



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 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](#) 

2012년2월
석사학위 논문

생체모사형 하이브리드 세포담체 제작에 대한 연구

조선대학교 대학원
기계공학과
홍 순 기

2012년2월 석사학위논문

생체모사형 하이브리드 세포담체 제작에 대한 연구

홍순기

생체모사형 하이브리드 세포담체 제작에 대한 연구

The study for fabricating hybrid scaffolds
mimicking human tissue.

2012년 2월 24일

조선대학교 대학원

기계공학과

홍 순 기

생체모사형 하이브리드 세포담체 제작에 대한 연구

The study for fabricating hybrid scaffolds
mimicking human tissue.

지도교수 김 근 형

이 논문을 공학 석사학위신청 논문으로 제출함

2011년 10월

조선대학교 대학원

기계공학과

홍 순 기

홍순기의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교 수 박길문 (인)

위 원 조선대학교 교 수 이행남 (인)

위 원 조선대학교 조교수 김근형 (인)

2011년 11월

조선대학교 대학원

목 차

List of Table	-----	iv
List of Figure	-----	vi
Abstract	-----	xiii

제 1 장 서론

1. 연구의 배경 및 목적	1
----------------	---

제 2 장 조직공학과 세포담체

1. 조직공학	2
2. 세포 지지체 제작	6
3. 참고문헌	10

제 3 장 전기방사된 PCL/콜라겐 생복합 지지체 : 설계, 제작, 그리고 물리적 그리고 세포성 반응.

1. 서론	40
2. 실험	42
3. 결과	46
4. 결론	51
5. 참고문헌	52

제 4 장 쾌속조형방법으로 제작된 PCL/콜라겐 하이브리드 지지체 제작에 대한 연구.

1. 서론	67
2. 실험	69
3. 결과	74
4. 결론	79
5. 참고문헌	80

List of Tables

제 2 장

Table 1. Polymer scaffold processing for tissue engineering. ---	18
Table 2. Evaluation method for biocompatibility. -----	19
Table 3. Division and applications of natural polymers- I . -----	20
Table 4. Division and applications of synthetic polymers-Ⅱ. ---	21
Table 5. Optimal pore size of scaffold. -----	22
Table 6. Porosities and pore sizes of scaffolds for bone regeneration made from natural polymers. -----	23
Table 7. Porosities and pore sizes of scaffolds for bone regeneration made from chemically synthesized polymers- I . -----	24
Table 8. Porosities and pore sizes of scaffolds for bone regeneration made from chemically synthesized polymers-Ⅱ. -----	25

제 3 장

Table 1. Weight fractions of PCL and collagen for fabricated PCL/Collagen(P/Col) tube. -----	56
--	----

제 4 장

Table 1. Weight fractions of hybrid scaffold. -----	83
Table 2. Comparison of Young's modulus between various hybrid scaffold. -----	84

List of Figures

제 2 장

- Fig. 1 The diagram of human skin. ----- 26
- Fig. 2 Various applications of tissue engineered scaffolds. --- 27
- Fig. 3 Shapes of water droplets on (a) the PAN nanofibers with a rough surface; (b) the native PAN film with smooth surface. ----- 28
- Fig. 4 Cellular migration is halted due to the lack of oxygen and nutrients supply. The layer of cells that can survive on the diffusion of oxygen and nutrients from the medium is called the cellular penetration depth (D_p). ----- 29
- Fig. 5 Conventional methods for scaffold fabrication. ----- 30
- Fig. 6 (a) ESEM micrographs of collagen-glycosaminoglycan scaffolds produced using the quenching technique in the large pans, (b) and the constant cooling rate technique (0.9 °C/min) in the small pans. ----- 31
- Fig. 7 A schematic diagram of the FDM extrusion and deposition process. ----- 32
- Fig. 8 Schematic diagram of electrospinning set-up. ----- 33
- Fig. 9 Electromicroscopic appearances of the formed macroporous scaffolds.(a - d) Scaffolds prepared by UV irradiation of

pCLLA-tetraacrylates ($M_w = 5,000$ and $10,000$) and the azo-compound (macromonomer:azo-compound acetone solution = 1:1 and 1:2); (e) pCLLA-tetraacrylate scaffold using NH_4HCO_3 particles and UV irradiation; (f) conventional PLLA scaffolds using NH_4HCO_3 particles. - 34

Fig. 10 SEM photographs of the cross-section of foams fabricated by combining the phase-separation and particle-leaching techniques. ----- 35

Fig. 11 (a) STL design file for the 1.75 mm $x = y = z$ porous scaffold. (b) 1.75 mm $x = y = z$ PCL scaffold fabricated by SLS. ----- 36

Fig. 12 Images of PDLLA network scaffolds with a gyroid architecture, built by stereolithography. (a) Photograph, (b) mCT visualisation and (c) SEM image. In (d) a light microscopy image is shown for a scaffold seeded with mouse pre-osteoblasts after 1d of culturing. Scale bars represent 500 μm . ----- 37

Fig. 13 Electrospinning concurrent with salt deposition: (a) schematic diagram of the electrospinning and salt deposition set-up; (b) photograph of resultant nanofibers/salts composite. -----38

Fig. 14 The magnified image in (a) shows the surface of the collagen strands, and the magnified image in (b) shows a

cross section of a collagen strand. ----- 39

제 3 장

Fig. 1 Schematic of fabrication PCL/collagen tube. (a) fabrication of tube type scaffold by using an electrospinning-dipping process. (b) Collector of random and align type for align of nanofiber. (c) Optical image and layer-by-layer structure of nanofiber tube by using an electrospinning-dip ping process. ----- 57

Fig. 2 Surface shape of nanofiber mat after collagen dipping process. (a) 0.1 wt%. (b) 0.5 wt%. (c) 1 wt%. ----- 58

Fig. 3 SEM image and diameter distribution of fabricated fibrous tube. (a-b) Random type, (a) Internal section ($D = 2.1 \pm 0.5 \mu\text{m}$), (b) External section ($1.8 \pm 0.4 \mu\text{m}$). (c-d) Align type, (c) Internal section ($1.9 \pm 0.7 \mu\text{m}$), (d) External section ($2.0 \pm 0.5 \mu\text{m}$). ----- 59

