



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2015년 2월

碩士學位論文

가스 발포법과 염 침출법으로 제작된
다공성 폴리카프로락톤 지지체의
가스 플라즈마 표면처리에 따른
골 재생능 향상

조선대학교 대학원

치의생명공학과

박 태 영

가스 발포법과 염 침출법으로 제작된
다공성 폴리카프로락톤 지지체의
가스 플라즈마 표면처리에 따른
골 재생능 향상

Improvement of the bone regeneration of porous
polycaprolactone scaffolds fabricated by CO₂ gas
foaming/salt leaching
using gas plasma surface treatment

2015年 2月 25日

조선대학교 대학원

치의생명공학과

박 태 영

가스 발포법과 염 침출법으로 제작된
다공성 폴리카프로락톤 지지체의
가스 플라즈마 표면처리에 따른
골 재생능 향상

지도교수 김 병 훈

이 논문을 공학 석사학위신청 논문으로 제출함.

2014年 10月

조선대학교 대학원

치의생명공학과

박 태 영

박태영의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 고 영 무 印

위 원 전남대학교 교수 국 민 석 印

위 원 조선대학교 교수 김 병 훈 印

2014年 11月

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT	vi
제 1 장 서 론	1
제 2 장 이론적 배경	4
제 1 절 지지체 제조	4
제 2 절 표면개질	14
제 3 장 실험재료 및 방법	19
제 1 절 실험재료	19
제 2 절 3차원 PCL 지지체 제조	20
제 3 절 가스 플라즈마 표면개질	22
제 4 절 표면분석	24
제 5 절 조골모세포 배양	25
제 6 절 조골모세포 증식	26
제 7 절 조골모세포 관찰	27
제 8 절 통계학적 분석	28
제 4 장 실험결과	29
제 1 절 표면분석	29
제 2 절 조골모세포의 생물학적 평가	33
제 5 장 고찰	37

제 6 장 결론	41
참 고 문 헌	42
감사의 글	49

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Schematic diagram of salt leaching.	5
Fig. 2. Schematic diagram of freeze drying.	7
Fig. 3. Schematic diagram of electro-spinning.	9
Fig. 4. Schematic diagram of gas foaming method.	11
Fig. 5. Schematic diagram of plasma cleaning.	16
Fig. 6. Schematic diagram of plasma activation.	17
Fig. 7. Schematic diagram of plasma etching.	17
Fig. 8. Schematic diagram of plasma deposition.	18
Fig. 9. Schematic diagram of PCL fabricated by gas foaming/salt leaching scaffold.	21
Fig. 10. The photograph of gas foaming/salt leaching scaffold sample. .	21
Fig. 11. The photograph of oxygen and nitrogen Plasma discharge.	22
Fig. 12. Schematic diagram of plasma treatment device.	23
Fig. 13. SEM images of (a) PCL scaffold, (b) PCL scaffold treated with O ₂ plasma, and (c) PCL scaffold treated with N ₂ plasma.	30
Fig. 14. Water contact angles of (a) PCL film, (b) PCL film treated with O ₂	

plasma, and (c) PCL film treated with N₂ plasma. 31

Fig. 15. XPS of (a) PCL scaffold, (b) PCL film treated with O₂ plasma, and (c) PCL film treated with N₂ plasma. 32

Fig. 16. The proliferations of MC3T3-E1 cell seeded on pristine PCL scaffold and surface modified scaffolds for 1, 3, and 6 days. 34

Fig. 17. SEM images of the MC3T3-E1 cell seeded on (a) PCL scaffold, (b) PCL scaffold treated with O₂ plasma, and (c) PCL scaffold treated with N₂ plasma. 35

Fig. 18. Fluorescence images of the MC3T3-E1 cell seeded on (a) PCL scaffold, (b) PCL scaffold treated with O₂ plasma, and (c) PCL scaffold treated with N₂ plasma. 36

LIST OF TABLES

Table 1. Various type of scaffold fabrication methods.	13
Table 2. Surface composition of the PCL film before and after the plasma treatment.	32

ABSTRACT

Improvement of the bone regeneration of porous polycaprolactone scaffolds fabricated by CO₂ gas foaming/salt leaching using gas plasma surface treatment

Tae-Yeong Bak

Advisor : Prof. Byung-Hoon Kim, Ph.D.

Department of Dental Science

Graduate School of Chosun University

In this study, porous polycaprolactone (PCL) scaffolds were fabricated by CO₂ gas foaming / salt leaching process. PCL scaffolds surface were treated by oxygen or nitrogen gas plasma to enhance the preosteoblast cell adhesion, spreading, and proliferation. NaCl was mixed with PCL to generate adequate pores in the PCL scaffolds. Ratios of PCL / NaCl were fixed 3 : 1. The supercritical CO₂ gas foaming process was carried out at the pressure of 8 MPa and 50 °C for 6 hrs. The depressurization rate was setting of 0.4 MPa/s. After salt leaching, The porous PCL scaffolds treated with Oxygen or Nitrogen were prepared by discharge power of 100 W and pressure of 30 mTorr for 60 s. The results of this study demonstrated that porous PCL scaffolds fabricated by CO₂ gas foaming/salt leaching possesses the porosities in the 75-90 % range and mean pore size of 430 μm. The gas plasma treated porous PCL scaffolds surface showed hydrophilic property and the adhesion and proliferation of MC3T3-E1 cells was enhanced comparing to untreated PCL scaffolds. The PCL scaffolds produced by gas foaming / salt leaching methods and plasma surface treated are suitable for potential applications in bone tissue engineering.

제 1 장 서 론

조직공학(tissue engineering)은 다양한 분야의 생명과학과 공학기술을 융합하여 생체대용품을 만들어 이식함으로써 사고나 질병에 의해 결손 된 우리 몸을 대체 또는 복원하는 것을 목적으로 하고 있는 학문이다. 손상 혹은 결손 된 생체조직을 효과적으로 대체하거나 이식할 수 있는 골 이식용 바이오재료(bio-materials)를 이용하여 이러한 문제점을 해결하려는 조직공학적 접근이 주목을 받고 있으며, 인공적인 대용품에서부터 생체적합재료의 개발까지 다양한 연구에 대한 필요성이 제기되고 있다(박수아 등, 2009).

치아 결손 부위를 대체하기 위해 사용되며 골 유착능을 향상시키기 위한 치과용 임플란트는 치과에서 널리 통용되고 있으며 골 이식 기술과 골 대체 이식재의 사용으로 치주질환이나 외상 등으로 심하게 손상된 치아주위 조직의 재생은 물론 상실된 치아를 대신할 임플란트 식립 시 결손 된 부위의 골 부피와 폭경, 높이를 증가시키는 것이 가능해졌다. 골 대체 이식 재료의 개발과 이식 기술의 발달은 치과용 임플란트의 발전과 더불어 치아상실에 대처할 수 있는 신 의료 기술로 각광받고 있으며 그 성공률의 향상과 치료 기간의 단축을 위한 다양한 연구들이 진행되고 있다(Lan 등, 2013; 김창현 등, 2008).

조직공학의 주된 목표는 생체에서 완전히 흡수되고 세포 친화력이 있는 고분자 지지체를 생체조직에 이식함으로써 인체에 거부반응 없이 새로운 장기의 완벽한 조직을 형성하게 하는 것이다.

오늘날 조직공학에서 주요 접근방법 중 하나는 조직 성장을 위해 최적의 환경을 제공해주는 지지체(scaffold)를 3차원의 인공적인 다공성 모형으로 만드는 것이다(Jacob 등, 2013).

조직공학에서 생체재료로 제조한 지지체에 대한 관심이 증가하고 있는데, 지지체가 가져야 할 필수조건은 다음과 같은 것들이 있다.

- i). 세포를 부착하고 물질을 전달할 수 있어야 한다.
- ii). 조직의 성장을 유도 · 촉진시킬 수 있어야 한다.
- iii). 생분해성과 생체적합성을 가져야 한다.
- iv). 높은 기공률과 적절한 기공의 크기를 가져야 한다.

- v). 세포의 접촉(attachment), 증식(proliferation), 분화(differentiation)에 적합한 표면의 특성을 가져야 한다.
- vi). 설계했던 모양을 그대로 유지함과 동시에 기계적 강도를 가져야 한다.
- vii). 독성이 없어야 하고 골 전도성을 가져야 한다(Wang 등, 2007; Wang 등, 2010).
- viii). 세포 반응을 자극할 수 있어야 한다.
- ix). 용이한 제조과정과 원하는 형태로 자유자재로 만들 수 있어야 한다.
- x). 멸균이 가능해야한다(강길선 등, 2006).

조직공학에서 연구가 진행되고 있는 고분자가 가져야 할 특성들 중 가장 중요한 것은 생체 적합성이다.

특히 폴리락타이드(PLA)(Lou 등, 2013), 폴리락타이드글리콜라이드 공중합체(PLGA)(Zhang 등, 2012), 그리고 폴리카프로락톤(PCL)(Domingos 등, 2013) 등은 폴리에스터 계열의 고분자로서 우수한 생분해성과 뛰어난 생체적합성으로 인하여 다양한 의료용 분야의 연구에 응용되고 있다(Seo 등, 2005).

폴리카프로락톤(Polycaprolactone, PCL)은 현재 대표적인 생분해성 고분자 가운데 하나이며 기타 고분자들과의 친화성(compatibility)이 우수하며, 무독성, 가공성이 용이하여 조직공학 및 의료분야에 사용되고 있으며 우수한 생분해성으로 인해 PCL은 model polymer로도 선택되어오고 있다(Yoshimoto 등, 2003; Ratner 등, 1996; Lindo 등, 2006; 김태호 등, 2010).

또한 PCL은 미국 FDA 승인을 받은 물질이며 우수한 기계적 강도와 생체적합성 등으로 인해 여러 가지 생체재료분야에서 이용이 가능하다(윤희숙 등, 2008). 더욱이 최근에는 PCL의 우수한 기계적 강도와 생체적합성을 이용해서 다른 재료의 물성을 보완하기 위한 연구도 진행되었다(김정호 등, 2013).

지지체를 제조하는데 사용되는 방법으로는 염 추출법(Salt leaching)(Qingpu 등, 2003), 이산화탄소를 이용한 발포법(Gas foaming)(Salerno 등, 2012), 동결 건조법(Freeze drying)(Wu 등, 2010) 등과 같은 방법이 있으며, 다양한 분야에서 최근에도 응용되어 지고 있다(Gabriel 등, 2014).

지지체에서 가장 중요한 것은 적절한 다공성 구조와 크기를 갖는 지지체를 제작하는 것인데 상호 연결된 다공성 구조와 기공의 크기는 세포의 증식과 분화, 그리고 영양분과 산소의 원활한 공급에 결정적 영향을 주어 조직의 형성에 매우 중요

한 역할을 하기 때문이다(Annabi 등, 2010).

그러나 고분자가 가지는 우수한 생체 적합성에도 불구하고, 고분자 재료가 가지는 고유의 소수성으로 인해 세포의 부착 및 증식과 같은 세포의 상호작용이 천연 재료보다는 떨어진다고 알려져 있다(유성미, 2010).

