



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](#)

2014년 8월

碩士學位論文

삼차원 폴리카프로락톤 스펀지의
산소 및 질소 플라즈마 표면처리에
따른 조골모세포의 증식에 관한 연구

조선대학교 대학원

치의학과

장 정 익

삼차원 폴리카프로락톤 스캐폴드의
산소 및 질소 플라즈마 표면처리에
따른 조골모세포의 증식에 관한 연구

Study on proliferation of preosteoblast onto O₂ and N₂
plasma surface treatment in three dimensional
polycaprolactone scaffolds

2014年 8月 25日

조선대학교 대학원

치의학과

장 정 익

삼차원 폴리카프로락톤 스펀지의
산소 및 질소 플라즈마 표면처리에
따른 조골모세포의 증식에 관한 연구

지도교수 고 영 무

이 논문을 치의학 석사학위신청 논문으로 제출함.

2014年 4月

조선대학교 대학원

치 의 학 과

장 정 익

장정익의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 김 희 중 印

위 원 조선대학교 교수 김 병 훈 印

위 원 조선대학교 교수 고 영 무 印

2014年 5月

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT	iii
제 1장 서론	1
제 2장 실험재료 및 방법	3
제 1절 3차원 PCL 스캐폴드 제조 ...	3
제 2절 플라즈마 표면개질 ...	7
제 3절 표면분석 ...	9
제 4절 조골모세포 배양 ...	10
제 5절 조골모세포 증식 ...	11
제 6절 조골모세포 분화 ...	12
제 7절 조골모세포 관찰 ...	13
제 8절 통계학적 분석 ...	14
제 3장 실험결과	15
제 1절 표면분석 ...	15
제 2절 조골모세포의 생물학적 평가 ...	19
제 4장 고찰	25
제 5장 결론	27
참 고 문 헌	28

LIST OF FIGURES

Fig. 1. 3D Bio-extruder equipment.....	4
Fig. 2. The structure of Notch type of 3D PCL fiber.....	5
Fig. 3. The photograph of 3D PCL scaffold sample.....	6
Fig. 4. Schematic diagram of plasma treatment device.....	8
Fig. 5. Water contact angles of untreated (a) PCL film, (b) O ₂ plasma treated PCL film, and (c) N ₂ plasma treated PCL film.....	16
Fig. 6. SEM images of (a) untreated PCL scaffold, (b) O ₂ plasma treated PCL scaffold, and (c) N ₂ plasma treated PCL scaffold.....	17
Fig. 7. AFM images of (a) untreated PCL scaffold, (b) O ₂ plasma treated PCL scaffold, and (c) N ₂ plasma treated PCL scaffold.....	18
Fig. 8. The proliferations of MC3T3-E1 cell seeded on pristine PCL scaffold and surface modified scaffolds for 1, 3, and 5 days	21
Fig. 9. ALP activity of the MC3T3-E1 cell seeded on pristine PCL scaffold and surface modified scaffolds for 4 and 8 days.....	22
Fig. 10. SEM micrographs of the MC3T3-E1 cell seeded on (a,d) PCL, (b,e) O ₂ plasma treated PCL scaffold, and (c,f) N ₂ plasma treated PCL scaffolds.....	23
Fig. 11. Fluorescence images of the MC3T3-E1 cell seeded on (a,d) PCL, (b,e) O ₂ plasma treated PCL scaffolds, and (c,f) N ₂ plasma treated PCL scaffolds.....	24

ABSTRACT

Study on proliferation of preosteoblast onto O_2 and N_2 plasma surface treatment in three dimensional polycaprolactone scaffold

Jung-Ik Jang, 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

Polycaprolactone (PCL) was used as biomaterial in bone tissue engineering. However drawbacks of these scaffolds derived from the intrinsic hydrophobicity represents low cell seeding efficiency. In this study, 3D PCL scaffolds were modified with O_2 and N_2 plasma surface treatment to enhancing the proliferation of pre-osteoblast cell. In addition, strut of 3D PCL scaffolds were fabricated by using notched type nozzle to increase the cell adhesion. Plasma treated 3D PCL scaffolds were characterized by scanning electron microscopy, atomic force microscopy, and contact angle measurement. It is concluded that the oxygen and nitrogen plasma were induced hydrophlicity of 3D PCL scaffolds. Biological evaluations of different 3D PCL scaffolds were investigated by MTT assay, ALP activity, and live/dead assay. Plasma treated scaffolds showed higher proliferation and differentiation than untreated 3D PCL scaffolds. The fluorescence images of live/dead cell assay indicated that plasma treated scaffolds were enhanced cell viability. Plasma treated notch type 3D PCL scaffolds shows more biocompatibility compared with untreated 3D PCL scaffolds. The O_2 and N_2 plasma surface treatments of 3D PCL scaffold present applicable techniques for the development of biomaterials.

제 1 장 서 론

조직공학 분야에서는 다양한 생체재료를 사용하여 3차원의 조직 재생에 필수적인 인공지지체 제작에 관한 연구를 예로부터 활발히 수행해 왔다(Lanza 등, 2007; Park 등, 2011).