Fig. 4 Alignment of nanofirous tube by using FWHM. (a) P/Col-R = 23° . (b) P/Col-A = 20° . ----- 60

Fig. 5 Cross sectional image of (a) PCL, (b) P/Col-3, (c) Thickness of collagen layer of P/Col tube. ----- 61

Fig. 6 FTIR spectra of collagen sponge before and after cross-linking with EDC solution. ----- 62

Fig. 7 WCA of P/Col tube. (a)PCL (b)P/Col-R. (c)P/Col-A. (d) water contact angle VS. time. ----- 63

Fig. 8 Water absorption-ability of P/Col tube scaffolds. ----- 64

Fig. 9 (a) Stress-strain curves of P/Col-1 tubes. (b) Young's modulus of coated P/Col. SEM image of P/Col tube after tensile test. (c) PCL, (d) P/Col-3. ----- 65

Fig. 10 (a) MTT assay result of MG-63 Cells cultured on a scaffold. SEM micrographs of MG-63 cells cultured on (b) Pure PCL, (c) P/Col-3 after 7 days of cell culture. ----- 66

제 4 장

Fig. 1 Schematic of fabrication process for hybrid scaffold. -- 85

Fig. 2 Fabricated scaffolds with various pore size and weight fraction of collagen. ----- 86

Fig. 3 (a) weight fraction of collagen and β -TCP in hybrid scaffolds. (b) Porosity of hybrid scaffold. ----- 87

Fig. 4 SEM images of hybrid scaffold with a pore size, $300\mu\text{m}$. (a, c, e) surface image, (b, d, f) cross-sectional images. --- 88

Fig. 5 SEM images of hybrid scaffold with a pore size, $500\mu\text{m}$. (a, c, e) surface image, (b, d, f) cross-sectional images. --- 89

Fig. 6 SEM images of hybrid scaffold with a pore size, $1000\mu\text{m}$. (a, c, e) surface image, (b, d, f) cross-sectional images.

-----	90
Fig. 7 FTIR spectra of collagen sponge of the hybrid scaffold before and after cross-linking with EDC solution. -----	91
Fig. 8 Stress - Strain curves of hybrid scaffold. (a) 300 μm , (b) 500 μm , (c) 1000 μm , (d) 0.5 wt% collagen/ β -TCP. -----	92
Fig. 9 Comparison of hybrid scaffolds between Young's modulus and porosity. -----	93
Fig. 10 Water absorption of hybrid scaffolds. -----	94
Fig. 11 (a) Initial cell attachment results of MG63 cell. (b) Cell proliferation as indicated by the MTT assay of MG63 cells seeded on various hybrid scaffolds(different pore size). -----	95
Fig. 12 SEM micrographs of MG63 cells cultured on the hybrid scaffolds(different pore size). (a, d) 300 μm , (b, e) 500 μm , (c, f) 1000 μm . -----	96
Fig. 13 (a) Initial cell attachment results of MG63 cells. (b) Cell proliferation as indicated by the MTT assay of MG63 cells seeded on various hybrid scaffolds(different weight fractions of collagen). -----	97
Fig. 14 SEM micrographs of MG63 cells cultured on the hybrid scaffolds(different weight fractions of collagen). (a, d) 0.05 wt%, (b, e) 0.1 wt%, (c, f) 0.5 wt%. -----	98
Fig. 15 (a) Calcium mineralization for the scaffolds from 7 to	

14days.(different pore size). (b) Optical image of ARS-staining indicating mineralization for the hybrid scaffolds. Optical micrographs of ARS-staining indicating mineralization for the pure PCL and hybrid scaffold after 14 days. ----- 99

Fig. 16 (a) Calcium mineralization for the scaffolds from 7 to 14days.(different weight fraction of collagen). (b) Optical image of ARS-staining indicating mineralization for the hybrid scaffolds. (c-d) Optical micrographs of ARS-staining indicating mineralization for the pure PCL and hybrid scaffold after 14 days. ----- 100

Abstract

The study for fabricating hybrid scaffolds to mimic human tissue.

Hong soongee

Advisor : Prof. Kim GeunHyung, Ph.D.

Department of Mechanical Engineering

Graduate School of Chosun University

Tissue engineering is a new and exciting technique, which has the potential to create tissues and organs. This technology involves the in vitro seeding and attachment of human cells onto a scaffold. In this technique, the scaffold, which is a substitute to grow the injected cells or the environmental cells in human body, has been one of prominent factors in tissue engineering. To acquire successful tissue regeneration, the scaffold should have several requirements, such as porous structure, biodegradable, biocompatible properties, and proper mechanical properties: Of these requirements, highly porous and interconnected pore structure are the most important factors, which can accommodate injected cells and exchange nutrients between scaffolds and environment condition. There are so many methods, freeze-drying, salt-leaching, solid freeform fabrications(fuse deposition modeling, 3D printing, 3D plotting, and sterolithography etc.), to fabricate various porous scaffolds. Of these methods, freeze-drying can fabricate highly porous scaffolds, which has high surface-to-volume ratio and similar physical structure like the extracellular matrix (ECM). However,

although freeze-drying method provide an optimal biological structure and easy process-ability, low mechanical property is a main drawback. To overcome this problem, we propose a new and simple hybrid fabrication process supplemented with rapid-prototyped method and simple coating method.

Firstly, rapid-prototyped poly(ϵ -caprolactone) scaffolds were fabricated with multi-layered structure. Secondly, in the scaffolds collagen/ β -TCP solution was injected to coat the surface of PCL struts. Finally, the scaffolds were freeze-dried to obtain internally designed collagen-structure. Fabricated hybrid scaffolds were characterized with various physical properties, including water contact angle, water absorption ability, and mechanical properties, and cellular activities. From these works, we believe that the hybrid scaffolds can be one of potential biomedical materials for bone tissue regeneration.