플라즈마 기술은 표면의 기능성 관능기 및 거칠기 도입을 통한 이종 소재들 간의 접합(접착)성 향상과 반도체 식각 및 증착 공정을 등을 포함한 각종 미세 소재의 표면 세정 효과, 합성 소재 표면에 생체적합성 물질 도입을 통한 생체소재 산업에의 적용, 고분자 및 세라믹 분리 막의 분리효율 증대, 각종 화학 산업에서 환경 친화적인 전구체의 사용가능성 확대, 디스플레이 분야 적용 등 다양한 기능을 수행할 수 있다(Cho 등, 2004).

플라즈마 기술을 이용한 표면개질기술은 세포의 부착과 증식, 그리고 분화를 향상시키기 위해 생체재료의 표면을 물리·화학적으로 변화시키는 기술 방법으로 현재 생체 조직공학 분야에 널리 사용되고 있다(Rammelt 등, 2006; Barder 등, 2006; Schuler 등, 2006; Petrie 등, 2006; Elmengaard 등, 2005).

본 연구에서는 PCL과 NaCl를 사용하여 PCL/NaCl composite scaffold를 제작하였다. PCL/NaCl composite scaffold를 제작하고 적절한 다공성 구조와 크기를 갖는 지지체를 제작하기 위하여 가스 발포법과 염 침출법을 이용하였다.

친수성을 향상시키기 위하여 산소와 질소 플라즈마 처리를 하였으며, 플라즈마 표면 개질된 PCL/NaCl composite scaffold를 이용하여 지지체 표면의 물리화학적 특성과 조골모세포인 MC3T3-E1 세포를 이용한 세포 증식 및 부착 특성을 평가 하였다.

제 2 장 이론적 배경

제 1 절 지지체 제조

생체적합성 고분자를 이용한 조직 공학적 응용의 궁극적인 목표는 지지체를 제작하는 데에 있다. 지지체를 제작하는 방법에는 염 침출법, 동결 건조법, 전기 방사법, 가스 발포법 등이 있다.

1. 염 침출법

염 침출법은 용매를 사용해서 지지체 내부의 모양과 크기를 조절하는 것이 가능하다. 염 침출법은 제조 방법이 간단하며 내부에 혼합하는 염 입자의 비율이나 함량에 따라 공극의 크기나 모양, 기공률을 조절 가능하다는 장점이 있어 지지체 제조 방법으로 사용되어져 왔다.

지지체에서 공극은 높은 기공률과 높은 내부 공극 간 연결률은 세포의 부착과 조직의 내부성장을 위해 커야 하며 표면적이 넓어야 한다.

추가로, 특정 세포는 최적의 부착률이나 성장률을 보이기 위해서 각기 다른 기공의 크기를 요구하기도 하는 점 때문에 기공의 크기 조절이 용이한 염 침출법이 사용되어 지고 있다(Qinpu 등, 2003).



Fig. 1. Schematic diagram of salt leaching.

2. 동결 건조법

동결 건조법은 다공성 물질을 만드는 방법 중 하나로 넓은 범위에 적용할 수 있는 유용한 방법이다. 물은 가격이 싸며 생물학적 시스템에도 유리하며, 생물학적 응용을 위한 다공성 지지체를 만들기 위해 사용되어져 왔다. Cooper 등(2005)은 동결 건조라 부르는, 방향 결정을 가지는 다공성 물질을 만들어낼 수 있는, 간단하면서도 효과적인 방법을 제시하였다.

동결 건조법은 물에 무기물 입자 혹은 고분자를 분산시킨 후, 얼음 결정의 성장 속도와 방향을 조절하여 얼음 결정을 얻어낸 후 승화시켜서 일정 방향으로 성장한 다공성의 지지체를 얻을 수 있는 방법이다. 다공성 물질의 기공의 속도나 방향은 얼음 결정에서 수용액의 농도를 다양하게 조절하여 얼음 결정의 크기를 조절하여 얻을 수 있다.



Fig. 2. Schematic diagram of freeze drying.

3. 전기 방사법

전기방사법은 정전기학적으로 고분자 나노섬유를 제조하는 방법이다. 나노섬유는 액상의 고분자 수용액이나 녹인 것을 가느다란 튜브에 채우고 높은 전기장을 생성시키는 것으로부터 만들어진다.

전기방사를 통해 제조된 섬유는 매우 가는 직경을 가진 섬유로 단위 질량당 표면적이 매우 크고 유연하며 섬유 간 발생하는 미세공간이 많고 단위면적당 존재하는 섬유의 수가 많아서 타 소재와의 혼화가 가능하며 외부의 응력에 대한 분산이 큰 특징을 가지고 있다. 이러한 향상된 물성들로 인해 많은 생체의료 분야 및 산업용 분야에서 고분자 나노섬유의 용도전개가 활발히 이루어지고 있다. 특히 생체의료 분야에 있어서 나노섬유의 용도전개는 여러 가지 장점을 가지고 있다. 가장 주목할 만한 특징으로는 나노섬유 집합체가 형태학적으로 ECM과 유사한 구조를 가진다는 것이다(김홍미 와 강인규, 2008)

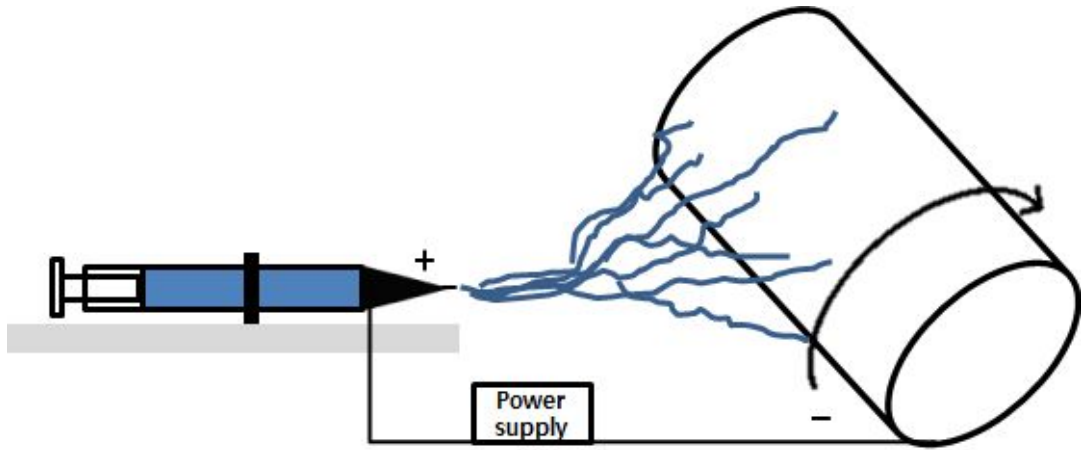


Fig. 3. Schematic diagram of electro-spinning.

4. 가스 발포법

가스 발포 기술은 가스 기포가 점성체 고분자 수용액 내부에 퍼뜨려지게 하여 기공을 생성하고 성장시키는 방법이다(Annabi 등, 2010).

초임계 이산화탄소(scCO₂)를 이용하여 기공을 성장시킬 수 있으며, scCO₂는 친환경적이고, 불연성이며, 가격이 저렴하다는 장점이 있다(Tomasko 등, 2003; Salerno 등, 2008).

지지체를 제조하는데 있어 사용되어지는 용매는 대개 독성이 있는 것들이 많으며, 제작 후에도 용매의 성분이 잔류할 수 있는 가능성이 있다. 따라서 유해 가능성이 있는 용매를 전혀 사용하지 않는 가스 발포법을 사용한다.

이산화탄소는 31.1 °C와 7.4 MPa 이상의 조건에서 초임계상태가 되며, 생분해성을 수행할 수 있는 가능성을 제공함과 동시에 상온의 불안정한 분자를 가열하여, 이른바 “고상 발포” 라고 부르기도 한다(Ginker 등, 2006; Woods 등, 2004).

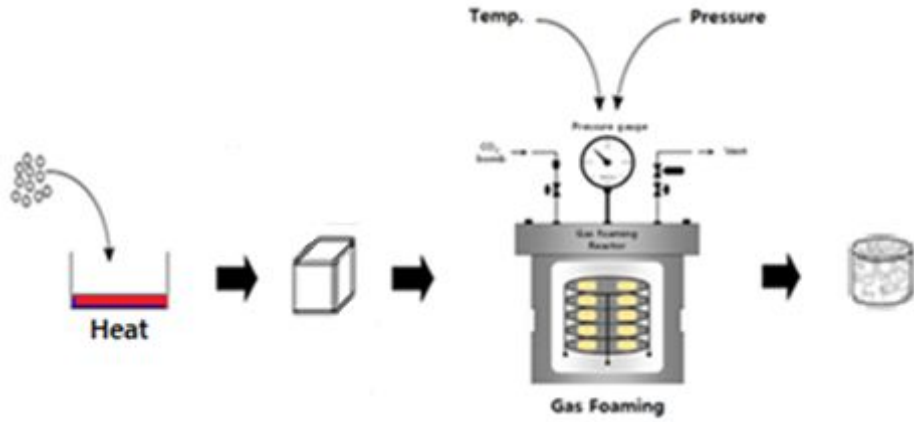


Fig. 4. Schematic diagram of gas foaming method.

5. RP(Rapid prototyping)법

쾌속 조형법은 약 10년 전에 개발되어 그 동안 많은 관심을 끈 제품 성형법이다. 이 방법은 제품 설계에서부터 시제품 제작과 완제품의 대량생산까지 도달하는데 필요한 시행착오를 컴퓨터를 기반으로 통합하면서 제품생산을 단축하는 것이 특징이다. 쾌속 조형법은 아래와 같은 것들 이외에도 많은 방법들이 있다(이관행, 1997).

(1) SLA (Stereo Lithographic Apparatus)

광경화성 수지에 레이저 광선을 주사하면 주사된 부분이 경화되는 원리를 이용한 장치이다. 레이저 광선을 이용하기 때문에 성형속도가 빠르며 성형정밀도가 높은 장점이 있으나, 수지의 경화처리가 필요하다(Ferry 등, 2010)

(2) FDM (Fused Deposition Modeling)

필라멘트 선으로 된 열가소성 물질을 노즐 안에서 녹이며 얇게 필름형태로 고화시키면서 적층시키는 방법이다. 레이저를 사용하지 않기 때문에 기계장치는 간단하나 성형 속도는 SLA에 비해 떨어진다. 장비 가격과 유지보수비가 저렴하다(Tinneke 등, 2013)

(3) SLS (Selective Laser Sintering)

SLA 에서의 광경화성 수지 대신에 기능성 고분자 또는 금속분말을 사용하며 레이저 광선을 주사하여 소결시켜 성형하는 원리이다. 어느 정도 강도를 가지고 있기 때문에 의장부품이 아닌 기능부품으로서 시험을 할 수 있는 시제품을 만들 수 있다. 성형속도는 가장 빠르고 재료가 다양하나 장비가격이 비싸고 노를 비롯한 고가의 부대장비가 필요하다(Chen 등, 2014)

(4) LOM (Laminated Object Manufacturing)

접착제가 칠해져 있는 종이를 원하는 단면으로 레이저 광선을 이용하여 절단하여 한 층씩 적층하여 성형한다. 성형정밀도가 떨어지므로 가늘고 작은 모양보다는 크고 두꺼운 형태의 부품제작에 적합하다(Anirban 등, 2003)

Table 1. Various type of scaffold fabrication methods

방법	원리	장점	단점
염 추출법 (salt leaching)	염 입자를 침투시켜 추출하여 공극을 제어	입자의 크기와 비율로 형상을 제어 가능	일정한 공극의 크기와 모양을 얻기 힘들 용매로 인한 독성 잔류 가능성
동결 건조법 (freeze drying)	수분을 얼려 공극을 제어	무독성	일정한 공극의 크기와 모양을 얻기 힘들
전기 방사법 (electrospinning)	높은 전기장을 생성시켜서 고분자 나노섬유를 제작	표면적과 응력에 대한 분산이 큼. 균일한 크기의 섬유 제작 가능 섬유 두께 조절 가능	대량 생산이 힘들
가스 발포법 (gas foaming)	초임계 이산화탄소 (scCO ₂)를 이용하여 공극을 제어	무독성	일정한 공극의 크기와 모양을 얻기 힘들 두꺼운 표면층 형성
쾌속 조형법 (rapid prototyping)	재료를 녹여 지지체의 형상이나 공극을 제어	무독성 형상 제어	대량 생산이 힘들

제 2 절 표면개질

표면개질은 재료의 표면의 물리·화학·생물학적 특성을 변화시키는 것을 말한다. 이 개질방법은 주로 고상 재료에 대해 적용되지만 특정한 액상 재료에 대해서도 개질이 가능한 사례가 발견되고 있다.

