 PCL 스캐폴드(Fig.10b)의 표면에 있는 세포들의 골격이 더 발달된 모습을 관찰할 수 있었으며, 세포 수도 많이 부착되어 있었다. Fig.10(c)에서, 30 초 동안 표면처리 한 PCL 스캐폴드 표면에 있는 세포들은 15 초 동안 표면처리 한 PCL 스캐폴드 보다는 더욱 더 발달된 세포골격과 많은 부착된 세포 수도 확인할 수 있었다.

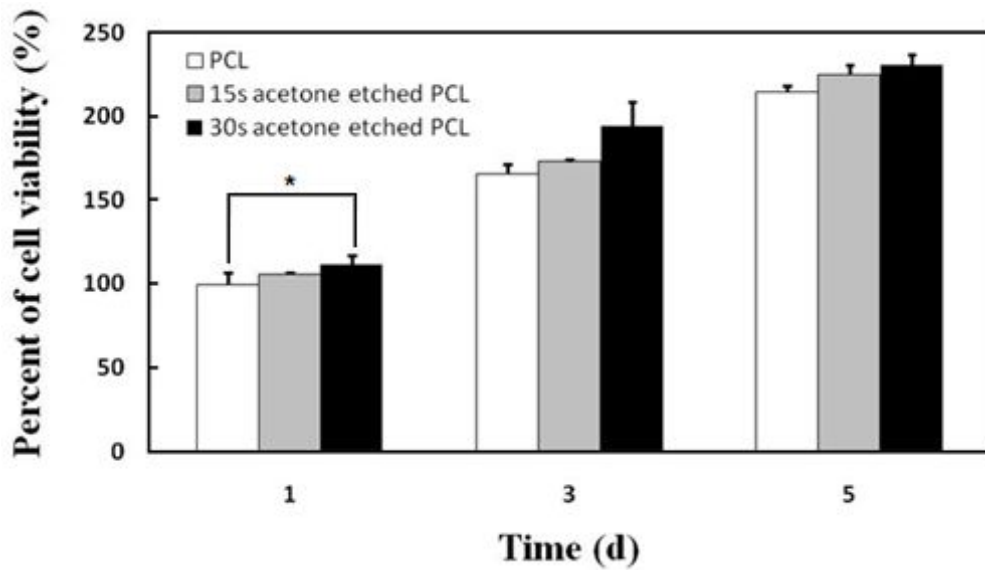


Fig. 8. The proliferations of MC3T3-E1 cell seeded on (a) untreated PCL scaffold, (b) acetone etched PCL scaffold for 15 sec, and (c) acetone etched PCL scaffold for 1, 3, and 5 days ($p^* < 0.05$).