제1장 서론

제1절 연구의 배경 및 목적

사고나 질병으로 인하여 장기나 조직의 손상된 부위가 클 경우, 일반적인 자연회복으로는 손상된 부위의 수복속도가 느릴 뿐만 아니라 조직이 복원되기에는 한계가 있다. 자가 회복에 한계가 있는 장기나 신체부위를 공학적으로 재생 및 복원시키려는 시도가 잇따르고 있으며, 이를 조직공학이라 한다.^[1-3] 조직공학은 세포, 세포 지지체, 성장인자를 조절함으로써 세포의 성장에 유리한 환경을 조성하고, 손상부의 빠른 회복 및 재건을 목적으로 하고 있다.^[4] 그중 세포 지지체는 조직의 손상부가 크거나 기능을 하지 못할 경우, 손상부를 보호해야 할 경우, 자가 이식제나 동종, 이종 이식제의 수급이 용이하지 못할 경우 그 필요성이 요구되고 있다.^[5] 이러한 세포 지지체는 뼈나 피부 등의 이식부위에 따라 그 부위에 맞는 세포 지지체의 다양한 특성이 요구된다.^[6] 특히 세포 지지체의 재료, 표면특성, 구조, 친수성, 기계적 강도 등은 세포의 증식 및 성장에 유리한 환경을 제공하는 역할을 한다.^[7] 결과적으로 손상부의 회복속도와 세포의 증식상태를 결정짓는 매우 중요한 요인으로서 필수적이라 할 수 있다. 그리고 이러한 세포 지지체의 특성들은 세포 지지체를 제작하는 재료나 제작공정이나 방법에 따라 결정된다. 대표적인 세포 지지체 제작방법들로는 동결건조법, 염침출법, 가스포밍법, 쾌속조형기법, 전기방사공정, 리소그래피법등 다양한 세포담체 제작공정들이 보고되고 있다.^[8-10] 다양한 공정으로 제작된 세포 지지체들은 공통적으로 생체적합한 특성을 가지고 있으며, 각각의 장점과 특성, 그리고 단점을 가지고 있다.^[6] 최근에는 각각의 세포 지지체가 가지는 단점을 보완하기 위해 공정과 공정을 결합하거나 지지체와 지지체를 결합하는 등의 방법들도 보고되고 있다.^[11-13] 본 연구에서는 다양한 세포 지지체의 제작방법 및 특성을 살펴보고 단점을 보완하는 하이브리드 공정을 통하여 기존 공정의 문제점을 개선하고자 한다.

제2장 조직공학과 세포 지지체

제1절 조직공학

조직공학의 기원은 잉카고대문명에서 안면결손을 위하여 금, 은, 조롱박 등의 재료를 사용한 것으로부터 로마시대에는 나무나 청동과 같은 재료를 사용하여 의족등을 제작하는 신체조직을 대체하는 대체물로 시작된다.^[14] 문헌적 기록으로는 1668년에 네덜란드의 의학자인 Job janszoon van meekeren이 뼈 결손을 치료하기 위하여 지지체를 제작하였다.^[15] 1980년 J. Burke와 Yannas는 세포외기질을 구성하는 성분의 하나인 collagen과 glycosaminoglycan으로 구성된 화상 환자를 위한 최초의 인공피부를 제작하면서 조직공학이 알려지게 되었다. 이후 1987년 미국과학재단의 주최로 금속 및 세라믹, 합성고분자 등으로 구성된 생체조직 대체물의 개발 가능성에 대한 워크샵이 개최되었고 미국 캘리포니아 샌디에고에서 최초로 “Tissue engineering”이라는 용어를 사용한 학술모임이 개최 되었으며 1995년 최초의 전문학술지인 “Tissue engineering”이 발간되기 시작하였다.^[16] 조직공학의 원리는 1) 조직공학의 이식될 부위에 해당하는 세포, 2) 세포의 성장을 돕는 성장인자, 3) 세포가 부착하여 성장할 수 있는 세포 지지체 이 세가지 요인을 적절히 배합하여 조직의 손상 및 회복 등의 효과를 이끌어 내는 것이다.^[6] 일반적으로 세포는 생체조직의 가장 작은 단위로서 세포가 모여서 조직이 되고, 조직이 성장해 이식될 부위에 맞는 장기를 이루게 된다. 때문에 조직의 복원이 궁극적인 목표인 조직공학에서는 세포의 성장에 유리한 환경을 조성하는 것이 매우 중요하다.^[17] 세포의 성장을 촉진시켜줄 수 있는 유리한 환경으로는 세포가 자라는 공간, 성장인자, 주변과의 상호 연결성등 다양한 특성들이 있다. 또한 추가적으로 세포 지지체가 사용될 경우 세포의 성장을 촉진시켜줄 수 있는 다양한 특성들을 만족시키기 위해 지지체의 생체적합성이나 구조, 표면 거칠기, 강도와 같은 지지체의 형태나 화학적, 물리적 특성이 요구되어진다.^[18] 지지체의 다양한 특성은 세포의 부착, 증식, 분화등에

영향을 미치며 조직의 복원에 밀접한 관계가 있으므로 반드시 고려되어야 한다.