생체 재료는 벌크 특성과 특히, 생체적합성과 함께 인체환경에 알맞게 작용할 수 있는 기계적 특성이 요구되며 이러한 이유에서 벌크소재 특성을 유지하면서 표면특성을 변화시킬 수 있는 표면처리 기술이 생체 재료에 많이 응용되고 있다(화학공학연구정보센터, 2008). 표면개질은 재료표면의 친수성(Lapshin 등, 2010), 표면전하(Alekhin 등, 2010), 표면에너지(Bertazzo 와 Rezwan, 2009), 생체적합성(Bertazzo 등, 2009), 반응성(Gabor 등, 2013) 등 다양한 성질들을 각각 다른 방법으로 개질할 수 있다.

표면개질 방법에는 샌드블라스트 후 부식 처리법(Jung 등, 2012), 양극 처리법(Lee 등, 2010), 플라즈마 처리법(Myung 등, 2013) 등이 있다.

1. 플라즈마 이론

일반적으로 물질의 상태는 고체, 액체, 기체, 플라즈마 상태의 4가지 영역으로 나눌 수가 있다. 기체입자, 즉 기체분자나 원자에 에너지를 가하면 최외각 전자가 궤도를 이탈하게 되는데, 이때 기체 입자는 양전하의 이온과 음전하인 전자로 분리되어 전하를 띤 하전 입자로 변하게 된다. 이러한 양전하의 이온과 음전하의 전자들이 다수 모여 군집 활동을 하며, 이온들의 수와 전자들의 수가 거의 같아 전체적으로는 전기적 중성 상태를 유지하게 되는데, 이 상태를 플라즈마라 한다.

일반적으로 공간 내에 발생하는 인위적인 플라즈마 현상은 전기적인 에너지에 의해 발생한 전자나 공간 내의 자유 전자들이 전기장에 의해 가속되고 공간내의 Gas 입자와 충돌하여 이온화 반응에 의해서 플라즈마가 형성된다. 플라즈마 내의 하전 입자들은 전자의 경우 가스 입자와 충돌하여 이차전자를 방출하거나, 양극극판으로 이동, 벽을 구성하는 입자와 충돌 및 양이온과 재결합 과정을 겪으면서 소멸하게 된다. 이러한 반응은 플라즈마를 형성할 수 있는 에너지가 주어지는 동안 계속 반복되어진다(Laurent 등, 1996).

여기 되는 방법과 작동 에너지에 따라 낮거나 높은 온도의 환경을 만들어 낼 수 있으며, 각각을 저온 플라즈마 또는 열 플라즈마로 구분할 수 있다. 저온 플라즈마 발생기술은 저압인 상태에서 이루어지는데, 플라즈마를 방전 시킬 때에 대기압인 760 Torr에서 발생시키는 것 보다 1 mTorr ~ 100 mTorr 정도의 압력에서 발생시키는 것이 더 쉽기 때문에 대부분의 플라즈마는 대기압 보다 낮은 압력 하에서 방전되어 왔다. 또한 플라즈마 공정은 온도에 따라 수 만 °C 정도의 온도를 갖는 저온 글로우 방전 플라즈마와 수 천만 °C이상의 온도를 갖는 초고온 핵융합 플라즈마로 구분하기도 한다. 반도체 공정에서 플라즈마 식각 및 증착, 금속이나 고분자의 표면처리, 신물질의 합성 등에서 공정의 미세화, 저온화의 필요성 때문에 저온 글로우 플라즈마 공정이 종래의 공정을 대체하고 있다. 고분자 재료의 경우 소수성, 친수성, 염색성, 접착성 등을 개선하여 이들에 의해 만들어지는 섬유나 재료의 기능을 향상시킬 수 있다.

2. 플라즈마 표면처리

진공시스템에서는 진공 상태에서 전위차가 다른 두 개의 전극에 전압을 증가시켜 플라즈마를 발생시키는데, 플라즈마 발생을 위한 가스 종류에 따라서 응용분야도 달라진다. 플라즈마 표면처리는 크게 표면 클리닝, 표면 개질, 표면 에칭, 표면 증착으로 나눌 수가 있다.

1. 플라즈마 클리닝(Plasma cleaning)

진공상태에 Gas를 주입하여 플라즈마를 형성하였을 경우, 이온화된 가스 입자들은 재료의 표면을 물리, 화학적인 방법으로 표면에 충격을 가하여 이물질 (Contamination)들을 증발시키거나 뜯어낸다.

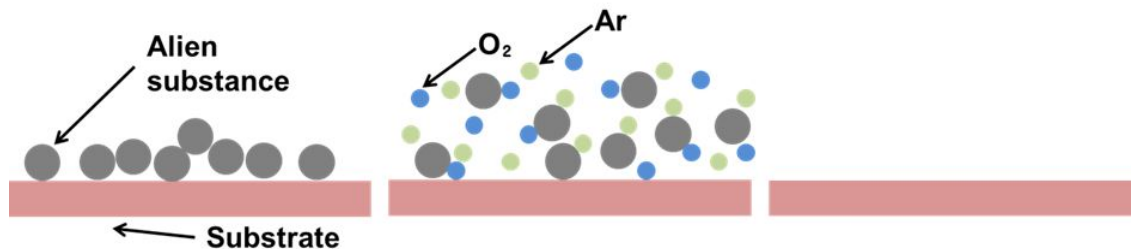


Fig. 5. Schematic diagram of plasma cleaning.

2. 플라즈마 개질(Plasma activation)

진공상태에 O_2 , Ar, N_2 Gas등을 주입하여 플라즈마를 형성하였을 경우, 특히 산소 입자는 처리물 표면에 흡착되어 아교 등의 접착력을 향상시킨다.

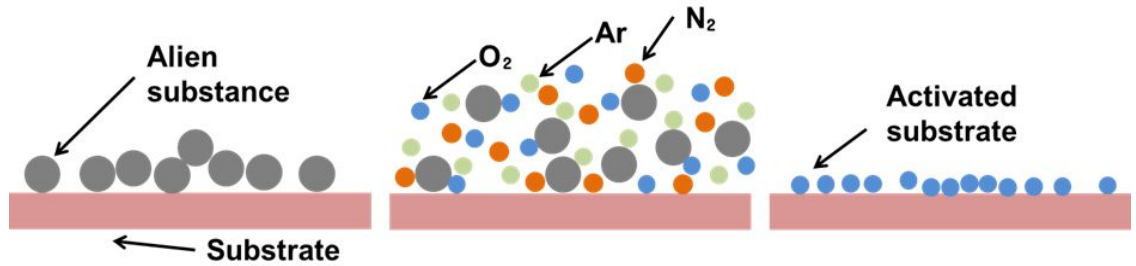


Fig. 6. Schematic diagram of plasma activation.

3. 플라즈마 에칭(Plasma etching)

활성가스(O_2 , CF_4 , SF_6)를 이용한 플라즈마 에칭(Etching)은 재료의 성분을 제거, 증발 또는 뜯어냄으로써 표면영역을 확대시키는 것이다.

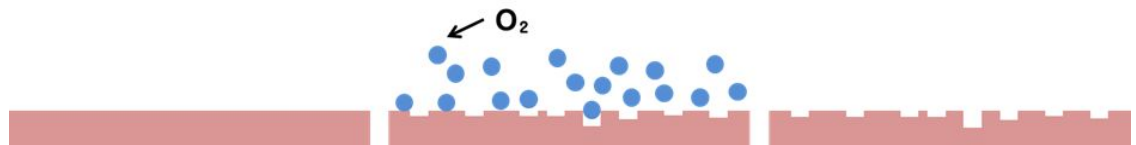


Fig. 7. Schematic diagram of plasma etching.

4. 플라즈마 증착(Plasma Deposition)

진공상태에서 두 가지 이상의 Gas를 주입하여 플라즈마를 형성하였을 경우, 이온화된 가스는 재료의 표면 전체에 증착된다.



Fig. 8. Schematic diagram of plasma deposition.

제 3 장 실험재료 및 방법

제 1 절 실험재료

본 실험에서 사용되는 Poly- ϵ -caprolactone(Mn 45,000, PCL)과 NaCl은 Sigma-Aldrich와 Bioshop. Inc 에서 각각 구입하였다. NaCl 은 마이크로 체를 이용하여 입자크기 150 ~ 212 μm 범위로 크기를 선별하여 실험에 사용 하였다.

제 2 절 3 차원 PCL 지지체 제조

PCL을 Hot plate를 사용하여 55 °C에서 녹이고 NaCl과의 무게비가 3 : 10이 되도록 각각 첨가하여 지지체를 제작하였다.

지지체를 스테인리스 강 가압반응기에 넣고 CO₂ 가스를 80 Bar 이상 가압한 상태에서 지지체에 초임계 CO₂ 가스가 충분히 용해되어 평형에 도달할 수 있도록 50 °C의 온도를 유지되는 water bath 속에서 6 시간 동안 유지시켜 주었다. 6 시간 후 CO₂ 가스를 방출 시켜주기 위하여 니들밸브를 이용하여 160 Bar/min의 속도로 방출을 시켜 PCL / NaCl 지지체의 내부로 침입한 CO₂ 가스가 외부로 방출이 되면서 기공과 기공을 연결하는 구조를 만들어 주었다. 발포 시킨 PCL / NaCl 고분자 복합 지지체를 1 차 증류수에 수 일 동안 침적시켜 염을 침출한 뒤 진공오븐에 건조시켜 다공성의 PCL 지지체를 제작 하였다. 1 차 증류수는 12 시간 마다 한 번씩 교환해 주어 다공성 PCL 지지체 내부에 있는 염이 모두 용출되도록 해 주었다.

제작된 PCL 지지체는 염 입자 크기의 작은 기공들과 가스발포로 인해 생긴 큰 기공들이 상호 연결되어 있는 구조를 가지며, Fig. 9 에 제작 과정을, Fig. 10 에 제작된 PCL 지지체의 단면을 나타내었다. 제작된 PCL 지지체는 8 mm의 크기로 잘라서 시편으로 사용하였다.

또한 접촉각 측정을 위한 PCL 필름을 제작하기 위하여 PCL 50 wt% 를 클로로포름 (SK chemicals, Korea)에 넣고 60 °C에서 1 시간 동안 교반하였다. 제작한 용액을 몰드에 넣고 실온에서 용매를 증발시켜 두께가 약 0.2 mm인 PCL 필름을 제작하여 시편으로 사용하였다.