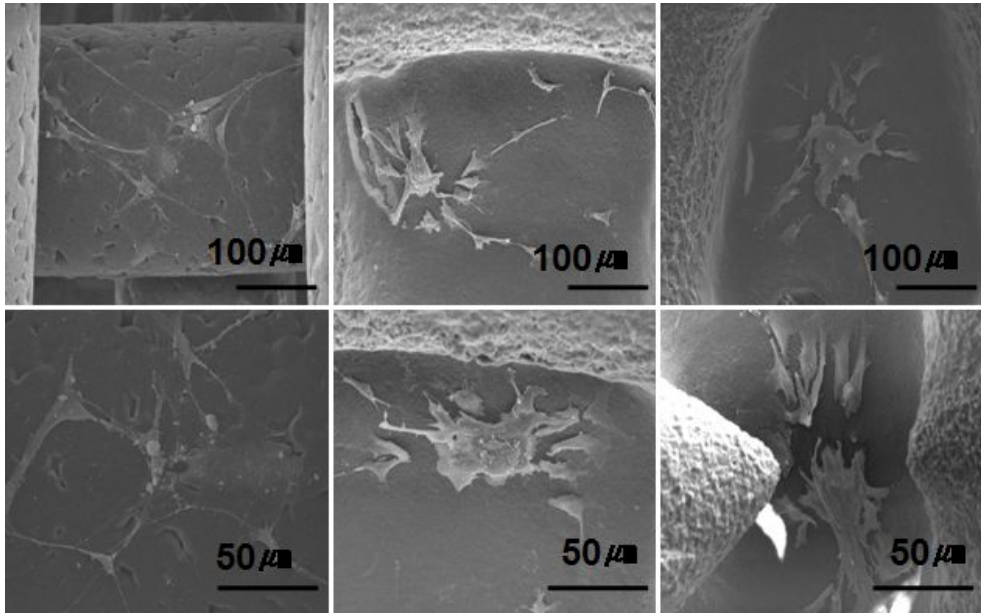


Fig. 9. The morphology of MC3T3-E1 cell seeded on (a) untreated PCL scaffold, (b) acetone etched PCL scaffold for 15 sec, and (c) acetone etched PCL scaffold for 2 days.

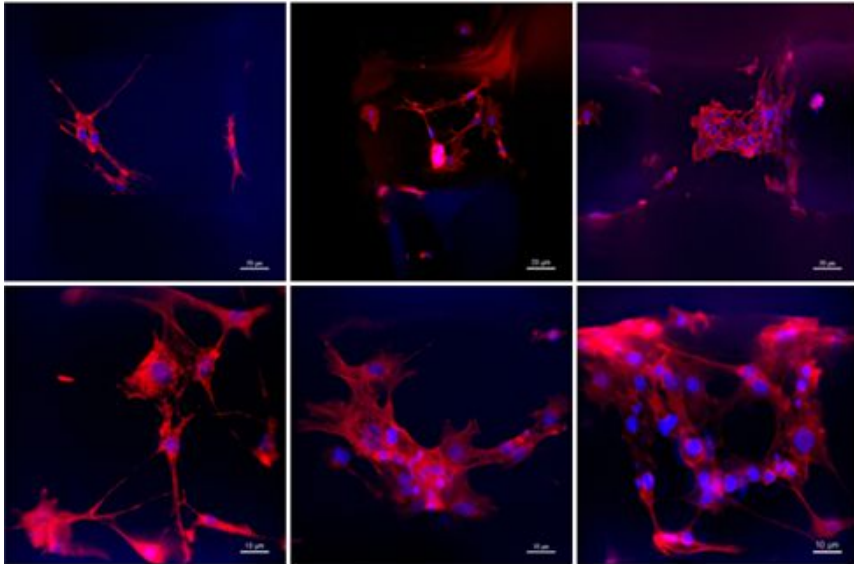


Fig. 10. Fluorescence images of the MC3T3-E1 cell seeded on (a) untreated PCL scaffold, (b) acetone etched PCL scaffold for 15 sec, and (c) acetone etched PCL scaffold for 2 days.

제 4 장 고찰

생체재료의 표면개질은 재료표면을 물적, 화학적 특성을 변화시키는 것으로 생체적합성, 젖음성, 마모, 그리고 부식저항성을 향상시키고자 할 때 주로 수행된다.

Polycaprolactone (PCL)은 조직공학 분야에서 많은 응용성을 가지는 지방족 생분해성 고분자이다 (Yildirim 등, 2008). 이상적인 스캐폴드는 초기 세포성장 및 증식이 잘 이루어져야하고, 체내에서 생분해가 진행되어야 한다. 이러한 구조적 이유 때문에 3차원 형태를 갖는 스캐폴드가 최근 각광을 받고 있는데, PCL은 아주 적합한 소재로 많이 사용되고 있다. 그러나 PCL 스캐폴드는 소수성이고, 세포부착 효율이 떨어지는 단점을 가지고 있다. 따라서 스캐폴드 표면에 물리화학적 표면개질이 필수적으로 필요로 하다.

본 연구에서는 조골모세포의 부착 및 증식을 향상시키기 위하여 3차원 PCL 스캐폴드 표면에 거칠기를 아세톤 혼합용매 에칭법을 이용하여 부여하였다.