1. 생체적합성

생체적합성이란 사용되는 생체에 있어 의료용 재료가 독성이 없고 생체조직과 적응하기 쉬운 성질로써 조직공학에서 사용되는 지지체의 경우 제작되는 지지체의 성분이나 재질에 많은 영향을 받게 된다. 지지체와 인체조직과의 반응은 숙주의 면역반응에 관련된 생체안정성과 지지체를 이루는 재료의 성질에 관련된 생체적합성으로 나뉜다. 생체안정성으로는 세포 지지체의 이식 후 발열, 염증, 항원성, 발암성 반응이 일어나지 않아야 하며, 생체적합성으로는 지지체가 기계적, 생화학적으로 주위조직과 용화를 이루어야 한다. 세포 지지체에 사용되는 생체적합성 고분자는 합성고분자와 천연고분자로 나누어진다. 합성고분자로는 PLA (poly(lactic acid)), PGA (poly(glycolic acid)), PCL (polycaprolactone), PLGA (poly(lactic-co-glycolic acid)), PU (polyurethane) 등이 있으며, 천연고분자로는 콜라겐(collagen), 알부민 (albumin), 아미노산(poly(amino acid)), 셀룰로오스(cellulose), 아가로스(agarose), 알지네이트(alginate), 헤파린(heparin), 히아루론산(hyaluronic acid), 키토산(chitosan) 등이 사용되고 있다.^[8-9, 19]

2. 성장인자

성장인자란 세포의 성장, 신호전달계에 미치는 폴리펩티드의 총칭으로서 세포의 분열, 성장, 분화에 직접적으로 관여하는 폴리펩티드의 일종이다.^[21] 성장인자의 종류는 표피 성장인자, 섬유아세포 성장인자, 신경 성장인자, 형질전환 성장인자, 혈소판유래 성장인자, 뼈 유래 성장인자, 뼈 형태형성 인자, 콜로니 자극인자 등으로 매우 많은 종류가 있으며, 합성고분자나 천연고분자등에 성장인자를 첨가하여 조직공학에 사용한 연구들이 보고되고 있다.^[22] 골 재생을 유도하는 성장인자중 하나인 뼈 형태형성인자는

줄기세포가 골세포로의 분화를 유도하며, 때문에 골 조직 재생능력을 향상시키는 것으로 알려져 있다.^[23]

3. 친수성

친수성이란 재료의 성질로 물과 강하게 상호작용하여 물과의 강한 친화력을 가지고 물을 흡수 또는 용해하는 성질로서, 물에 젖기 쉬운 성질을 말한다. 일반적으로 친수성 특성은 지지체를 구성하는 재료의 성질, 또는 지지체의 구조에 따라서 변화하게 된다. 조직공학에서의 친수성은 세포의 초기부착과 증식에 직접적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 때문에 지지체의 재료 및 구조는 필수적으로 고려되어야 한다.^[24] C. R. Cho에 의하면 플라즈마를 이용한 표면개질화된 고분자 필름은 표면 거칠기와 친수성 특성이 증가하며, 이러한 친수성은 세포의 초기 부착률을 증가시킨 것으로 나타났다.^[25] 또한 G. Chen의 연구에 따르면 재료의 친수성 특성과 소수성 특성은 세포의 초기 부착률에 영향을 주는 것으로 확인되었다.^[26]

4. 기계적강도

기계적 강도란 지지체의 압축강도, 인장강도, 탄성한도, 항복점등 물리적 성질로서 인장, 압축, 전단, 굽힘등의 힘을 가한 경우 나타나는 여러 가지 성질이다. 조직공학에서의 세포 지지체의 다양한 역할 중 하나는 이식부가 회복되기까지 외부로부터의 다른 충돌이나 충격으로부터 파손을 최소화 하는 것으로서 이식부가 회복하기까지 적절한 기계적 강도를 유지하고 보호해야 한다.^[27] 그리고 이식될 부위에 따라 지지체에 요구되는 물리적 특성이 다르기 때문에 특성에 맞는 기계적 강도는 지지체 제작에 있어서 매우 중요하다. 예를 들면 강한 인장, 압축하중을 받는 인대를 대체하는 지지체의 경우는 높은 인장 및 압축하중, 탄성한도를 요구한다.^[28] 또한 혈관대체물로 사용되는 도관

형 지지체의 경우 내부유체의 압력을 고려한 기계적 강도가 요구되기도 한다.^[29] 이러한 지지체의 다양한 기계적 특성은 재료의 특성, 지지체의 구조와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다.^[29,32] 대표적으로 R. L. Mauck의 연구에 의하면 전기방사된 나노 파이버 지지체의 경우 나노파이버의 배열성이 높을수록 배열된 방향의 기계적 강도가 증가함을 확인하였다.^[33]

5. 공극률 및 공극 크기

공극률이란 공극을 갖는 다공성 물질의 특성을 나타내는 실제적/전체적의 비로 계산할 수 있다.^[32] 조직공학용 지지체는 다공성 구조를 필수적으로 고려해야 하는데 여기에는 몇 가지 이유가 있다. 1) 균일한 재생을 위해서는 세포가 세포 지지체의 공극을 통해 내부로 침투할 수 있어야 하며, 2) 세포의 증식 및 분열, 분화를 촉진하기 위해서는 공극을 통해 세포끼리의 ECM과 같은 물질교환이 활발히 이루어져야 하고, 3) 조직이 재생됨에 따라 세포 지지체가 서서히 생분해되어야 하기 때문이다.^[27] K. A. Athanasiou에 따르면 분해속도는 지지체의 공극률에 따라 조절이 가능하며 공극률이 증가할수록 분해속도도 증가함을 확인하였다.^[33] 한편 지지체의 공극 크기는 지지체의 내부로 통하는 공극(pore)의 크기로서 공극률과 밀접한 관계가 있을 뿐만 아니라 지지체 내부로의 세포 침투율과도 관계가 있어 매우 중요하다. 또한 이식되는 세포의 성장에 있어 요구되는 공극의 크기가 각각 다르기 때문에 지지체의 공극 크기 또한 세포 지지체 제작에 있어서 매우 중요하다.^[34]