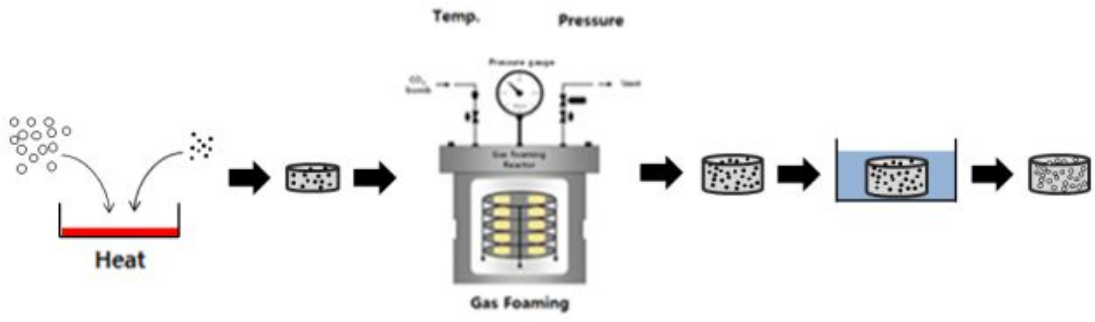


Fig. 9. Schematic diagram of PCL gas foaming/salt leaching scaffold.



Fig. 10. The photograph of gas foaming/salt leaching scaffold sample.

제 3 절 가스 플라즈마 표면개질

산소와 질소플라즈마 발생 시 나타나는 챔버 내부의 플라즈마 반응 색은 Fig. 11 에 나타내었으며 플라즈마 반응장치의 구성도는 Fig. 12 에 나타내었다. 플라즈마 표면개질에 사용된 가스는 산소(Oxygen, purity of 99.95 %, 아주산소)와 질소(Nitrogen, purity of 99.9 %, 아주산소)를 사용 하였고, 플라즈마 처리에는 RF(radio frequency) 13.56 MHz의 축전 결합형 플라즈마(Capacitively Coupled Plasma; CCP)타입의 장비(PLASMART Inc. Korea)를 사용하였다. 325 mm 직경과 175 mm 높이의 진공 챔버는 로타리 펌프로 최대 1×10^{-3} Torr의 진공도를 유지하였다. 시료대는 상부 전극으로부터 30 mm 떨어진 곳에 위치한다. 플라즈마 표면처리반응은 가스의 압력과 챔버 내부 반응압력을 30 mTorr로 유지한 후, 100 W 로 1 분 동안 산소(O₂)와 질소(N₂) 처리를 수행하여 시료로 사용하였다.



Fig. 11. The photograph of oxygen and nitrogen plasma discharge.

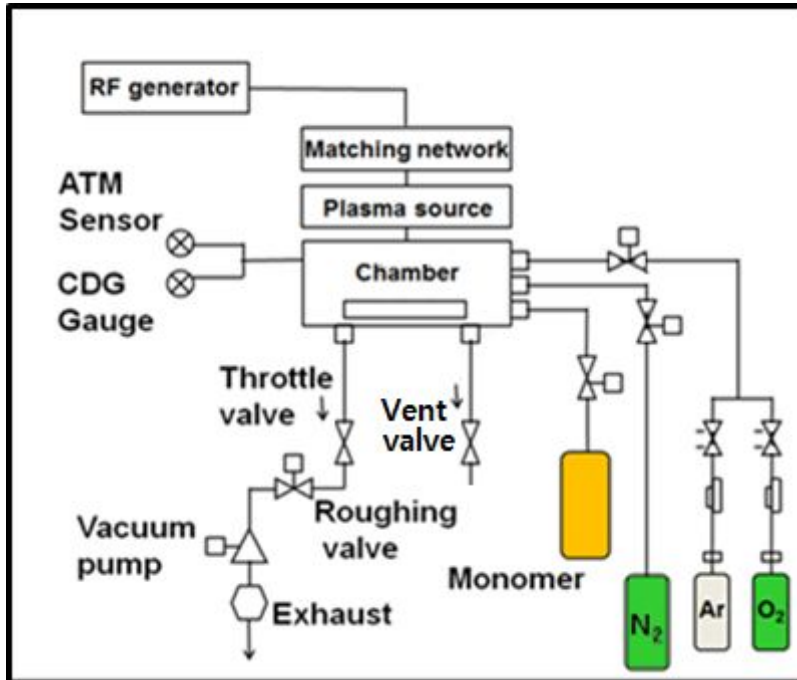


Fig. 12. Schematic diagram of plasma treatment device.

제 4 절 표면분석

PCL 다공성 지지체 및 산소와 질소 플라즈마로 표면개질 된 PCL 다공성 지지체를 각각 준비하여 접촉각을 측정하였다. 각 시편의 접촉각 변화를 관찰하기 위하여 실온에서 증류수 약 5 μ l를 시편에 떨어뜨린 후, 접촉각 측정기(GSA, Surfacetech, Korea)로 5 초 후에 접촉각을 측정하였다.

주사전자현미경(SEM: scanning electron microscopy, SNE-3200M, SEC, Korea)을 이용하여 무처리 PCL 다공성 지지체 및 산소와 질소 플라즈마로 표면개질 된 PCL 다공성 지지체의 표면형상을 관찰하였다.

SEM 관찰에는 Au Coater(Au 99.99%)를 이용하여 Au 코팅은 1 분 동안 처리 하였으며, 관찰에는 가속 전압 15 kV에서 SE mode로 측정하였다.

PCL 다공성 지지체 및 산소와 질소 플라즈마로 표면개질 된 PCL 다공성 지지체의 표면의 화학 조성 변화를 확인하기 위하여 X-선 광전자 분광법(XPS: X-ray photoelectron spectroscopy)을 이용하였다.

제 5 절 조골모세포 배양

본 실험에 사용된 세포는 생쥐 두개골에서 유래한 조골모세포 MC3T3-E1(ATCC Catalog No. CRL-2593)을 ATCC에서 구입하여 사용하였고, 세포배양은 α -MEM (alpha minimum essential medium with ribonucleosides, deoxyribonucleosides, 2 mM L-glutamine and 1 mM sodium pyruvate, but without ascorbic acid/GIBCO, Custom Product, Catalog NO. A1049001)배지에 growth factor를 제공하는 10 % (w/v) fetal bovine serum (FBS, PAA Laboratoris, Inc. A15-751)과 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin 항생제가 혼합된 세포배양액을 혼합하여 5 % CO₂가 공급되는 37 °C, 100 % 습도가 유지되는 CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포성장 배지는 2 일 간격으로 교체하였으며, TrypLE™ (GIBCO 1640)을 이용하여 세포를 plate에서 분리시킨 후 4 °C 1000 rpm에서 3 분 동안 원심분리 하여 세포를 추출하였다. 그리고 3 일 마다 80% confluence 할 때 계대 배양 하여 3 세대 세포를 실험에 사용하였다.

제 6 절 조골모세포 증식

조골모세포 증식은 MTT assay를 이용하여 평가하였다. MTT assay는 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma-Aldrich)가 formazan으로 변환되는 것을 측정하는 방법으로 다음과 같이 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, 6일이 되면 MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide, Sigma-aldrich, M2128)시약을 각 well 당 100 μ l 첨가하여 청자색의 결정이 생성되는 것을 확인하였다. 4 시간 후 DMSO (dimethyl sulfoxide, Junsei, 35535-0350)를 1,000 μ l/well을 넣은 후 실온에서 30 분간 배양하였다.

흡광도를 측정하기 위해 반응 액을 96-well plate에 각각 200 μ l씩 분주한 후 ELISA reader(Thermal Fisher SCIENTIFIC)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

제 7 절 조골모세포 관찰

1. 주사전자현미경 관찰을 위한 세포 전처리

플라즈마 개질한 샘플과 무처리 샘플이 담겨진 12 well plate에 배양된 MC3T3-E1 세포를 1×10^5 cells/mL의 농도로 파종하였다. 그리고 2 시간 후 2.5%의 Paraformaldehyde(Electron Microscopy Sciences 15714)와 Glutaraldehyde(SIGMA ALDRICH G5882)의 혼합용액으로 3 시간 전 고정을 하여주었고 10 분 동안 PBS 을 이용하여 세척하여 준 후 1% Osmium tetroxide(SIGMA ALDRICH 201030)를 이용하여 30 분 동안 후 고정을 진행하였다. 70 %, 90 %, 95 %, 100 % 알코올을 준비하여 건조시켜 주었고 HMDS(hexa-methyl-di-silazane, Fluka, 52619)를 이용하여 샘플 위에 남아있는 알코올을 제거 후 건조 하였다.

2. Rhodamine-Phalloidin assay

준비된 샘플이 담겨진 12 well plate에 배양된 MC3T3-E1 세포를 2×10^5 cells/mL의 농도로 파종하였다. 세포 파종 후 24시간이 지나면 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 5 분 동안 투과 처리하여 주었고 Rhodamine-Phalloidin(Life technologies, R415) 시약을 15 분 동안 처리하여 세포를 염색하였다. 3 번에 걸쳐 각각 5 분 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 보관 하였다.

제 8 절 통계학적 분석

모든 실험 데이터는 T-test 분석을 통하여 신뢰도 95% (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) 내에서 변수의 비교를 통하여 각각의 유의성 차이를 비교하였다.

제 4 장 실험결과

제 1 절 표면분석

Fig. 13 은 주사전자현미경 측정 결과를 나타낸 것이다. PCL 지지체와 산소와 질소 플라즈마 처리를 한 PCL 지지체는 주사현미경 측정결과 지지체의 형태 차이가 크지 않았다. 대조군과 실험군 그룹에서 기공의 크기는 평균 $427.89 \mu\text{m}$ 로 측정되었으며 플라즈마 처리로 인해 기공 크기의 변화는 나타나지 않았다.

Fig. 14 는 접촉각 측정 결과를 나타낸 것이다. 무처리 PCL 필름의 경우 접촉각이 약 77.84° 로 측정 되었고 산소와 질소 플라즈마 처리를 한 PCL 필름은 각각 약 5.24° 와 8.03° 로 친수성이 크게 향상되었음을 알 수 있다.

Fig. 15 와 Table 2 는 XPS 측정 결과를 나타낸 것이다. 산소와 질소 플라즈마 각각 처리를 한 PCL 필름의 경우 O 1s peak 와 N 1s peak의 at %가 각각 증가하였음을 알 수 있었다.