조직공학이란 생물학적 기능을 하는 세포와 세포의 주변 환경을 조절할 수 있는 공학적인 기술을 이용하여 세포의 기능을 조절하고 궁극적으로 환자의 손상된 조직에 이식하여 원하는 기능을 구현할 수 있는 모든 과정 및 방법을 포함하는 포괄적인 의미로 사용될 수 있으며, 이러한 조직공학을 이용하여 인체의 여러 조직 및 장기를 재생하고자 하는 연구가 오래 전부터 시도되어 왔다(Jin 등, 2004; Chen 등, 2003).

인체 내 사용을 위한 현재 활발히 연구가 진행되고 있는 생체 적합성 고분자들이 가진 특성중 하나는 생분해 특성이다. 특히 폴리락타이드(PLA), 락타이드 글리콜라이드 공중합체(PLGA), 그리고 폴리카프로락톤(PCL) 등은 폴레에스터 계열의 고분자로서 생분해특성과 생체적합성 때문에 다양한 의료용 분야의 연구에 응용되고 있다(Seo 등, 2005).

폴리카프로락톤(Polycaprolactone, PCL)은 현재 대표적인 생분해성 고분자 가운데 하나로서 기타 고분자들과의 친화성(compatibility)이 우수하며, 무독성, 기계적 강도가 우수하고 가공성이 용이하여 조직공학 및 의료분야에 사용되고 있으며 이러한 이유로 model polymer로도 선택되어오고 있다(Yoshimoto 등, 2003; Ratner 등, 1996; Lindo 등, 2006).

지지체를 제조하는데 사용되는 방법으로는 염추출법(Particulate leaching), 이산화탄소를 이용한 발포법(Gas foaming), 동결 건조법(Freeze drying), 등의 방법은 원하는 형상을 얻기 어려울 뿐 더러 공극의 크기 및 모양을 일정하게 얻을 수 없다는 단점 또한 지니고 있다. 또한 이용되는 재료나 첨가물 간의 독성이 문제가 될 수 있으며 제작방법이 복잡해질 수 있는 문제점을 지니고 있다.

조직공학에서 현재 시도중인 초고속 조형기술에는 마이크로 광조형기술(MSTL), 열용해 적층법(FDM) 및 3D 잉크제트 법(3D Printing, 3DP) 등이 있

으며 이러한 기술을 이용함으로써 인공지지체의 내/외부 형상을 완벽히 제어할 수 있다. 따라서 이러한 가공기술은 기존의 방식들에 비해 인공지지체 제조 관점에서 많은 장점을 가지게 된다(Kim 등, 2008).

이에 따라 본 연구에서는 공극의 크기 및 구조, 연결성 등 공극을 제어할 수 있으며 첨가물이 없어 독성의 염려가 없는 RP(Rapid Prototyping)법을 이용하여 PCL 스캐폴드를 제조하여 사용하였다.

RP법을 이용하여 제작한 PCL 스캐폴드는 생체적합성이 우수한 반면 고유의 소수성기가 강한 점이 있으며, 플라즈마 처리를 이용해 친수성을 부여할 수 있다. 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 등 다양하다(Cho 등 2004).

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

본 연구에서는 톱니바퀴 모양의 노즐을 사용한 3D PCL 스캐폴드를 이용하여 PCL 스캐폴드의 생체적합성을 향상시키고, 플라즈마 표면개질된 PCL 스캐폴드를 이용하여 스캐폴드 표면의 물리화학적 특성과 조골모세포인 MC3T3-E1 세포를 이용한 세포 증식과 분화 특성을 평가하고자 하였다.

제 2 장 실험재료 및 방법

제 1 절 3 차원 PCL 스캐폴드 제조

본 실험에서 사용되는 3차원 스캐폴드는 쾌속조형기반(Rapid Prototyping: RP) 3 차원 바이오 플로팅 장치를 이용하여 제조하였다(Fig. 1). 먼저 Polycaprolactone (PCL, Sigma-Aldrich, Mw: 45,000)을 쾌속조형기반 장치의 실린더에 넣고 고온으로 가열한 후 직경 20 mm, 높이 3 mm, pore size 500 μm , degree 90° 의 톱니바퀴 모양의 스캐폴드를 제조하여 시료로 사용하였다. Fig. 2는 3 차원 PCL 파이버의 모식도이다.

Fig. 3은 3 차원 PCL 스캐폴드 샘플의 광학 사진을 나타낸 것이다. 또한 접촉각 측정을 위한 PCL 필름을 제작하기 위하여 PCL 10 wt% (Mw: 45,000)를 클로로포름 (SK chemicals, Korea)에 넣고 60 °C에서 1 시간 교반하였다. 이 용액을 몰드에 넣고 실온에서 용매를 증발시켜 두께가 약 0.2 mm인 PCL 필름을 제작하여 사용하였다.



Fig. 1. 3D Bio-extruder equipment.



Fig. 2. The structure of Notch type of 3D PCL fiber.

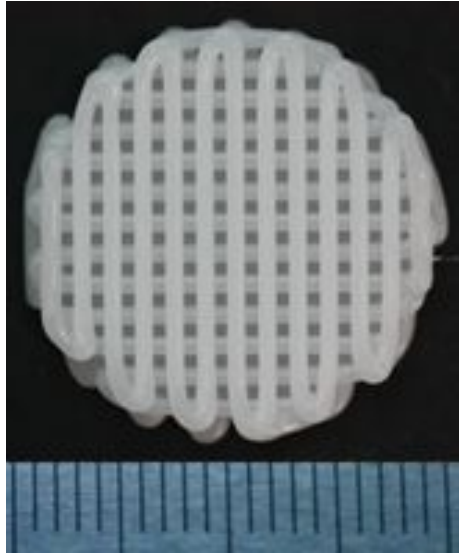


Fig. 3. The photograph of 3D PCL scaffold sample.