제2절 세포 지지체 제작

세포 지지체란 인공조직으로서 인체의 일부 장기나 조직이 크게 손상된 경우, 조직의 기능을 회복하거나 복원 및 개선하는 대체물의 총칭이다. 세포 지지체는 기본적으로 조직과 잘 융화하는 생체적합성을 나타내어야 하며, 이식되는 부위에 맞는 기계적 특성이나 형상 및 구조적 특성을 가지고 있어야 한다.^[37] 예를 들면 인대나 뼈를 대체하는 지지체는 충격에 강한 기계적 강도를 가지고 있어야 하며, 피부조직을 대체하는 지지체는 유연성을 띄고 있어야 한다. 또한 골 소실에 사용되는 지지체는 필요로 하는 형상이 매우 다양하기 때문에 형상구현성이 좋아야 한다.^[37-38] 이러한 조직을 대체하는 대체물로서 세포지지체에 요구되는 특성들은 세포 지지체를 이루는 재료의 특성에 영향을 받기도 하나, 제작공정상의 특성이나 구조에 크게 영향을 받는다.^[39] 보편적인 세포 지지체 제작방법으로 알려져 있는 solvent casting이나 particulate leaching은 공정이 매우 간단하고 구조가 세포외기질과 유사한 장점을 가지고 있다. 하지만 solvent casting이나 particulate leaching공정은 높은 공극률과 스폰지 구조로 인하여 낮은 기계적 강도를 가지고 있어 높은 강도를 필요로 하는 지지체에는 사용할 수 없는 한계로 지적되고 있다.^[40] 때문에 이식부위의 다양한 특성에 맞는 세포 지지체의 제작은 매우 중요하며, 수많은 지지체 제작공정방법들 중에서 필요로 하는 세포 지지체를 제작하기 위한 제작공정의 선정은 매우 중요하다고 할 수 있다.

1. 동결건조법 (Freeze dry)

동결건조법은 용해된 생체적합성 고분자를 동결하고 상변화를 통해 수분을 제거하여 3차원 형상의 세포 지지체를 제작하는 기법이다. 동결건조법은 다양한 형상의 구현이 가능하고 재료선택의 폭이 넓으며 공정이 매우 간단하다는 이점이 있다. 또한 제작되는 세포 지지체의 구조가 세포외기질의 구조와 유사한 구조를 가지고 있어 세포의 성

장에 매우 유리한 이점을 가지고 있다.^[41] 최근에는 fibroin이나 collagen/GAG, chitosan/gelatin를 이용한 세포 지지체 제작에 관련된 연구가 보고되고 있으며, 동결건조법을 통하여 제작된 세포 지지체는 공극의 크기나 3차원적인 형상의 조절이 가능함을 확인하였다.^[42-43]

2. 쾌속조형법 (Rapid Prototyping)

쾌속조형법은 생체적합성 고분자를 용융시켜 공압으로 노즐을 통해 밀어내면서 3차원 형상의 세포 지지체를 제작하는 기술로서 SFF(solid freeform fabrication)로 불리기도 한다. 3축으로 이동이 가능한 노즐을 통해 용융된 고분자가 배출되고 표면에 닿으면서 응고되어 세포 지지체를 제작하게 된다. 이 공정의 가장 큰 장점은 CAD/CAM을 통해 사용자가 원하는 세포 지지체의 크기 및 공극, 형상을 조절할 수 있는 점이다.^[44] 또한 높은 강도를 가지고 있으며, PCL, PLGA, 콜라겐, 알지네이트등의 다양한 생체적합성 고분자를 사용할 수 있어 재료선택의 폭이 매우 넓다.^[45-47]

3. 전기방사법 (Electrospinning)

전기방사공정은 고분자용액에 고전압을 가하여 짧은 시간에 다량의 나노섬유를 제작할 수 있는 기법으로서 제약, 의료, 군수, 농업등 다양한 분야에서 응용되고 있다.^[49] 특히 조직공학 분야에서는 제작되는 섬유구조가 세포외기질과 같은 생체조직과 유사한 구조를 가지고 있으며 공정의 간단함, 폭넓은 재료선택의 이점 등으로 인하여 주목받고 있다.^[48-49] 그러나 전기방사로 제작된 나노섬유는 얇은 매트구조를 가지고 있고, 너무 작은 미세구조로 인하여 세포가 세포담체 안쪽으로 침투하지 못하는 문제가 있어 조직공학에 실제적으로 사용되기에는 어려움이 있다.^[50] 최근에는 이러한 문제점을 해결하는 대안들로 스폰지형, 도관형등의 전기방사공정이 제시되고 있다.^[51-52]

4. 가스포밍법 (Gas forming)

가스 포밍법은 고분자 용액에 질소나 이산화탄소등의 가스를 용해시켜 압력을 순간적으로 낮춰 상변화를 이용해 성형시키는 기법이다. 가스 포밍법으로 제작되는 지지체는 매우 높은 공극률을 가지게 되고, 세포외기질의 구조와 비슷한 구조를 이루게 된다. 또한 사용자가 원하는 3차원 형태의 형상을 쉽게 제작할 수 있으며,^[53-54] 다양한 종류의 재료를 사용할 수 있어 PLGA, PLLA등의 고분자를 사용한 연구들이 보고되고 있다.^[55] 하지만 스폰지 구조의 낮은 기계적 강도로 인하여 사용이 제한적인 단점이 있다.

5. 파티클리칭법 (Particulate leaching)

파티클 리칭법은 고분자 용액에 결정을 넣고 응고 시킨 후 용매에 결정을 제거 하는 방법으로 염침출법 또한 이에 속한다. 파티클 리칭법은 파티클의 크기와 형태에 따라 공극의 크기와 형태를 조절할 수 있으며 결정의 양에 따라 공극률을 조절 할 수 있다.^[56-57] 또한 세포 지지체의 형태를 자유롭게 조절할 수 있는 이점이 있다.^[58] 하지만 세포 지지체의 크기가 클 경우 내부 결정이 침출되지 못하고 잔류되어 공극이 형성되지 못하고 세포의 증식에 악영향을 미치는 단점이 있다.

6. 레이저소결법 (Selective Laser Sintering)

레이저소결법(SLS)은 분말 형태의 고분자 재료 표면에 레이저를 주사하여 고분자 분말의 선택적 소결(Sintering)과정을 거치면서 한 층씩 지지체를 제작하는 기술이다. 한 층이 제작되면 롤러를 이용하여 제작된 지지체 위에 다시 고분자 분말을 도포하고

레이저로 주사하는 방법을 반복하면서 지지체를 제작하게 된다. SLS는 CAD/CAM을 사용해 사용자가 원하는 형태의 지지체를 설계하고 제작할 수 있기 때문에 공극률, 공극크기 지지체의 형태등을 쉽게 조절 할 수 있으며 타 공정에 비하여 미세한 구조를 갖는 지지체의 제작이 가능한 장점이 있다.^[57] 지지체 제작에 사용되는 고분자 재료는 공정의 특이성으로 인하여 PLA, PGA, PCL, PLGA, PU등의 열가소성 고분자가 사용된다.