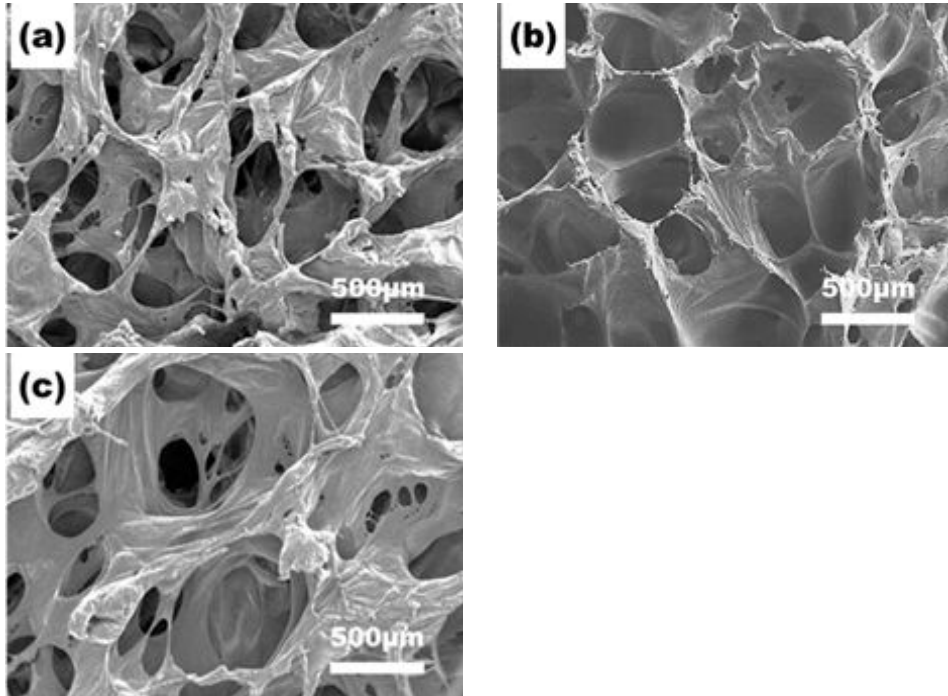


Fig. 13. SEM images of (a) PCL scaffold, (b) PCL scaffold treated with O₂ plasma, and (c) PCL scaffold treated with N₂ plasma.

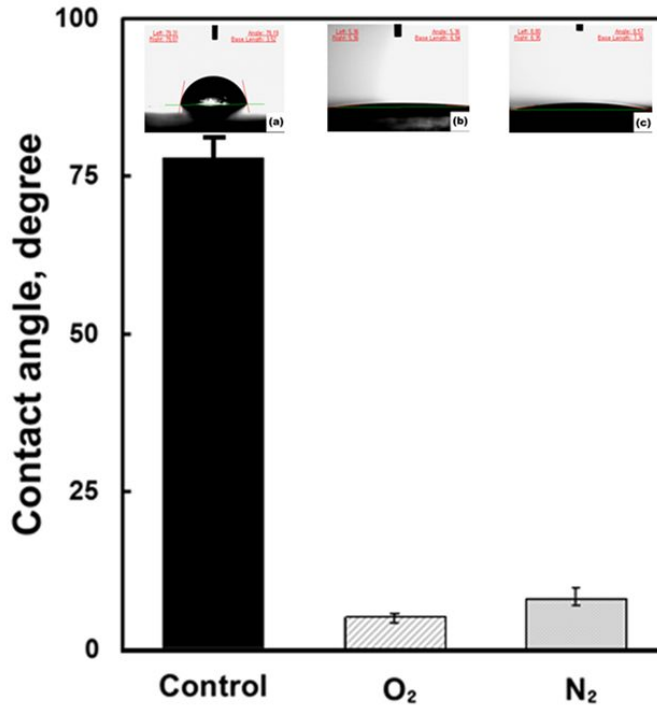


Fig. 14. Water contact angles of (a) PCL film, (b) PCL film treated with O₂ plasma, and (c) PCL film treated with N₂ plasma.

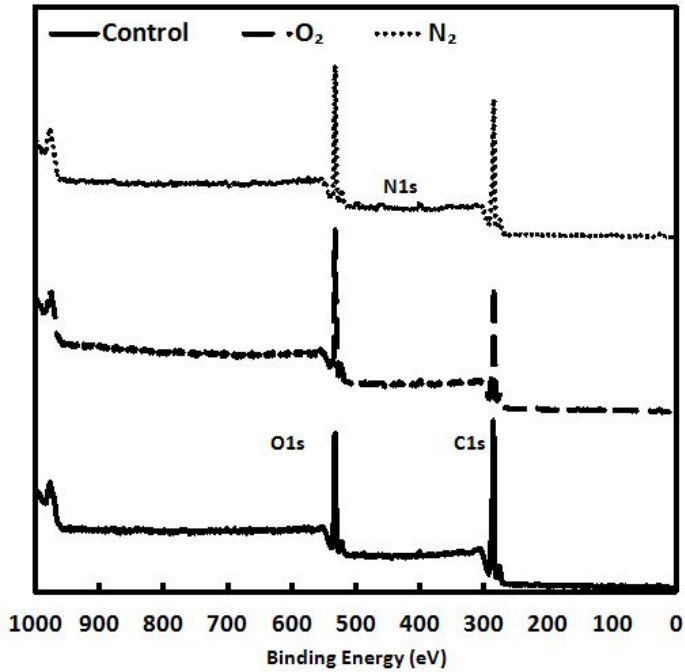


Fig. 15. XPS of (a) PCL scaffold, (b) PCL film treated with O₂ plasma, and (c) PCL film treated with N₂ plasma.

Table 2. Surface composition of the PCL film before and after the plasma treatment

Group	C	O	N
Control	78.64 %	19.94 %	1.42 %
Treated with oxygen plasma	70.98 %	27.71 %	1.31 %
Treated with nitrogen plasma	73.16 %	24.02 %	2.82 %

제 2 절 조골모세포의 생물학적 평가

Fig. 16 은 PCL 지지체 표면에 플라즈마를 처리하여 산소와 질소 플라즈마가 MC3T3-E1 세포생존율에 미치는 영향을 평가하기 위하여 MTT assay를 이용하여 관찰한 결과이다. MTT assay는 세포의 미토콘드리아 활성과 직접연관이 있는 방법으로 살아있는 세포의 수가 많으면 효소활성이 증가하는 것을 이용하여 세포의 생존율을 측정할 때 일반적으로 사용되는 방법이다. 이 실험에서 대조군은 다공성 PCL 지지체를 사용하였고, 산소와 질소 플라즈마 처리된 다공성 PCL 지지체를 실험군으로 사용하였다. MC3T3-E1 세포 생존율은 대조군과 실험군 모두 1 일, 3 일, 6 일 동안 배양하였고, 생존율 (%) 계산은 1 일 동안 배양한 대조군의 생세포수를 100 % 로 했을 때 실험군의 생세포수를 비율로 나타낸 것이다. 세포배양기간이 증가하면서 실험군의 세포 생존율이 증가함을 알 수 있었다. 모든 실험군에서 세포 증식률이 유의성 있게 증가한 것을 확인할 수 있었다.

Fig. 17 은 주사전자현미경을 이용하여 각각의 PCL 지지체 표면에서 2시간 동안 배양된 조골모세포의 부착을 관찰한 결과이다. 산소와 질소 플라즈마 처리하여 친수성으로 변한 PCL 지지체 표면에 있는 세포들은, 크고 세포 수도 많이 볼 수 있는 반면에 무처리 PCL 지지체 그룹에서는 감소한 경향을 관찰 할 수 있었다. 산소와 질소 플라즈마 처리한 3차원 PCL 지지체는 세포의 부착과 성장에 효과를 나타냄을 알 수 있다(Jung 등, 2012).

Fig. 18 은 형광현미경을 이용하여 각각의 PCL 지지체 표면에서 2시간 동안 배양된 조골모세포의 부착을 관찰한 결과이다. 산소와 질소 플라즈마를 처리한 PCL 지지체 표면에 있는 세포들은 숫자도 더 많은 것을 확인할 수 있었다.

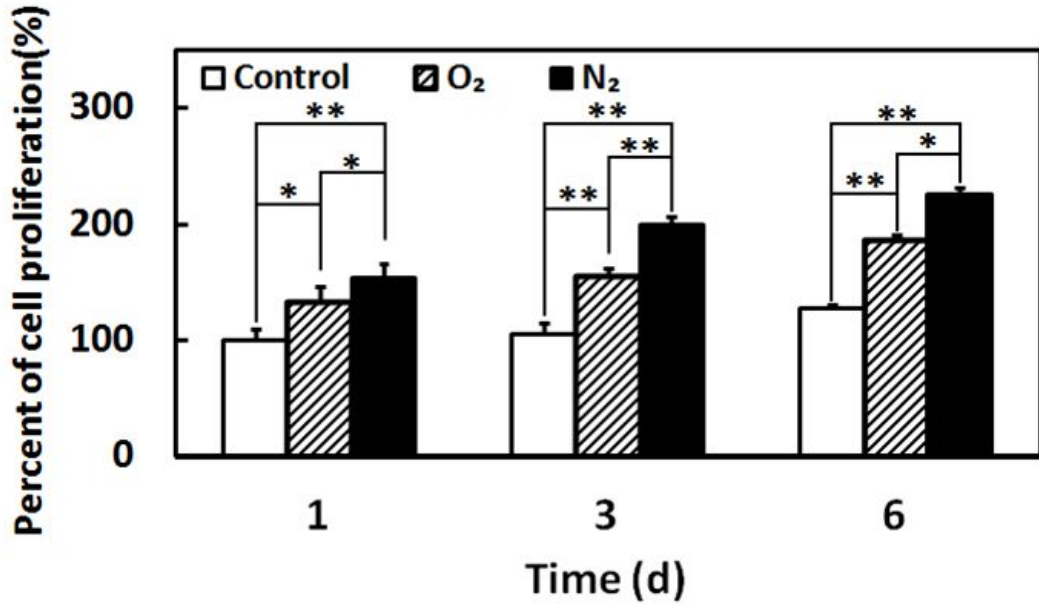


Fig. 16. The proliferations of MC3T3-E1 cell seeded on pristine PCL scaffold and surface modified scaffolds for 1, 3, and 6 days.

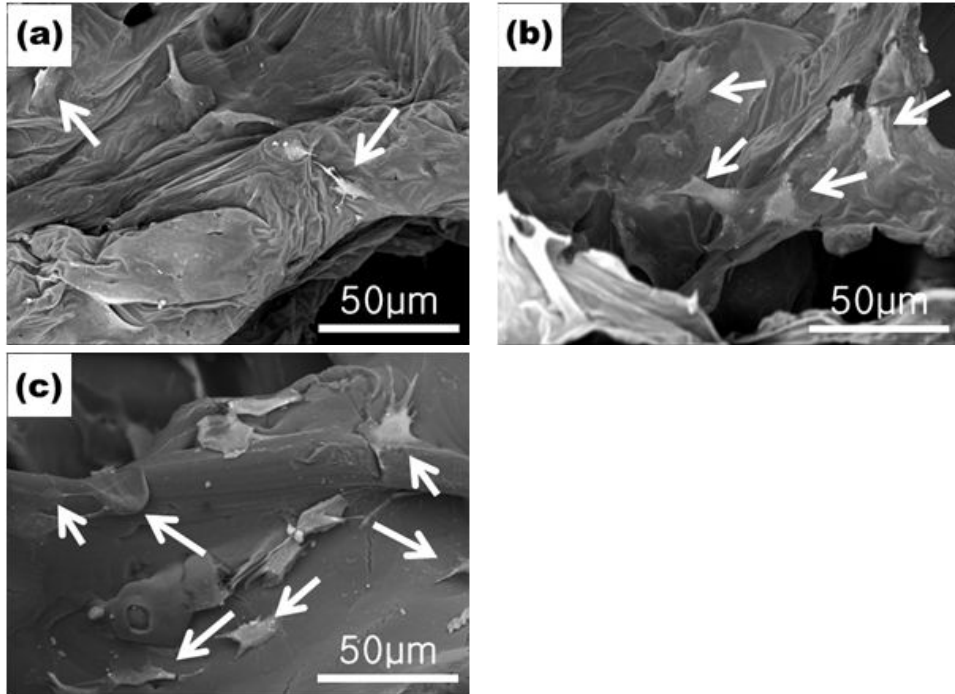


Fig. 17. SEM images of the MC3T3-E1 cell seeded on (a) PCL scaffold, (b) PCL scaffold treated with O_2 plasma, and (c) PCL scaffold treated with N_2 plasma.