제 2 절 플라즈마 표면개질

플라즈마 반응장치의 구성도는 Fig. 4에 나타내었다. 플라즈마 표면개질에 사용된 가스는 산소(Oxygen, 아주산소)와 질소(Nitrogen, 아주산소)를 사용하였고, 플라즈마 처리에 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} Torr 진공도를 유지하였다. 시료대는 상부 전극으로부터 30 mm 떨어진 곳에 위치한다. 플라즈마 표면처리반응은 가스의 압력과 챔버 내부 반응압력을 50 mTorr로 유지한 후, 100 W 로 3분 동안 수행하여 시료로 사용하였다.

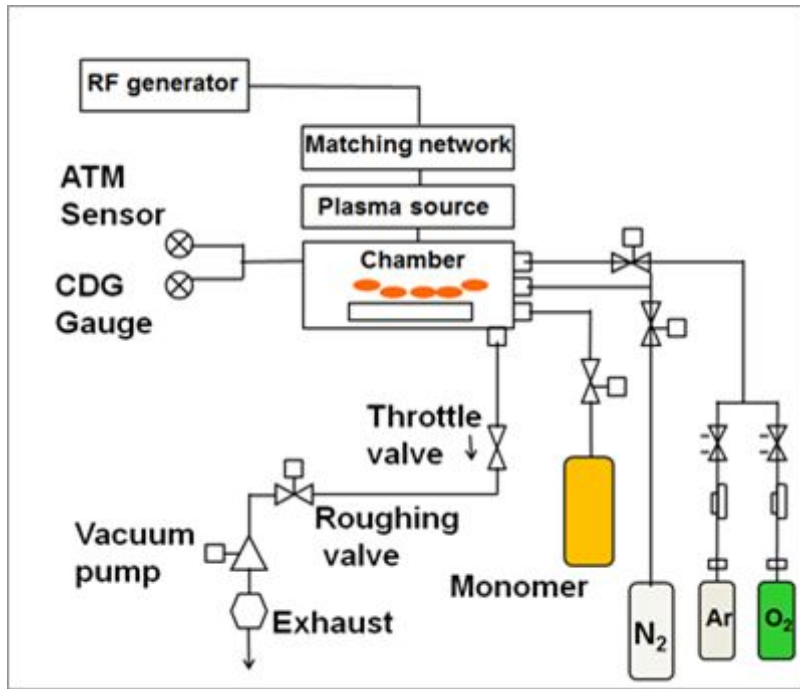


Fig. 4. Schematic diagram of plasma treatment device.

제 3 절 표면분석

무처리 PCL 필름 및 산소와 질소 플라즈마로 표면개질 된 PCL 필름을 각각 준비하여 접촉각을 측정하였다. 각 시편의 접촉각 변화를 관찰하기 위하여 증류수 약 5 μl 를 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 스캐폴드 와 산소와 질소 플라즈마로 표면개질 된 PCL 스캐폴드의 표면형상을 관찰하였다.

플라즈마 표면개질 처리 된 PCL 스캐폴드 표면의 거칠기 변화를 확인하기 위하여 원자력 간 힘 현미경(AFM: atomic force microscopy, XE-100, Park system, Korea)을 이용하였다.

제 4 절 조골모세포 배양

본 실험에 사용된 세포는 생쥐 두개골에서 유래한 조골모세포 MC3T3-E1을 ATCC에서 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 serum (FBS, PAA Laboratoris, Inc. A15-751)과 항생제인 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin이 혼합된 세포배양액을 혼합하여 5% CO₂가 공급되는 37 °C, 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 조골모세포 분화

MC3T3-E1 세포 배양 24시간 후 분화배지를 교체하고 2일 마다 분화배지를 교체하였다. 7일과 14일 후 well plate에 cell media를 제거하고 PBS로 2회 세척한 후 세포 lysis buffer를 well당 150 μ l씩 넣어서 20분 간 wise mix를 이용하여 교반하였다. 스크래퍼를 이용하여 well내에 존재하는 세포를 추출하여 microtube에 담근 후 4 $^{\circ}$ C, 2500 rpm에서 10분 동안 원심분리하고 상층액을 새로운 microtube에 옮겨주고 냉동보관 하였다. 30분 동안 37 $^{\circ}$ C에서 상층액이 담긴 microtube를 배양 후 0.1N Glycine-NaOH buffer와 15mM p-NPP 혼합액을 500 μ l씩 첨가하여 405 nm에서 흡광도를 측정하여 ALP (alkaline phosphatase) activity를 계산하였다.

단백질 정량에는 Bradford Method가 사용되었다. 1mg/ml bovine serum albumin(BSA)을 사용하여 표준용액을 제조한 후 측정하고자 하는 단백질을 증류수로 희석하여 20 μ l로 제조하여 5분간 배양 후 592 nm에서 흡광도를 측정하고, 표준정량곡선으로부터 단백질의 농도를 결정하였다.