7. 하이브리드 공정

다양한 제작공정들로 제작된 세포 지지체들은 각각의 이점과 단점을 가지고 있다. 최근에는 각각의 세포 지지체가 가진 문제점들을 보완하기 위해 공정과 공정을 결합하거나 지지체와 지지체를 결합한 다양한 하이브리드 공정들이 보고되고 있다. G. H. Kim 연구팀의 합성고분자의 생리적 한계와 낮은 가공성을 갖는 콜라겐의 단점을 극복하기 위한 SFF기법에 동결건조법을 결합한 innovative cryogenic dispenser system,^[11] T. G. Kim 연구팀의 기존 전기방사의 3차원 형상구현성 문제점을 해결하기 하기위해 제시된 전기방사공정과 salt leaching,^[12] G. Chen연구팀의 freeze dry법으로 제작된 콜라겐 스폰지의 낮은 기계적 강도를 보완하기 위한 방법으로 제시된 PLGA mesh와 콜라겐 스폰지를 결합한 hybrid mesh등이 보고되고 있다.^[13]

제3절 참고 문헌

1. L. G. Griffith, G. Naughton, Tissue Engineering—Current Challenges and Expanding Opportunities. *Science*, 295, 8, 2002
2. S. J. Hollister, Porous scaffold design for tissue engineering. *nature materials*, 4, 2005
3. J. M. Sobral, S. G. Caridade, R. A. Sousa, J. F. Mano, R. L. Reis, Three-dimensional plotted scaffolds with controlled pore size gradients: Effect of scaffold geometry on mechanical performance and cell seeding efficiency. *Acta Biomaterialia*, 7, 1009 - 1018, 2011
4. M. P. Lutolf, J. A. Hubbell, Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nature biotechnology*, 23, 1, 2005
5. M. Shin, H. Yoshimoto, J. P. Vacanti, In Vivo Bone Tissue Engineering Using Mesenchymal StemCells on a Novel Electrospun Nanofibrous Scaffold. *Tissue engineering*, 10, 1/2, 2004
6. S. Yang, K. Leong, Z. Du, C. Chua, The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors. *Tissue engineering*, 7, 6, 2001
7. W. Li, C. T. Laurencin, E. J. Caterson, R. S. Tuan, F. K. Ko, Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 60, 4, 613 - 621, 2002
8. 김완두, 박수아, 이준희 맞춤형 스캐폴드 제작을 위한 3차원 바이오조형기술. 2011
9. S. H. Kim, A. Y. Oh, J. H. Choi, S. H. Jung, H. H. Hong, N. R. Jeon, H. S. Shin, J. M. Rhee, G. Khang, Recent Advances in Manufacturing Method of Smart Scaffold for Regenerative Medicine *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 5, 3, 351-369, 2008

10. D. W. Hutmacher, Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21, 2529–2543, 2000
11. S. H. Ahn, H. Yoon, G. H. Kim, Y. Y. Kim, S. H. Lee, W. Chun, Designed Three-Dimensional Collagen Scaffolds for Skin Tissue Regeneration. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 16, 813–820, 2010
12. T. G. Kim, H. J. Chung, T. G. Park, Macroporous and nanofibrous hyaluronic acid/collagen hybrid scaffold fabricated by concurrent electrospinning and deposition/leaching of salt particles. *Acta Biomaterialia*, 4, 1611 - 1619, 2008
13. G. Chen, T. Ushida, T. Tateishi, A hybrid network of synthetic polymer mesh and collagen sponge Guoping. *Chemical Communications*, 1505 - 1506, 2000
14. A. Sanan, S. J. Haines, Repairing holes in the head: A history of cranioplasty. *Neurosurgery*, 40, 588, 1997
15. A. J. van Meekeren, *Observations medico-chirurgice*. Amsterdam, 1682
16. R. M. Nerem A. S. Sambanis, *Tissue Engineering*, 1, 3, 1995
17. B. A. C. Harley, H. Kim, M. H. Zaman, I. V. Yannas, D. A. Lauffenburger, L. J. Gibson, Microarchitecture of Three-Dimensional Scaffolds Influences Cell Migration Behavior via Junction Interactions. *Biophysical Journal*, 95, 4013 - 4024, 2008
18. S. Yang, K. Leong, Z. Du, C. Chua, The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part II. Rapid Prototyping Techniques. *Tissue engineering*, 8, 1, 2002
19. S. H. Kim, A. Y. Oh, J. H. Choi, S. H. Jung, H. H. Hong, N. R. Jeon, H. Shin, J. M. Rhee, G. Khang, Recent Advances in Manufacturing Method of Smart Scaffold for Regenerative. *Medicine Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 5, 3, 351–369, 2008

20. J. E. Babensee, L. V. McIntire, A. G. Mikos, Growth Factor Delivery for Tissue Engineering. *Pharmaceutical Research*, 17, 5, 2000
21. S. H. Lee, H. Shin, Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 339 - 359, 2007
22. A. H. Reddi, Morphogenesis and Tissue Engineering of Bone and Cartilage: Inductive Signals, Stem Cells, and Biomimetic Biomaterials. *Tissue engineering*, 6, 4, 2000
23. M. F. Leong, K. S. Chian, P. S. Mhaisalkar, W. F. Ong, B. D. Ratner, Effect of electrospun poly(D,L-lactide) fibrous scaffold with nanoporous surface on attachment of porcine esophageal epithelial cells and protein adsorption. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 89A, 4, 1040 - 1048, 2009
24. H. U. Lee, Y. S. Jeong, S. Y. Jeong, S. Y. Park, J. S. Bae, H. G. Kim, C. R. Cho, Role of reactive gas in atmospheric plasma for cell attachment and proliferation on biocompatible poly ϵ -caprolactone film. *Applied Surface Science*, 254, 5700 - 5705, 2008
25. Y. W. Wang, Q. Wu, G. Q. Chen, Reduced mouse fibroblast cell growth by increased hydrophilicity of microbial polyhydroxyalkanoates via hyaluronan coating. *Biomaterials*, 24, 4621 - 4629, 2003
26. Z. Fang, B. Starly, W. Sun, Computer-aided characterization for effective mechanical properties of porous tissue scaffolds. *Computer-Aided Design*, 37, 65 - 72, 2005
27. S. Sahoo, H. Ouyyang, Characterization of a Novel Polymeric Scaffold for Potential Application in Tendon/Ligament Tissue Engineering. *Tissue engineering*, 12, 1, 2006
28. S. J. Lee, J. L. b, S. H. Oh, S. Soker, A. Atala, J. J. Yoo, Development of a