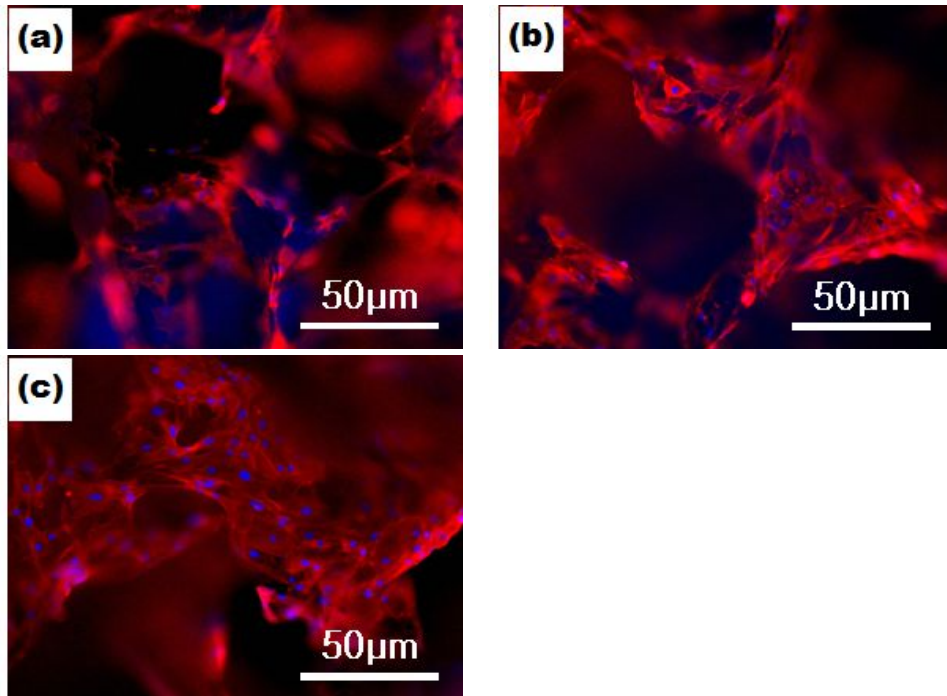


Fig. 18. Fluorescence images of the MC3T3-E1 cell seeded on (a) PCL scaffold, (b) PCL scaffold treated with O_2 plasma, and (c) PCL scaffold treated with N_2 plasma.

제 5 장 고찰

다공성 구조를 갖는 지지체의 기계적 성질과 공극률은 세포의 증식과 이동 그리고 분화 같은 생명 현상에 필수적인 산소나 영양분의 전달을 원활하게 해 주는 중요한 역할을 한다(Dehghani 와 Annabi, 2011).

가스발포 지지체란 이산화탄소와 같은 불활성 기체를 고분자 재료 내부로 용해시켜 열역학적 불안정을 유발하여 재료 내에서 발포를 시킨 재료를 뜻한다. 불활성 기체 중에서도 초임계 CO₂는 상대적으로 낮은 임계점을 가지고 있어 초임계 조건에 쉽게 도달할 수 있으며, 무독성, 가격의 저렴성, 그리고 불연성 등의 장점을 가지고 있기 때문에 현재까지 시행되었던 다른 지지체 제작방법에 비해 효율성이 높다. 지금까지의 연구에 의하면 폴리머 속으로 많은 양의 가스가 용해되면 고분자 재료의 유리전이 온도(glass transition temperature)와 결정화 속도(crystallization rate) 같은 물리적 특성이 변화되는 것으로 알려져 있다. 이때 높은 압력의 초임계유체(supercritical fluid)를 이용하면 더 많은 양의 가스를 고분자 재료에 용해시킬 수 있다. 이렇게 만들어진 고분자 재료/가스 용액은 압력의 급격한 저하나 온도의 증가로 인한 불안정을 거쳐 기포의 밀도(cell density)가 약 $10^9 \sim 10^{15}$ (cells/cm³)가 되며, 재료 내부에 생기는 기포의 크기는 마이크로미터 단위를 갖는다(Cha, 1994; 윤재동, 1998).

가스 발포의 단계는 세 단계로 이루어진다. 고압 탱크로부터 반응기로 이산화탄소를 주입하는 가압단계, 고압 반응기의 온도를 높이는 단계, 이산화탄소를 배출하는 감압 단계로 구분하는데 이산화탄소를 배출하는 감압단계에서 감압하는 속도에 따라 기공의 크기 분포나 형태가 달라진다. 빠른 감압 속도는 핵형성이 빠르고 핵형성 사이트가 많아지면서 작은 크기의 여러 기공이 생기는 것을 알 수 있었다. 반면 느린 감압 속도는 초기에 생긴 기공은 확산이 되면서 더욱 커지며, 넓은 기공 크기 분포를 가지는 경향이 있으며, 큰 크기의 기공이 소수 생긴다(Ji 등, 2011; White 등, 2012).

가스발포 지지체는 가스가 들어가서 발포가 된 만큼 재료가 절감되는 장점뿐만 아니라 기존 발포의 단점으로 지적되던 불균일하고 큰 발포 기포에서 기인된 충격 강도와 인장 강도 등 기계적 성질이 개선된다는 장점도 지닌다(Baldwin 와 Daniel, 1994).

본 연구에서 PCL 다공성 지지체에는 염 입자를 150 - 212 μm 크기로 제어하여 사용하였다. 가스발포와 염 침출이 끝난 지지체의 평균 기공 크기는 427.89 μm 로 가스발포가 성공적으로 이루어졌음을 알 수 있었다.

플라즈마 처리를 한 PCL 다공성 지지체의 친수성을 측정하기 위하여 접촉각 측정을 시행하였다. 무처리 PCL 다공성 지지체와 산소와 질소 플라즈마 처리를 한 PCL 다공성 지지체는 물이 바로 흡수가 되어 측정할 수 없었다. PCL 필름으로 산소와 질소 플라즈마를 처리하여 접촉각을 측정한 결과 무처리 3D PCL 필름의 경우 약 77.84 $^{\circ}$ 의 접촉각이 측정 되었고 산소와 질소 플라즈마 처리를 한 PCL 필름은 각각 약 5.24 $^{\circ}$ 와 8.03 $^{\circ}$ 로 친수성이 크게 향상되었음을 알 수 있었다.

접촉각이 플라즈마 처리로 인해 감소하는 이유는 플라즈마 처리로 인해 지지체 표면의 에너지가 증가하였음을 의미하고, 플라즈마 처리 시간에 따라서 재료 표면의 산소나 질소 활성기와 같은 친수성기가 생성되어 시료의 표면 친수성이 증가하였기 때문이다.

본 연구에서는 산소 플라즈마와 질소 플라즈마 표면 처리를 이용하여 PCL 지지체의 표면을 친수성으로 변화시켜 세포 수용기와 표면 관능기와의 상호 작용을 증가시켜 세포 부착 능을 평가하고자 하였다. 지지체의 표면은 플라즈마 내의 이온과 라디칼이 충돌하고 표면 화학종이나 관능기와 반응하여 다른 관능기를 도입시킨다. 산소 플라즈마와 질소 플라즈마는 극성의 하이드록실기, 카르보닐기, 카르복실기를 도입하고, 고분자 중심의 C - C bonding 이나 C - H bonding 을 끊는 작용을 한다. 이 작용으로부터 표면 친수성이나 에너지를 증가시켜 생체적합성을 향상시키는 작용을 한다(Yildirim 등, 2008).

X-선 광전자 분광 현미경으로 산소와 질소 플라즈마 처리 전후의 조성 변화를 Table 2에 나타내었다. PCL 필름의 표면에서는 약 20 at%의 산소를 발견할 수 있었다. 산소 플라즈마를 처리한 PCL 필름의 표면에서는 무처리 PCL 필름에서 보다 7 at% 정도 더 높은 약 27 at% 의 산소를 발견할 수 있었다. 이것은 플라즈마를 처리 하였을 때 재료의 표면에 새로운 원소가 잘 결합한다는 것을 의미한다. 반면에 질소 플라즈마 처리를 한 시편의 경우 N 1s element 의 intensity가 크게 증가하지 않았는데, 질소는 반응성이 낮은 원소 중 한 가지이기 때문이다(Singh 등, 2009). 질소 플라즈마를 처리한 균 에서도 산소의 농도가 뚜렷하게 증가하는 이유는 플라즈마 처리로 인해 표면의 오염물질이 제거되었기 때문이거나 산소나 물과 같은 산성 종이 존재하기 때문이라고 사료된다. 또한 XPS 측정 이전에 시편이 대

기 중에 노출되었기 때문에 산소의 농도의 변화가 생겼다고도 고려될 수도 있는데 이는 Vessel 의 실험에서 플라즈마 처리 후 즉시 XPS 분석을 한 결과와 대기 중에서 일정시간 후에 분석을 한 결과의 차이에서도 알 수 있었다(Vessel 와 Mozetic, 2008).

본 연구에서 산소 플라즈마와 질소 플라즈마 처리를 통해서 C - C bonding과 C - H bonding(284.6 eV)은 61.22 at%에서 51.42 at% 와 52. 42 at% 로 각각 감소하였으며 산소 플라즈마를 처리한 그룹에서 C = O bonding(531.89 eV)은 19.94 at%에서 27.71 at% 로 증가하였다. 또한 질소 플라즈마를 처리한 그룹에서 C - N bonding(399.56 eV)은 1.42 at%에서 2.82 at%로 증가한 것으로 미루어 플라즈마 처리가 성공적이었다고 사료된다(Lyakhovitch 등, 2003; Murali 등, 2014; Abhijit 등, 2009). 이와 같은 표면 산화 반응으로 친수성 그룹을 도입하는 것은 세포의 증식을 증가시키는 작용을 가져온다(Lee 등, 2009). 하지만 일반적으로 플라즈마 처리로 인해 시편의 표면에 생긴 극성기는 시간이 경과함에 따라 소멸되는 결점이 있다고 알려져 있다(김수민 등, 2002; 박병기 등, 1999).

위 실험에서는 산소와 질소 두 가지의 플라즈마를 사용하여 표면을 개질시켰다. 주사전자현미경 결과에서 산소 플라즈마 처리를 한 지지체와 질소 플라즈마 처리를 한 지지체의 표면 형상의 차이는 크게 나타나지 않았다. 위 결과로 미루어 플라즈마 표면처리가 시료의 표면에 물리적인 변형을 주지 않으면서, 화학적인 성질을 개질하였다는 것을 알 수 있었다.

본 연구에서 사용된 조골모세포(MC3T3-E1)는 신생 쥐 두개골에서 분리하여 계대 배양한 세포로서, 배양 초기에는 섬유아세포의 양상을 지나 장시간 배양시 골기질의 석회화뿐만 아니라, 조골세포와 골세포로 분화하는 조골 기능을 갖고 있는 세포주 이다(Casser 등, 1990).