제 7 절 조골모세포 관찰

1. 주사전자현미경에 의한 관찰을 위한 세포 전처리

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

2. Live/Dead assay에 의한 관찰을 위한 세포 전처리

준비된 샘플이 담겨진 12 well plate에 배양된 MC3T3-E1 세포를 2×10^5 cells/mL의 농도로 파종하였다. 세포 파종 후 24시간이 지나면 PBS를 이용하여 2회 세척하였다. Live-Dead Cell staining kit(Biovision #k 501-100)을 사용하여 각 well당 1 ml씩 염색시약을 첨가하여 주었고, 37 °C에서 15 분 동안 배양하였다. PCL 샘플을 cover glass 위에 부착하여 형광현미경으로 관찰하기 전까지 4 °C에서 보관하였다.

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 3 장 실험결과

제 1 절 표면분석

Fig. 5는 접촉각 측정 결과를 나타낸 것이다. 무처리 PCL 스캐폴드와 산소와 질소 플라즈마 처리를 한 PCL 스캐폴드는 물이 바로 흡수가 되어 측정할 수 없었으며, 무처리 PCL 필름의 경우 접촉각이 약 66.69° 로 측정되었고 산소와 질소 플라즈마 처리를 한 PCL 필름은 각각 약 8.43° 와 4.18° 로 친수성이 향상됨을 알 수 있었다.

Fig. 6은 주사전자현미경 측정 결과를 나타낸 것이다. 무처리 PCL 스캐폴드와 산소와 질소 플라즈마 처리를 한 PCL 스캐폴드는 주사현미경 측정결과 파이버의 형태는 차이가 크지 않았다.

Fig. 7은 원자힘 현미경 측정 결과를 나타낸 것이다. 무처리 PCL 필름의 경우 표면 거칠기(Rq)가 13.566 nm 로 측정되었고 산소와 질소 플라즈마 처리를 한 PCL 필름의 경우 Rq 값이 각각 72.065 nm 와 41.460 nm 로 약 5.3배와 3.05배 향상되었다.

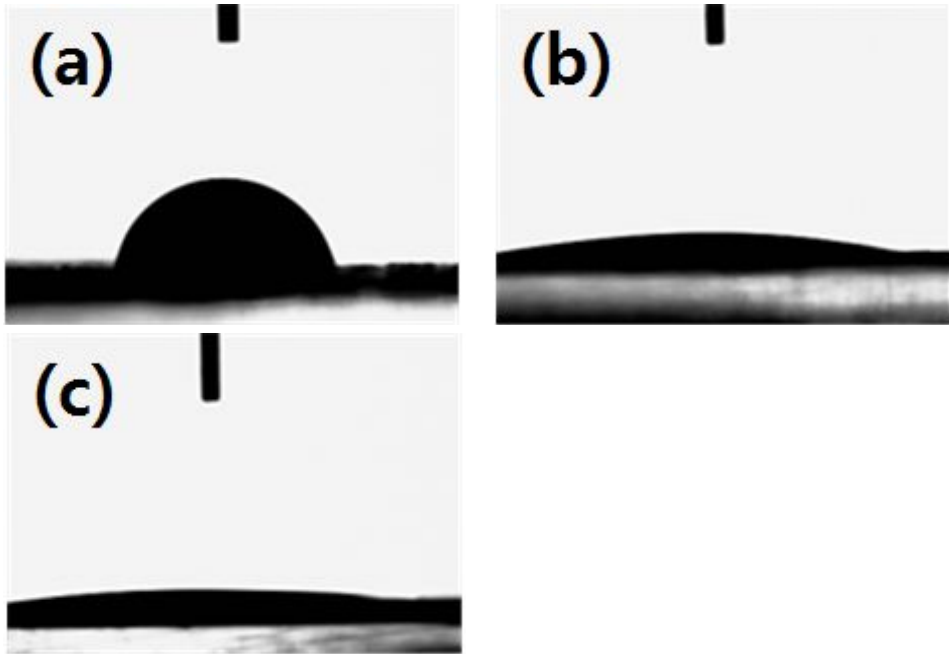


Fig. 5. Water contact angles of untreated (a) PCL film, (b) O_2 plasma treated PCL film, and (c) N_2 plasma treated PCL film.