- composite vascular scaffolding system that withstands physiological vascular conditions. *Biomaterials*, 29, 2891 - 2898, (2008)
29. E. Sachlos, J. T. Czernuszka, Making tissue engineering scaffolds work. review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *European cells and materials*, 5, 29-40, 2003
 30. B. M. Baker, R. L. Mauck, The effect of nanofiber alignment on the maturation of engineered meniscus constructs. *Biomaterials*, 28, 1967 - 1977, 2007
 31. V. Thomas, D. R. Dean, M. V. Jose, B. Mathew, S. Chowdhury, Y. K. Vohra, Nanostructured Biocomposite Scaffolds Based on Collagen Coelectrospun with Nanohydroxyapatite. *Biomacromolecules*, 8, 631-637, 2007
 32. K. A. Athanasiou, J. P. Schmitz, C. M. Agrawal, The Effects of Porosity on in Vitro Degradation of Polylactic Acid-Polyglycolic Acid Implants Used in Repair of Articular Cartilage. *Tissue engineering*, 4, 1, 1998.
 33. H. I. Chang, Y. Wang, Cell Responses to Surface and Architecture of Tissue Engineering Scaffolds. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials*. Intech, 2011
 34. L. Jeng, F. Livingston, Bone Tissue Scaffold in PCL. 2005.
 35. J. Yuana, L. Cuia, W. J. Zhanga, W. Liua, Y. Cao, Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous β -tricalcium phosphate. *Biomaterials*, 28, 1005 - 1013, 2007.
 36. P. J. Schaner, N. D. Martin, T. N. Tulenko, I. M. Shapiro, N. A. Tarola, R. F. Leichter, R. A. Carabasi, P. J. DiMuzio, Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. *journal of vascular surgery*, 40, 1, 2004.
 37. A. S. P. Lina, T. H. Barrowsb, S. H. Cartmella, R. E. Guldberg, Microarchitectural and mechanical characterization of oriented porous polymer scaffolds. *Biomaterials*, 24, 481 - 489, 2003.

38. F. J. O'Brien, B. A. Harley, I. V. Yannas, L. Gibson, Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*, 25, 1077 - 1086, 2004.
39. Q. Lv, Q. Feng, Preparation of 3-D regenerated fibroin scaffolds with freeze drying method and freeze drying/foaming technique. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17, 12, 1349-1356, 2006.
40. M. Peter, N. S. Binulal, S. V. Nair, N. Selvamurugan, H. Tamura, R. Jayakumar, Novel biodegradable chitosan - gelatin/nano-bioactive glass ceramic composite scaffolds for alveolar bone tissue engineering. *Chemical Engineering Journal*, 158, 353 - 361, 2010.
41. K. H. Schuckert, S. Jopp, S. H. Teoh, Mandibular Defect Reconstruction Using Three-Dimensional Polycaprolactone Scaffold in Combination with Platelet-Rich Plasma and Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2: De Novo Synthesis of Bone in a Single Case. *Tissue engineering: Part A*, 15, 3, 2009.
42. I. Zein, D. W. Hutmacher, K. C. Tan, S. H. Teoh, Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 23, 1169 - 1185, 2002.
43. L. Ye, X. Zeng, H. Li, Y. Ai, Fabrication and biocompatibility of nano non-stoichiometric apatite and poly(ϵ -caprolactone) composite scaffold by using prototyping controlled process. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21:753 - 760, 2010.
44. D. L. Cohen, E. Malone, H. Lipson, L. J. Bonassar, Direct Freeform Fabrication of Seeded Hydrogels in Arbitrary Geometries. *Tissue Engineering*, 12, 5, 1325-1336, 2006.
45. D. H. Reneker, I. Chun, Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology*, 7, 216 - 223, 1996.

46. H. Yoshimotoa, Y. M. Shin, H. Terai, J. P. Vacanti, A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 24, 2077 - 2082, 2003.
47. M. P. Prabhakaran, J. Venugopal, S. Ramakrishna, Electrospun nanostructured scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 5, 2884 - 2893, 2009.
48. K. N. Chua W. S. Lim, P. Zhang, H. Lu, Jie Wen, S. Ramakrishna, K. W. Leong, H. Q. Mao, Stable immobilization of rat hepatocyte spheroids on galactosylated nanofiber scaffold. *Biomaterials*, 26, 2537 - 2547, 2005.
49. D. Zhang, J. Chang, Electrospinning of Three-Dimensional Nanofibrous Tubes with Controllable Architectures. *Nano letters*, 8, 10, 3283-3287, 2008.
50. S. Hong, G. H. Kim, Fabrication of size-controlled three-dimensional structures consisting of electrohydrodynamically produced polycaprolactone micro/nano fibers. *Appl Phys A*, 103, 1009-1014, 2011.
51. T. Hadlock, C. Sundback, D. Hunter, M. Cheney, J. P. Vacanti, A Polymer Foam Conduit Seeded with Schwann Cells Promotes Guided Peripheral Nerve Regeneration. *Tissue engineering*, 6, 2, 2000.
52. J. Hu, X. Sun, H. Ma, C. Xie, Y. E. Chen, P. X. Ma, Porous nanofibrous PLLA scaffolds for vascular tissue engineering. *Biomaterials*, 31, 7971-7977, 2010.
53. Y. Sakai, M. Otsuka, J. Kozasa, F. Miyata, K. S. Furukawa, A. Yamashita, Ultraviolet-irradiation-based photofabrication that simultaneously produces a macroporous structure and flow channels using a photoreactive biodegradable polymer and a gas-forming azoamide compound. *Biochemical Engineering Journal*, 20, 163 - 171, 2004.
54. A. S. Goldstein, G. Zhu, G. E. Morris, R. K. Meszlenyi, A. G. Mikos, Effect of Osteoblastic Culture Conditions on the Structure of Poly(DL-Lactic-co-Glycolic Acid) Foam Scaffolds. *Tissue engineering*, 5, 5, 1999.