세포가 증식, 분화하기 위해서는 세포가 시편에 접촉이 잘 되어야 한다. 접촉하지 않고 부유하는 세포는 성장할 수 없기 때문에 재료 표면이 세포 친화성을 가지고 있어야 한다. 재료표면의 세포 친화성을 평가하기 위해서는 *in vitro* 세포 배양 실험을 통하여 배양 후 부착·성장된 세포의 수를 계산한다던지 형태 변화를 관찰하는 것이 일반적인 방법이다. Fig. 17 과 Fig. 18 에서 PCL 지지체 기공 안에 세포가 잘 부착되어 있는 모습을 볼 수 있다. 플라즈마 표면개질 된 PCL 지지체의 기공 내부의 세포 부착 능과 확산이 향상되었음을 확인할 수 있었다. 세포 확산 증가는 플라즈마 표면 개질된 PCL 지지체 표면의 친수성 증가와 더불어 C =

O, C - O 결합과 같은 산소 그룹 관능기가 도입되었기 때문이다(Murali 등, 2014).

Fig. 16 에서 플라즈마 처리된 다공성 PCL 지지체에서 세포 증식이 유의성 있게 증가한 것을 알 수 있는데, 플라즈마 표면 개질된 다공성 PCL 지지체에서 세포 부착이 늘어나고, 이에 따른 세포 증식이 증가하였기 때문으로 유추할 수 있었다.

Gupta 등은 친수성 표면이 소수성 표면에 비해 세포와 조직과의 상호작용이 우수하다는 것을 보고하였다. 접촉각이 낮아진 것으로 미루어 보아 친수성이 크게 향상되었고, 조골모세포가 성장하기에 적합한 표면으로 변화되어 증식에 긍정적인 영향을 미쳤을 것으로 사료된다(Gupta 등, 2012).

제 6 장 결론

3차원 PCL 지지체 표면에 산소 플라즈마와 질소플라즈마 처리를 하여 표면특성을 관찰하였고, MC3T3-E1 세포를 이용하여 세포 부착 및 증식을 조사하여 다음과 같은 결과를 도출하였다.

(1) 가스발포법과 염 침출법을 이용하여 제작한 PCL 지지체는 평균 427.89 μm 의 기공 크기를 가져 발포가 성공적으로 이루어 졌으며 기공간 상호 연결이 잘 발달되어 있음을 알 수 있었다.

(2) 산소 플라즈마와 질소 플라즈마가 처리된 3차원 PCL 지지체 표면은 접촉각이 5.24 ° 와 8.03 ° 로 친수성을 나타내었고 표면의 물리적 형태가 변하지 않았음을 알 수 있었다.

(3) MTT 세포 독성 실험과 주사전자현미경 결과에서 산소 플라즈마와 질소 플라즈마가 처리된 3차원 PCL 지지체는 조골모세포의 접착과 증식이 향상되었음을 확인하였다.

결론적으로 산소와 질소 플라즈마가 처리된 다공성 PCL 지지체는 골 재생 및 골 융합을 향상시켜 골 조직공학 응용에 유용한 바이오소재로써 사용 될 것으로 사료된다.

참고문헌

- Abhijit M, Ramesh U, Karsten S, Reinhard W, Rainer H (2009). Cancer cells (MCF-7, Colo-357, and LNCaP) viability on amorphous hydrogenated carbon nitride film deposited by dielectric barrier discharge plasma, *J. Appl. Phys.* doi:10.1063/1.3190558.
- Alekhin AP., Boleiko GM., Gudkova SA., Markeev AM., Sigarev AA., Toknova VF., Kirilenko AG., Lapshin RV., Kozlov EN., Tetyukhin DV.(2011). Synthesis of Biocompatible Surfaces by Nanotechnology Methods. *Nanotechnologies in Russia*. **5**:696-708.
- Allan S. Hoffman (1995) Surface modification of polymers. *Chinese J. polym. sci.* **13**(3):195-203.
- Anirban D, Giridhar M, Niladri D, Arun M. Umarji (2003). Binder removal studies in ceramic thick shapes made by laminated object manufacturing. *J. Eur. Ceram. Soc.* **23**:1013-1017.
- Annabi N, Nichol JW, Zhong X, Ji C, Koshy S, Khademhosseini A, et al(2010). Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* **16**:371-83.
- Baldwin, Daniel F (1994). Microcellular polymer processing and the design of a continuous sheet processing system, M,I,T. 14-18.
- Barder TA, Gamble LJ, Castner DG, Healy KE (2006). In vitro characterization of peptide-modified p(AAm-co-EG/AAc) IPNcoated titanium implants. *J Orthop Res* **24**:1366-1376.
- Bertazzo S, Rezwani K (2009). Control of α -alumina surface charge with carboxylic acid. *Langmuir* **26**(5):3364-3371.
- Bertazzo S, Zambuzzi WF, da Silva HA, Ferreira CV, Bertran CA (2009). Bioactivation of alumina by surface modification: A possibility for improving the applicability of alumina in bone and oral repair. *Clin. Oral Implan. Res.* **20**:288-293.
- Casser BM, Murray AB, Closs EI, Erfle V, Schmidt J (1990). Bone formation by

- osteoblast-like cells in a three-dimensional cell culture. *Calcif Tissue Int.* **46**(1):46-56.
- Cha SW (1994), A Microcellular foaming/forming process performed at ambient temperature and pauper microcellular foaming process, M.I.T., 12-15.
- Chen CH, Lee MY, Shyu VBH, Chen YC, Chen CT, Chen JP (2014), Surface modification of polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering for cartilage tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **40**:389-397.
- Dehahani F, Annabi N (2011). Engineering porous scaffolds using gas-based techniques. *Curr. Opin. Biotech.* **22**:661-666.
- Domingos M, Intranuovo F, Gloria A, Gristina R, Ambrosio L, Bartolo PJ, Favia P. (2013) Improved osteoblast cell affinity on plasma-modified 3-D extruded PCL scaffolds. *Acta Biomater.* **9**:5997-6005.
- Elmengaard B, Bechtold JE, Soballe K (2005). In vivo effects of RGD coated titanium implants inserted in two bone-gapmodels. *J biomed Mater Res A.* **75**:249-255.
- Ferry PW, Melchels, Katia B, Ruggero G, Aldrik HV, Jan F, Dirk WG (2010). Mathematically defined tissue engineering scaffold architectures prepared by stereolithography. *Biomaterials* **31**(27):6909-6916.
- Gedler G, Antunes M, Velasco JI. (2014). Polycarbonate foams with tailor-made cellular structures by controlling the dissolution temperature in a two-step supercritical carbon dioxide foaming process. *J supercrit fluid* **88**:66-73.
- Ginker PJ, Barry JJA, Tighe P, Mutch SR, Serhatkulu G, Oreffo R.Co.0, Howdle SM, Shakesheff KM (2006), Mammalian cell survival and processing in super-critical CO₂, *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:7426-7.
- Gupta B, Krishnanand K, Deopura BL (2012). Oxygen plasma-induced graft polymerization of acrylic acid on polycaprolactone monofilament. *Eur Polym J* **48**:1940-1948.
- Ji C, Annabi N, Hosseinkhani M, Sivaloganathan S, Dehghani F (2011). Fabrication of poly-DL-lactide/polyethylene glycol scaffolds using the gas

- foaming technique. *Acta Biomater* **8**:570-578.
- Jung SC, Lee K, Kim BH (2012). Biocompatibility of plasma polymerized sandblasted large grit and acid titanium surface. *Thin Solid Films* **521**:150-154.
- Lan SF, Kehinde T, Zhang X, Khajotia S, Schmidtke DW, Starly B (2013). Controlled release of metronidazole from composite poly-caprolactone/alginate (PCL/alginate) rings for dental implants. *Dent mater.* **29**:656-665.
- Lapshin RV, Alekhin AP, Kirilenko AG, Odintsov SL, Krotkove VA (2010). Vacuum ultraviolet smoothing of nanometer-scale asperities of Poly(methyl methacrylate) surface. *J surf invest-X-Ray.* **4**(1):1-11.
- Laurent MM, Park CB, Balantineca JJ (1996). Effect of cell morphology in the properties of microcellular foamed PVC/Wood-Fiber composites, *Polym eng sci*, **38**(11):1862-1872.
- Lee HU, Jeong YS, Koh KN, Jeong SY, Kim HG, Bae JS, Cho CR (2009). Contribution of power on cell adhesion using atmospheric dielectric barrier discharge (DBD) plasma system. *Curr Appl Phys*, **9**:219-223.
- Lee K, Choe HC, Kim BH, Ko YM (2010). The biocompatibility of HA thin films deposition on anodized titanium alloys. *Surf Coat tech*, **205**:S267-S270.
- Lindo W, Dianying J, Jiandong D (2006). A "room-temperature" injection molding/particulate leaching approach for fabrication of biodegradable three-dimensional porous scaffolds. *Biomaterials* **27**:185-191.
- London G, Chen KY, Gregory T, Carroll L, Ben LF (2013). Towards Dynamic Control of Wettability by Using Functionalized Altitudinal Molecular Motors on Solid Surfaces. *Chem-eur J* **19**(32):10690-10697.
- Lou T, Wang X, Song G (2013). Fabrication of nano-fibrous poly(L-lactic acid) scaffold reinforced by surface modified chitosan micro-fiber. *Int J Biol macromol.* **61**:353-358.
- Lyakhovitch AM, Dorfman MA, Shirobokov MA (2003). Combined AFM and XPS investigation of plasma-polymerized films of saturated hydrocarbons deposited onto organic substrate. Proceedings. *Nizhni Novgorod*, 276-278.

- Murali KS, Suresh KK, Thomas V, Doddahalli HN, Ramakrishnappa T (2014). In Situ Reduction and Functionalization of Graphene Oxide with L-Cysteine for Simultaneous Electrochemical Determination of Cadmium(II), Lead(II), Copper(II), and Mercury(II) ions, *Anal Methods-UK*, DOI 10.1039/C4AY01945H.
- Myung SW, Ko YM, Kim BH (2013). Effect of plasma surface functionalization on preosteoblast cells spreading and adhesion on a biomimetic hydroxyapatite layer formed on a titanium surface, *Appl surf sci*, **287**:62–68.
- Neves SC, Moreira Teixeira LS, Moroni L, Reis RL, Van Blitterswijk CA, Alves NM, Karperien M, Mano JF (2011). Chitosan/Poly(ϵ -caprolactone) blend scaffolds for cartilage repair. *Biomaterials* **32**:1068–1079.
- Park CH, Kim SM, Shim HS Im SS (2002). Effect of Oxygen Plasma Treatment on Hydrophilicity and Biodegradability of Poly(butylene succinate). *AATCC REV* **6**(7):38–42.
- Petrie TA, Capadona JR, Reyes CD, Garcia AJ (2006). Integrin specificity and enhanced cellular activities associated with surfaces presenting a recombinant fibronectin fragment compared to RGD supports. *Biomaterials* **27**:5459–5470.
- Qingpu H, Dirk W. Grijpma, Jan F (2003). Porous polymeric structures for tissue engineering prepared by a coagulation, compression moulding and salt leaching technique. *Biomaterials* **24**:1937–1947.
- Rammelt S, Illert T, Bierbaum S, Scharnweber D, Zwipp H, Schneiders W (2006). Coating of titanium implants with collagen, RGD peptide and chondroitin sulfate. *Biomaterials* **27**:5561–5571.
- Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE (1996). Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine. *Academic Press* 50–69,84–94.
- Salerno A, Iannace S, Netti PA (2008) Open-pore biodegradable foams prepared via gas foaming and microparticulate templating. *Macromol Biosci*. **8**:655–664.
- Salerno A, Iannace S, Netti PA (2012). Graded biomimetic osteochondral scaffold prepared via CO₂ foaming and micronized NaCl leaching. *Mater Lett*.