Kumar 등에 의하면 고분자 스캐폴드의 표면 거칠기의 증가에 따라서 세포 분화가 활발히 일어난다고 보고하였으며(Kumar 등, 2012), Ma 등은 바이오 플로팅법으로 제조된 스캐폴드의 스트럿에 표면 거칠기 부여에 대한 다음과 같은 연구결과를 보고하였다(Chen 등, 2006; Wang 등, 2011). 스캐폴드 스트럿의 표면 거칠기가 증가할수록 MC3T3-E1 세포의 분화와 증식이 향상되었다. 또한, 거친 기공을 가진 스캐폴드는 *in vitro*와 *in vivo* 실험에서 human dental pulp stem cells의 분화와 증식에 도움을 준다고 보고하였다. Ma와 동료 연구자들은 거친표면에 세포 부착 단백질(피브로넥틴, 비트로넥틴)의 부착이 용이하다고 보고하였으며, 그 결과 분화가 향상된다고 하였다 (Woo 등, 2003). 그들은 영양분과 배출물의 전달이 거친 표면에서 원활이 진행되고, 그 결과 세포분화가 증가한다고 보고하였다.

한편, Jamison 등은 스트럿 마이크로 기공을 가진 칼슘 포스페이트 3차원 스캐폴드에서 제조된 스캐폴드 스트럿에 표면조도가 변한다고 보고하였다 (Deelinger 등, 2006; Woodard 등, 2007). 이 스캐폴드에 rhBMP-2가 탑재되고 돼지에 이식되었을 때, 마이크로 기공이 있는 스캐폴드에서 골이 형성되

었다고 하였다. 표면 친수성과 PCL 스캐폴드 표면의 거칠기와 같은 물리적인 성질을 개선하여 세포 증식을 증가시킬 수 있는 가능성을 *in vitro* 결과에서 부터 확인할 수 있었다 (Bae 등, 2012).

이러한 연구보고들을 종합해 볼 때, 생체재료의 표면 거칠기는 표면과 주위의 세포상호간의 아주 중요한 역할을 하는 것으로 생각되며, 적당한 거칠기는 조골세포의 부착 및 증식 그리고 분화에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 사료된다.

제 5 장 결론

용매 에칭법을 이용하여 표면 개질된 PCL 스캐폴드의 표면 및 물성을 관찰하였고, MC3T3-E1 세포를 이용하여 세포 증식을 조사하여 다음과 같은 결과를 도출할 수 있었다.

- (1) 디클로로메탄과 아세톤을 혼합한 용매 에칭법은 3차원 PCL 스캐폴드에 세포증식이 유리한 거친 표면을 제공할 수 있었다.
- (2) 접촉각 측정에서 아세톤 혼합용액으로 30초 표면처리 한 PCL 스캐폴드는 무 처리 스캐폴드와 15초 처리한 스캐폴드에 비하여 친수성을 나타냄을 알 수 있었다.
- (3) 세포증식 실험결과, 아세톤을 혼합용액으로 표면처리 한 PCL 스캐폴드가 무 처리한 스캐폴드에 비하여 MC3T3-E1 세포의 증식이 향상 되었다.

결론적으로 아세톤 혼합용액 에칭법은 고분자 생체재료 표면에 물리적인 거칠기를 부여하는데 효과적 이었으며, 고분자 생체재료의 생체적합성을 향상시키는데 유용한 기술로 활용 가능하다고 사료된다.

참고문헌

- Bae SE, Choi JY, Joung YK, Park KD, Han DK (2012). Controlled release of bone morphogenetic protein (BMP)-2 from nanocomplex incorporated on hydroxyapatite-formed titanium surface. *J Control Release* 160:676-684.
- Benoit DS, Schwartz MP, Durney AR, Anseth KS (2008). Small functional groups for controlled differentiation of hydrogel-encapsulated human mesenchymal stem cells. *Nat Mater* 7(10):816-823.
- Chen VJ, Smith LA, Ma PX (2006) Bone regeneration on computer-designed nanofibrous scaffolds. *Biomaterials* 27(21):3973-3979.
- Dalby MJ, Gadegaard N, Tare R, Andar A, Riehle MO, Herzyk P, et al (2007). The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nat Mater* 6(12):997-1003.
- Darling AL, Sun W (2004). 3D microtomographic characterization of precision extruded poly-epsilon-caprolactone scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 70:311-317.
- Dellinger JG, Eurell JA, Stewart M, Jamison RD (2006) Bone response to 3D periodic hydroxyapatite scaffolds with and without tailored microporosity to deliver bone morphogenetic protein 2. *J Biomed Mater Res A* 76(2) 366-376.
- Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126(4):677-689.
- Grafahrend D, Heffels KH, Beer MV, Gasteier P, Moller M, Boehm G, et al (2011). Degradable polyester scaffolds with controlled surface chemistry combining minimal protein adsorption with specific bioactivation. *Nat Mater* 10(1): 67-73.
- Khang Gilson, Kim Moon Suk, Min Byoung Hyun, Lee Ilwoo, Rhee Jon M., Hai, Lee Bang (2006). Scaffold for Tissue Engineering. *TISSUE ENG REGEN MED.* 3(4):376-395