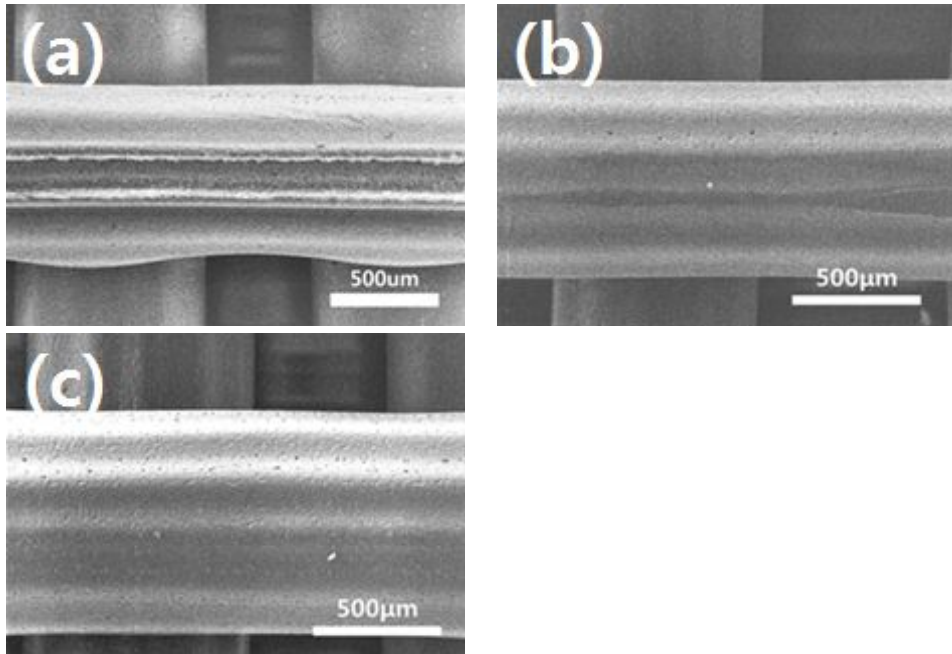


Fig. 6. SEM images of (a) untreated PCL scaffolds, (b) O_2 plasma treated PCL scaffolds, and (c) N_2 plasma treated PCL scaffolds.

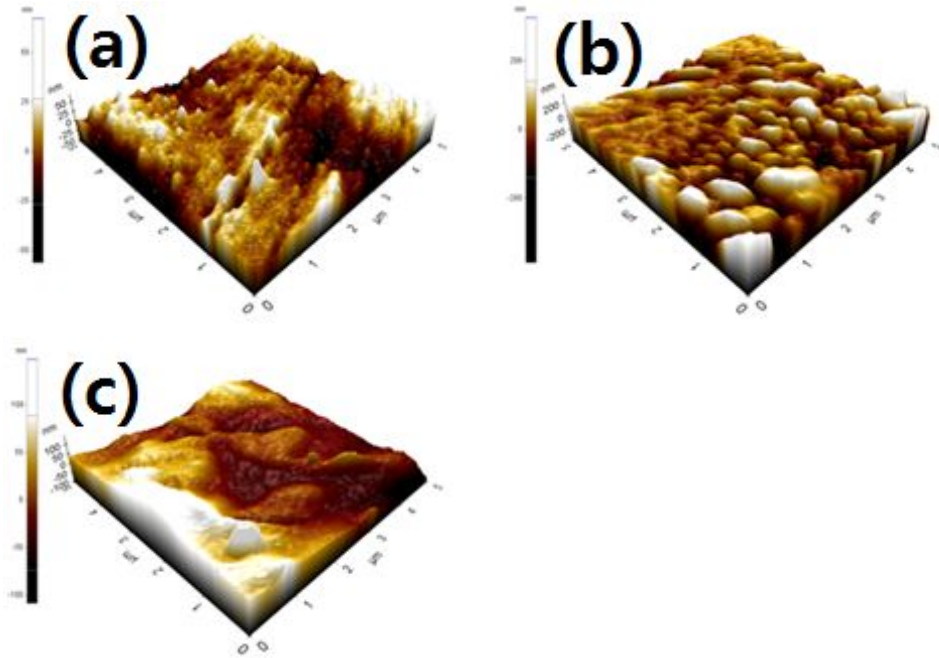


Fig. 7. AFM images of (a) untreated PCL scaffold, (b) O_2 plasma treated PCL scaffold, and (c) N_2 plasma treated PCL scaffolds.

제 2 절 조골모세포의 생물학적 평가

Fig. 8은 PCL 스캐폴드 표면에 플라즈마를 처리하여 산소와 질소 플라즈마가 MC3T3-E1 세포생존율에 미치는 영향을 평가하기 위하여 MTT assay를 이용하여 관찰하였다. MTT assay는 세포의 미토콘드리아 활성과 직접연관이 있는 방법으로 세포의 생존율을 측정할 때 일반적으로 널리 사용되는 방법이다. 이 실험에서 대조군은 무처리 3차원 PCL 스캐폴드를 사용하였고, 산소와 질소 플라즈마 처리된 3차원 PCL 스캐폴드를 실험군으로 사용하였다. MC3T3-E1 세포 생존율은 대조군과 실험군 모두 1 일, 3 일, 5 일 동안 배양하였고, 생존율 (%) 계산은 1 일 동안 배양한 대조군의 생세포수를 100%로 했을 때 실험군에 생세포수를 비율로 나타낸 것이다. 세포배양기간이 증가하면서 실험군의 세포 생존율이 증가함을 알 수 있었다. 1 일 배양의 경우에는 모든 시료의 세포 증식률이 유사한 값을 나타냈으나 3 일째가 되면서 질소 플라즈마 처리를 한 시료의 세포 증식률이 미세하게 증가하였다. 5 일째가 되면서 대조군과 실험군 모두 세포 증식률은 증가하는 경향을 보였으며, 질소 플라즈마 처리된 3차원 PCL 스캐폴드의 경우 무처리 PCL 스캐폴드에 비해 유의성 있게 세포 증식률이 증가한 것을 확인할 수 있었다.

Fig. 9는 PCL 스캐폴드 표면에 산소와 질소 플라즈마를 처리하고 MC3T3-E1 세포를 이용하여 ALP 활성도를 관찰한 결과이다. 관찰결과 4 일과 8 일 모두 ALP 활성도가 증가한 것을 확인할 수 있었으며, 4 일 차에서 질소 플라즈마와 무처리 PCL 스캐폴드가 유의성이 있었고, 8 일 짜에서도 산소 플라즈마 처리한 그룹과 질소 플라즈마 처리한 그룹이 모두 무처리 3차원 PCL 스캐폴드와의 유의성이 있었다.