- 82:137-140.
- Schueren VDL, Schoenmaker BD, Kalaoglu OI, Clerck KD (2011). An alternative solvent system for the steady state electrospinning of polycaprolactone. *Eur Polym J*, **47**:1256-1263.
- Schuler M, Owen GR, Hamilton DW, de Wild M, Textor M, Brunette DM (2006). Biomimetic modification of titanium dental implants model surfaces using the RGDSP-peptide sequence: a cell morphology study. *Biomaterials* **27**:4003-4015.
- Singh PP, Mahadi F, Roy A, Sharma P (2009). Reactive oxygen species, reactive nitrogen species and antioxidants in etiopathogenesis of diabetes mellitus type-2. *Indian J Clin Biochem* **24**(4):324-342.
- Tinneke J, Heidi D, Nathali DG, Ria C, Peter D, Christophe L, Rino M (2013). Improved cell adhesion to flat and porous plasma-treated poly-ε-caprolactone samples. *Surf Coat tech.* **232**:447-455.
- Vesel A and Mozetic M(2008). Modification of PET surface by nitrogen plasma treatment, *Journal of Physics: Conference Series*, **100**, 012027.
- Wang H, Li Y, Zuo Y, Li J, Ma S, Cheng L (2007). Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. **28**:3338-3348.
- Wang Y, Dai J, Zhang Q, Xiao Y, Lang M (2010). Improved mechanical properties of hydroxyapatite/poly(ε-caprolactone) scaffolds by surface modification of hydroxyapatite. *APPL SURF SCI* **256**:6107-6112.
- White LJ, Hutter V, Tai H, Howdle SM, Shakesheff KM (2012). The effect of processing variable on morphological and mechanical properties of supercritical CO₂ foamed scaffolds for tissue engineering. *Acta Biomater.* **8**:61-71.
- Whitters CJ, Strang R, Brown D, Clarke RL, Curtis RV, Hatton PV, Ireland AJ, Lloyd CH, McCabe JF, Nicholson JW, Scrimgeour SN, Setcos JC, Sheriff K, Noort RV, Watts DC, Wood D(1999), *Dental materials: 1997 literature review*, *J. Dent.* **27**:401-435.
- Woods HM, Silva MMCG, Nouvel C, Shakesheff KM, Howdle SM (2004). Materials

- processing in supercritical carbon dioxide: surfactants, polymers and biomaterials, *J Mat Chem* **14**:1663-1678.
- Wozney JM and Seeherman HJ (2004), Protein-based tissue engineering in bone and cartilage repair, *Curr opin Biotech* **15**(5):392-398.
- Wu Q, Zhang X, Wu B, Huang W. (2013). Fabrication and characterization of porous HA/ β -TCP scaffolds strengthened with micro-ribs structure. *Mater Lett* **92**:274-277.
- Wu X, Liu Y, Li X, Wen P, Zhang Y, Long Y, Wang X, Guo Y, Xing F, Gao J (2010). Preparation of aligned porous gelatin scaffolds by unidirectional freeze-drying method. *Acta Biomater.* **6**:1167-1177.
- Yildirim ED, Gandhi M, Fridman A, Gucer S, Sun (2008). W. Plasma surface modification of three dimensional poly(ϵ -caprolactone) scaffolds for tissue engineering application. *NATO science for peace and security series series A:chemistry and biology* 191-201.
- Yoshimoto H, Shin YM, Terai H, Vacanti JP (2003). A biodegradable nanofiber scaffold by electro-spinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials* **24**:2077-2082.
- Zhang H, Hussain I, Brust M, Butler MF, Rannard SP, Cooper AI (2005). Aligned two- and three-dimensional structures by directional freezing of polymers and nanoparticles. *Nat Mater.* **4**:787-93.
- Zhang Y, Yang F, Liua K, Shen H, Zhu Y, Zhang W, Liu W, Wang S, Cao Y, Zhou G (2012). The impact of PLGA scaffold orientation on *in vitro* cartilage regeneration. *Biomaterials* **33**:2926-2935.
- 강길선, 김문석, 민병현, 이일우, 이종문, 이해방. 생체조직공학용 지지체 (2006), *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **3**(4) 376-395.
- 김수민, 박정희, 임승순 (2002). 산소 플라즈마 처리가 폴리부틸렌숙시네이트의 친수성과 생분해성에 미치는 영향, 한국섬유공학회 **39**(4) 396-406.
- 김정호, 이옥주, Faheem AS, 주형우, 문보미, 박현정, 박찬흠 (2013). PCL/TiO₂ Nanoparticle 3차원 지지체 제조 및 특성 평가, *Polymer(Korea)*, **38**(2):150-155.
- 김종영, 윤준진, 박의균, 김신윤, 조동우. 정밀분사 시스템을 이용한 초고속조형 제작방식의 삼차원 PCL 및 PLGA 인공지지체 제작 (2008). *Tissue Engineering*

- and Regenerative Medicine*, **5**(3) 506-511.
- 김창현, 박민규, 이일규, 박재억 (2008). 치과에서 사용되는 이식재의 최신 연구 동향. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **5**(1) 26-32.
- 김태호, 오세행, 이명철, 이진호 (2010). 두 종류의 성장인자가 함께 도입된 반월 상 연골 형태 고분자 지지체의 제조 및 분석. *Biomaterials Research*, **14**(3):131-139.
- 김홍미, 강인규 (2008). 나노섬유의 조직공학적 응용. *고분자과학과 기술*, **19**(1):3-9.
- 박병기, 김형우, 나기권, 김승수, 이문철, 박찬조 (1999). 아크릴 아미드 그룹이 도입된 폴리에틸렌 필름의 염색성, *한국섬유공학회*, **36**(12):936-942.
- 박수아, 이준희, 김완두 (2009). 조직공학을 위한 생체모사용 스키펴드 개발. *Elastomers and composites*. **44**(2):106-111.
- 박정환, 이준희, 조현욱, 이수희, 박수아, 김완두 (2012). 다축 RP 소프트웨어 기술을 이용한 스키펴드 제조 장비 개발. *한국정밀공학회지* **29**(1):33-40.
- 배민수, 정성인, 김성은, 이정복, 허동녕, 권일근 (2008). 전기방사법을 이용한 조직재생용 나노섬유지지체, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **5**(2):196-203.
- 유성미 (2010). 혈관조직 공학을 위한 PLGA/gelatin 나노파이버 지지체와 다공성 지지체의 혈관 세포 성장에 미치는 영향.
- 윤재동 (1998). 가스의 용해량에 따른 고분자의 유리전이 온도 및 점도.
- 윤희숙, 윤준진, 박의균, 김승연, 현용택 (2008). 수면전개법을 이용한 메조다공성 생체활성유리-생분해성 고분자 복합체 자립박막의 제조. *Journal or the Korean Ceramic Society*, **45**(10):631-637.
- 이관행 (1997). 외국의 Rapid Tooling 응용 사례, 제 2 회 쾌속 조형 및 금형기술村 심포지움, 한국과학기술원.
- 조중희, 강방권, 김경수, 최병규, 김세훈, 최원열 (2005). 대기압 저온 플라즈마 처리에 의한 폴리이미드의 친수화 효과. *전기전자재료학회논문지* **18**(2) 148-152.
- 화학공학연구정보센터 (2008). 생체재료의 플라즈마 표면 개질.
- (주)누리텍 (2006). 플라즈마 표면처리의 개념. <http://www.nuri-tech.com/>.

감사의 글

연구에 대해 아는 것 하나 없이 두려움과 어딘지 모를 자신감으로 실험실 문을 노크했던 때가 생생한데 벌써 대학원 생활을 마무리 하는 시기가 되었습니다.

짧지도 길지도 않았던 대학원 생활을 뒤돌아보며 많은 것을 느낄 수 있었습니다. 지금 이 순간에 올 수 있기까지 아무런 대가 없이 저에게 많은 것을 베풀어 주신 모든 분들에게 진심으로 감사의 말씀 올립니다.

실험에 대한 기초가 없는 저에게 올바른 실험의 방향을 알려주시고, 하실 일이 많으셨음에도 불구하고 많은 것을 알려주시려 노력하셨던 명성운 박사님, 실험을 구상하고 설계하는 방법, 실험에 관련된 수많은 문서를 정리하는 방법과 실험을 접근하는 방법, 이외에도 실험과 관련된 조언을 아끼지 않으셨던 최도영 박사님, 제가 궁금해 했던 사항들에 대해, 혹은 올바른 결과물을 도출해 내기 위해 조언을 아끼지 않으신 황철호 박사님, 노효섭 박사님, 오용택 박사님께 감사드립니다.

찾아볼 때마다 밝은 표정으로 맞이해 주시며 조언과 격려를 아낌없이 주신 학부 과정의 지도교수님이신 양권승 교수님께도 감사드립니다.

실험실에서 2년이 넘는 기간 동안 다투기도 많이 다투고, 도움도 많이 주었던 동기 건수, 항상 생기 있어 보여 보고 있기만 해도 기분 전환되는 동기 채익이, 자칫 삭막할 뻔 했던 실험실의 분위기를 밝게 전환해 주었던, 앞으로 실험실을 이끌어 나갈 기동인 수영이와 영욱이 형, 졸업하시고도 꾸준히 연락 주시며 팁을 아끼지 않아주신 성환이형, 현주형, 후배처럼 많은 것을 알려주시고 도움을 주기 위해 노력해 주셨던 희상이 형 등 모든 실험실 인원들에게 감사드립니다.

공부에만 집중할 수 있도록 행정적인 면에서 부담을 덜어주신 황영선 선생님, 실험의 마무리를 잘 지을 수 있게 도와주신 황영현 선생님께도 감사드립니다.

힘들 때 제 이야기를 들어주며, 마음속 이야기를 편하게 할 수 있었던, 같이 있기만 해도 근심 걱정이 풀리는 저와 함께해 주었던 오랜 벗들 모두에게 앞으로도 오래도록 함께하자는 이야기 해주고 싶습니다.

언제나 아버지처럼 든든하게 돌보아 주시며 다방면에서 챙겨주시려 노력해 주신 김병훈 교수님께 감사드립니다. 항상 강조하신 열심히 라는 단어를 잊지 않고 살아가도록 노력하겠습니다. 한편으로는 지금까지 저에게 주신 사랑과 관심 조언에 그만큼 미치지 못해 죄송할 뿐입니다.

또한 공부하는데 지장이 없도록 좋은 환경을 만들어 주시고 본 논문이 완성되는 것에 큰 도움을 주신 고영무 교수님께도 감사드립니다.

마지막으로 지금까지 저를 믿어주시고 하고 싶은 공부 할 수 있도록 지원과 조언을 아끼지 않으셨던 부모님께 이 자리를 빌어서 감사하고, 사랑한다고 전해드리고 싶습니다. 언제나 자식의 뒷바라지를 위해 노력해 주시는 부모님께 기대에 미치는 아들이 되도록 노력하겠습니다.

더 큰 날개를 달 수 있도록, 더 높은 곳에서 먼 세상을 바라볼 수 있도록 격려와 도움, 질책과 조언을 아끼지 않으셨던 모든 분들에게 진심으로 감사드리며 가정에 안녕을 기원합니다.