- Klokkevold PR, Nishmura RD, Adachi M, Caputo A (1997). Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. A torque removal study in rabbit. *Clin Oral Implants Res* 8:442-447
- Kohn J, Welsh WJ, Knight D (2007), A new approach to the rationale discovery of polymeric biomaterials. *Biomaterials* 28:4171-4177
- Kumar G, Tison CK, Chatterjee K, Pine PS, McDaniel JH, Salit ML, et al (2011) The determination of stem cell fate by 3D scaffold structures through the control of cell shape. *Biomaterials* ;32(35):9188-9196.
- Kumar G, Waters MS, Farooque TM, Young MF, Simon CG Jr (2012), Freeform fabricated scaffolds with roughened struts that enhance both stem cell proliferation and differentiation by controlling cell shape *Biomaterials* 33:4022-4030
- Kweon HaeYong, Yoo MiKyong, Park InKyu, Kim TaeHee, Lee HyunChul, Lee HyunSook, Oh JongSuk, Akaike Toshihiro, Cho ChongSu (2003), A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. *Biomaterials* 24:801-808
- Lee JaeWon, Lee KuenYong (2011). Alginate Hydrogels for Tissue Regeneration. *Polymer Science and Technology* 22:34
- Moore NM, Lin NJ, Gallant ND, Becker ML (2011). Synergistic enhancement of human bone marrow stromal cell proliferation and osteogenic differentiation on BMP-2-derived and RGD peptide concentration gradients. *Acta Biomater* 7:2091-2100.
- Petrie TA, Raynor JE, Dumbauld DW, Lee TT, Jagtap S, Templeman KL, et al (2010). Multivalent integrin-specific ligands enhance tissue healing and biomaterial integration. *Sci Transl Med* ;2(45):45-60.
- Parekh SH, Chatterjee K, Lin-Gibson S, Moore NM, Cicerone MT, Young MF, et al (2011). Modulus-driven differentiation of marrow stromal cells in 3D scaffolds that is independent of myosin-based cytoskeletal tension. *Biomaterials* 32(9):2256-2264.

- Son JoonGon, Kim GeunHyung, Park Su-A, Kim WanDoo (2008), Fabrication of tailor-made 3D PCL scaffold using bio-plotting process. *Polymer* 32:163-168
- Wang Yan, Dai Jing, Zhang Qingchun, Xiao Yan, Lang Meidong (2010). Improved mechanical properties of hydroxyapatite/poly(ϵ -caprolactone) scaffolds by surface modification of hydroxyapatite. *Appl Surf Sci* 256:6107-6112
- Wang J, Ma H, Jin X, Hu J, Liu X, Ni L, et al. (2011) The effect of scaffold architecture on odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *Biomaterials* 32(31)7822-7830.
- Woo KM, Chen VJ, Ma P (2003) Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment. *J Biomed Mater Res A* 67(2) 531-537.
- Woodard JR, Hilldore AJ, Lan SK, Park CJ, Morgan AW, Eurell JA, et al. (2007) The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials* 28(1) 45-54.
- Yu SeongMi (2010). Effect of nanofibrous PLGA/gelatin scaffolds on adhesion and proliferation of human endothelial/smooth muscle cells for vascular tissue engineering application