Fig. 10은 주사전자현미경을 이용하여 각각의 PCL 스캐폴드 표면에서 2시간 동안 배양된 조골모세포의 부착을 관찰한 결과이다. 산소와 질소 플라즈마 처리하여 친수성으로 변한 PCL 스캐폴드 표면에 있는 세포들은, 크고 세포 수도 많이 볼 수 있는 반면에 무처리 PCL 스캐폴드 그룹에서는 감소한 경향을 관찰 할 수 있었다. 산소와 질소 플라즈마 처리한 3차원 PCL 스캐폴드는 세포의 부착과 성장에 효과를 나타냄을 알 수 있다(Jung 등, 2012).

Fig. 11은 Live/Dead 형광 현미경 사진을 나타낸 것이다. 살아 있는 세포는 초록색으로, 죽은 세포는 빨간색으로 염색하여 세포가 살아있는 양을 시각적으로 볼 수 있다. 무처리 PCL 스캐폴드 그룹보다 산소와 질소 플라즈마 처리를 한 PCL 스캐폴드에서 살아있는 양이 더 많은 것을 관찰할 수 있었다.

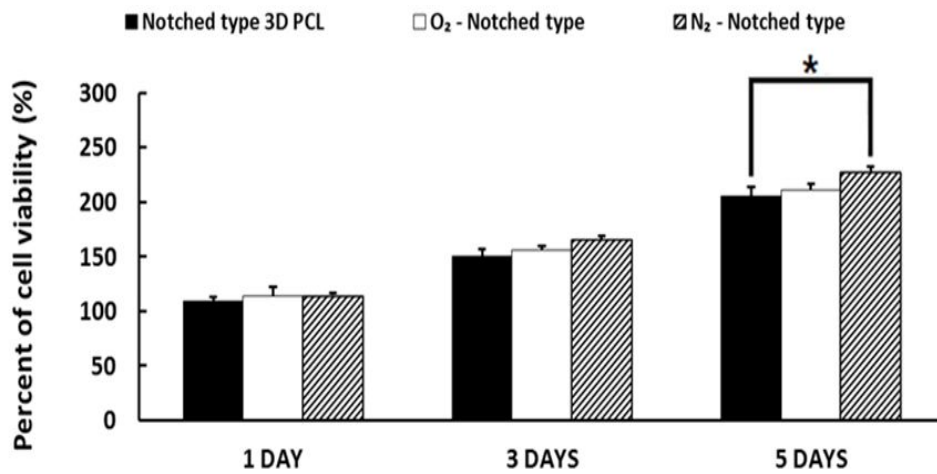


Fig. 8. The proliferations of MC3T3-E1 cell seeded on pristine PCL scaffold and surface modified scaffolds for 1, 3, and 5 days.

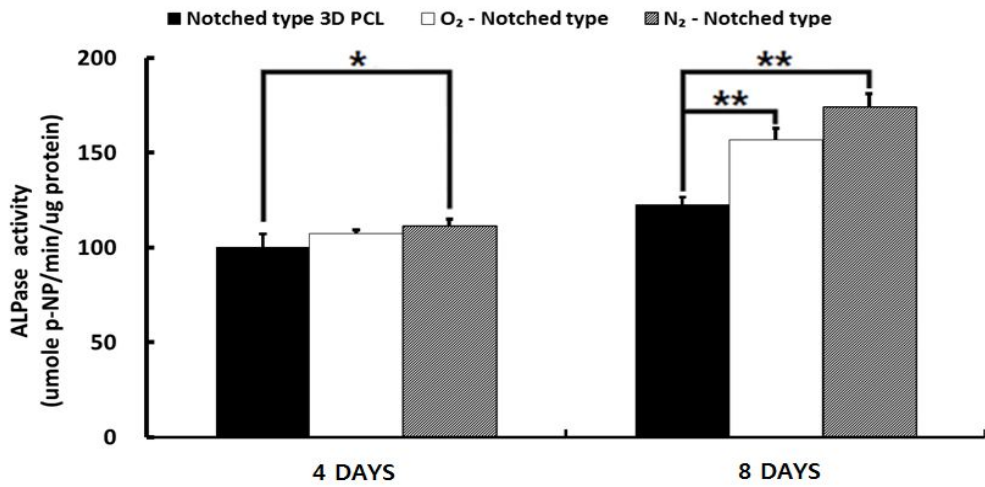


Fig. 9. ALP activity of the MC3T3-E1 cell seeded on pristine PCL scaffold and surface modified scaffolds for 4 and 8 days.

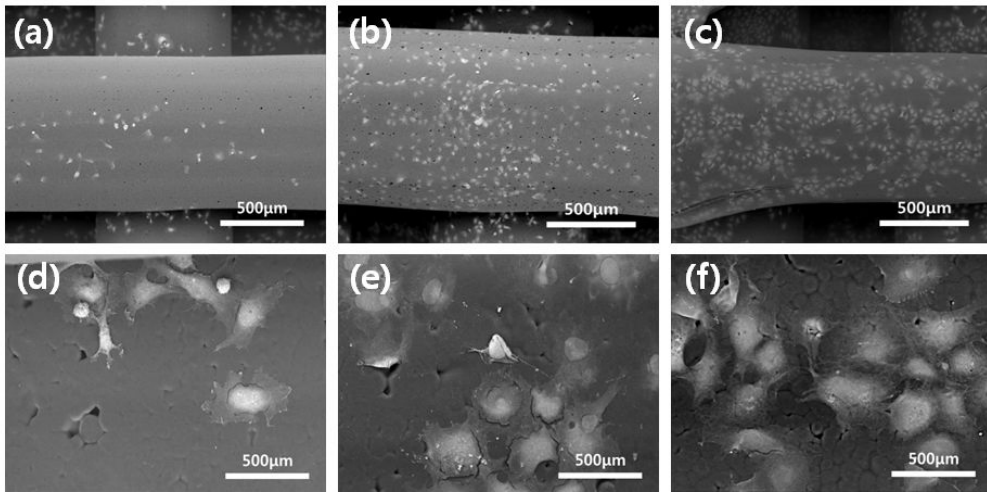


Fig. 10. SEM micrographs of the MC3T3-E1 cell seeded on (a,d) PCL, (b,e) O₂ plasma treated PCL scaffolds, and (c,f) N₂ plasma treated PCL scaffolds.

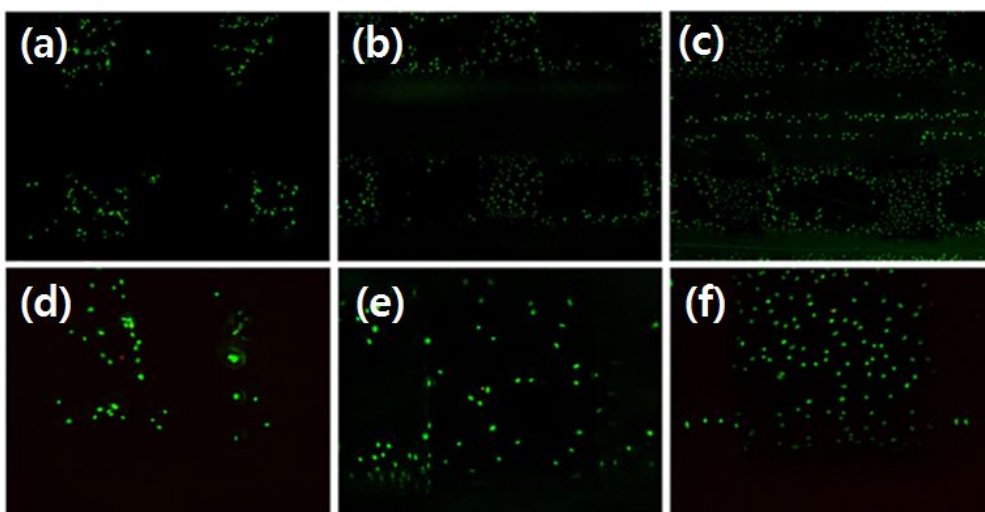


Fig. 11. Fluorescence images of the MC3T3-E1 cell seeded on (a,d) PCL, (b,e) O_2 plasma treated PCL scaffolds, and (c,f) N_2 plasma treated PCL scaffolds.

제 4 장 고찰

무처리 3D PCL 스캐폴드의 경우 약 66.69° 의 접촉각이 측정 되었고 산소와 질소 플라즈마 처리를 한 PCL 필름은 각각 약 8.43° 와 4.18° 로 친수성이 크게 향상함을 볼 수 있다.

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

하지만 일반적으로 플라즈마 처리로 인해 시편의 표면에 생긴 극성기는 시간이 경과함에 따라 소멸되는 결점이 있다고 알려져 있다(Kim 등, 2002 ; Pak 등, 1999)

본 실험에서는 산소, 질소 두가지의 플라즈마를 사용하여 표면을 개질시켰다. 주사전자현미경 결과에서 산소 플라즈마 처리를 한 스캐폴드와 질소 플라즈마 처리를 한 스캐폴드의 표면 형상의 차이는 크게 알 수 없었다.

원자힘 현미경 결과에서 산소 플라즈마를 처리한 그룹은 약 72.065 nm 정도의 거칠기로 질소 플라즈마를 처리한 그룹에 비해 약 1.7배 증가함을 알 수 있다.

질소 플라즈마는 불활성 가스의 일종으로 반응성이 없는 가스이며, 이로 인해 플라즈마 발생 시 시료 표면에 가하는 힘은 물리적인 식각의 성질이 더 강하게 된다. 따라서 무처리 3D PCL이 가진 거칠기에 비해서는 약 3.1배 증가하였지만 산소 플라즈마를 처리한 그룹에 비해서는 약 2.2배 낮은 결과를 보였다.

반면 산소 플라즈마는 반응성 가스로서 표면물질과 반응하여 휘발하는 휘발성 물질이다. 따라서 화학적 식각의 성질이 물리적 식각에 비해 더 강하며, 화학적 식각과 물리적 식각이 동시에 일어나기 때문에 표면 거칠기가 크게 향상하는 결과를 볼 수 있다.

세포가 증식, 분화하기 위해서는 세포가 시편에 접촉이 잘 되어야 한다. 접촉하지 않고 부유하는 세포는 성장할 수 없기 때문에 재료 표면이 세포 친

화성을 가지고 있어야 한다. 재료표면의 세포 친화성을 평가하기 위해서는 in vitro 세포 배양 실험을 통하여 배양 후 부착·성장된 세포의 수를 세는 방법과 세포 형태 변화를 관찰하는 것이 일반적인 방법이다.

산소와 질소플라즈마 처리를 한 3차원 PCL 스캐폴드의 경우 무 처리 3차원 PCL 스캐폴드에 비해 접촉각이 크게 향상되었다. 접촉각이 향상된 것으로 미루어 보아 친수성이 크게 향상되었고, 조골모세포가 성장하기에 적합한 표면으로 변화되어 일어난 현상으로 사료되어 증식 및 분화에 긍정적인 영향을 미쳤을 것으로 사료된다.

이는 산소와 질소 플라즈마가 MC3T3-E1 조골 세포를 골세포로 분화되는 것을 촉진함으로써 ALP 활성이 증가한 것을 알 수 있었다 (Seo 등,2010).

제 5 장 결론

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

- (1) 산소 플라즈마와 질소 플라즈마가 처리된 3차원 PCL 스캐폴드는 표면 거칠기가 보다 향상 되었다.
- (2) 물 접촉각 측정에서 플라즈마 처리된 3차원 PCL 스캐폴드 표면이 친수성을 나타냄을 알 수 있었다.
- (3) 산소 플라즈마와 질소 플라즈마가 처리된 3차원 PCL 스캐폴드는 조골모 세포의 접착이 향상 되었음을 확인 하였다.
- (4) MTT 세포 독성 실험과 ALP 활성 실험에서 산소 플라즈마와 질소 플라즈마가 처리된 3차원 PCL 스캐폴드는 조골모 세포의 증식과 분화가 향상 되었다.

결론적으로 산소와 질소 플라즈마가 처리된 3차원 PCL 스캐폴드는 골 재생 및 골 융합을 향상시켜 골 조직공학 응용에 유용한 바이오소재로써 사용될 것으로 사료된다.

참고문헌

- 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.
- Chen JS, Altman GH, Karageorgiou V, Horan R, Collette A, Volloch V, Colabro T, and Kaplan DL., Human bone marrow stromal cell and ligament fibroblast responses on RGD-modified silk fibers. *J. Biomed Mater Res Part A*, 67, 559(2003)
- Cheung HS. and Haak MH. (1989). Bone cell behavior on Matrigel®-coated Ca/P coatings of varying crystallinities, *Biomaterials*, 10:63-67
- Cho JH, Kang BK, Kim KS, Choi BK, Kim SH, Choi WY. (2005). Hydrophobic Effect of the Polyimide by Atmospheric Low-temperature Plasma Treatment. *Journal of Korean Institute of Electrical and Electronic Material Engineers* 18(2) 148-152
- Elmengaard B, Bechtold J. E, Soballe K (2005). In vivo effects of RGDcoated titanium implants inserted in two bone-gapmodels. *J Biomed Mater Res A* 75:249-255.
- Jin HJ, Chen JS, Karageorgiou V, Altman G. H, and Kaplan DL. Human bone marrow stromal cell responses on electrospun silk fibroin mats *Biomaterials*, 25, 1039 (2004)
- Jung SC, Lee K, Kim BH (2012). Biocompatibility of plasma polymerized sandblasted large grit and acid titanium surface. *Thin Solid Films* 521:150-154.
- Kim JY, Yoon JJ, Park EK, Kim SY and Cho DW. 정밀분사 시스템을 이용한 초고속조형 제작방식의 삼차원 PCL 및 PLGA 인공지지체 제작 (2008). *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 5(3) 506-511
- Kim SM, Park CH, and Im SS (2002). Effect of Oxygen Plasma Treatment on Hydrophilicity and Biodegradability of Poly(butylene succinate) 39(4) 396-406

- Lanza R, Langer R, Vacanti J, Principles of tissue engineering, 3rd edition, *Academic Press* (2007).
- 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.
- Pak PK, Kim HW, Na KK, Kim SS, Lee MC. and Park CJ (1999). "Dyeability of Polyethylene Film Modified with Acryl Amide Groups" , *J Korean Fiber Soc.*, 36(12) 936-942.
- Park SA, Lee SH , Kim WD (2011). Fabrication of porous polycaprolactone / hydroxyapatite (PCL/HA) blend scaffolds using a 3D plotting system for bone tissue engineering, *Bioprocess Biosyst Eng*, 34, 505.
- 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.
- Puleo DA., Holleran LA., Doremus RH, and Bizios R. (1991). Osteoblast responses to orthopedic implant materials in vitro, *J. Biomed Mater. Res*, 25:711-723
- Puleo DA. and Bizios R. (1992). Formation of focal contacts by osteoblasts cultured on orthopedic biomaterials, *J. Biomed. Mater. Res* 26(3):291-301
- Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE (1996). Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine. *Academic Press* 50-69,84-94.
- 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.
- 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.
- Seo HS, Ko YM, Shim JW, Lim YK, Kook JK, Cho DL, Kim BH (2010). Characterization of bioactive RGD peptide immobilized onto poly(acrylic acid) thin films by plasma polymerization. *Appl Surf Sci* 257:596-602.
- Seo KS, Hong KD, Hong H, Kim MS, Khang GS, and Lee HB. Sustained release of proteins using temperature sensitive MPEG-PCL hydrogels. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2, 109(2005)
- 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.