55. D. C. Sin, X. Miao, G. Liu, F. Wei, G. Chadwick, C. Yan, T. Friis, Polyurethane (PU) scaffolds prepared by solvent casting/particulate leaching (SCPL) combined with centrifugation. *Materials Science and Engineering C*, 30, 78–85, 2010.
56. Y. C. Chiu, J. C. Larson, A. Isom, E. M. Brey, Generation of Porous Poly(Ethylene Glycol) Hydrogels by Salt Leaching. *Tissue engineering : Part C*, 16, 5, 2010.
57. J. M. Williams, A. Adewunmi, R. M. Schek, C. L. Flanagan, P. H. Krebsbach, S. E. Feinberg, S. J. Hollister, S. Das, Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. *Biomaterials*, 26, 4817 - 4827, 2005.
58. 김강희, 이준우, 고병열, polymeric biomaterials. *기술산업정보분석* 2003.
59. S. A. Park, J. H Lee, W. Kim, Development of Biomimetic Scaffold for Tissue Engineering *Elastomers and Composites*. 44, 2, 106–111, 2009.
60. V. Karageorgiou, D. Kaplan, Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26, 5474 - 5491, 2005.
61. S. MacNeil, Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature*, 445, 874–880, 2007.
62. T. Dvir, B. P. Timko, D. S. Kohane, R. Langer, Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nature Nanotechnology* 6, 13 - 22, 2011.
63. L. Feng, S. Li, H. Li, J. Zhai, Y. Song, L. Jiang, D. Zhu, Super-Hydrophobic Surface of Aligned Polyacrylonitrile Nanofibers. *Angewandte Chemie*, 114, 7, 2002.
64. Z. Shu, *Mechanical and Physical Properties of Electrospun Nanofibers*, 2009
65. Q. Cai, J. Yang, J. Bei, S. Wang, A novel porous cells scaffold made of polylactide - extran blend by combining phase-separation and particle-leaching techniques. *Biomaterials*, 23, 4483 - 4492, 2002.

66. F. P. W. Melchels, J. Feijen, D. W. Grijpma, A poly(D,L-lactide) resin for the preparation of tissue engineering scaffolds by stereolithography. *Biomaterials*, 30, 3801 - 809, 2009.

Table 1. Polymer scaffold processing for tissue engineering.^[6]

	processing	Advantage	Disadvantage
1	fiber felts	<ul style="list-style-type: none"> • easy process • high porosity 	<ul style="list-style-type: none"> • lack structural stability
2	fiber bonding	<ul style="list-style-type: none"> • high porosity 	<ul style="list-style-type: none"> • Limit application to other polymers • Lack required mechanical strength for the load-bearing tissues
3	Phase separation	<ul style="list-style-type: none"> • Nondecreased activity of the molecule 	<ul style="list-style-type: none"> • Difficult to control precisely scaffold morphology • Solvent residue may be harmful
4	Solvent casting and particulate leaching	<ul style="list-style-type: none"> • Controlled porosity, up to 93%, • Independent control of porosity and pore size • Crystallinity can be tailored 	<ul style="list-style-type: none"> • Limit to membranes up to 3-mm thick • Lack required mechanical strength for the load-bearing tissues
5	Membrane lamination	<ul style="list-style-type: none"> • 3D matrix 	<ul style="list-style-type: none"> • Lack required mechanical strength for the load-bearing tissues • Solvent residue may be harmful
6	Melt molding	<ul style="list-style-type: none"> • Independent control of porosity and pore size • Macro shape control 	<ul style="list-style-type: none"> • High temperature required for nonamorphous polymer
7	Polymer/ceramic fiber composite foam	<ul style="list-style-type: none"> • Superior compressive strength • Independent control of porosity and pore size 	<ul style="list-style-type: none"> • Solvent residue may be harmful
8	High-pressure processing	<ul style="list-style-type: none"> • No organic solvents 	<ul style="list-style-type: none"> • Mostly a nonporous surface • Closed-pores structure inside the polymer matrix
9	Hydrocarbon templating	<ul style="list-style-type: none"> • No thickness limitation • Enhanced control over pore structure, porosity, etc. 	<ul style="list-style-type: none"> • Solvent residue may be harmful

Table 2. Evaluation method for biocompatibility.^[58]

Biocompatibility	Testing information
Cytotoxicity	Evaluation of cell viability, growth, cycle, activation
Blood Compatibility (Hemocompatibility)	Platelet counting, Platelet factor 4 assay Antithrombin III assay, Fibrinopeptide A assay Protein C assay, Fibrinogen assay Determination of - Coagulation factors and prothrombin activity - Activated partial thromboplastin time (APTT) - Fibrin degradation products (FbDP) etc.
Tissue Compatibility (Histocompatibility)	Quantitative evaluation of soft tissue or bone. Determination of cytokines production in tissue. etc.
Immunocompatibility	Identification of membrane and intra-cell antigens Evaluation of the cytotoxic activity of Natural Killer cells Cytokine assay in the supernatants of cell cultures <i>In vitro measurement of granulocyte activation etc.</i>
Infectivity	Bacterial genes for adhesion and antibiotic resistance <i>In vitro evaluation of bacterial adhesion and growth etc.</i>
Genotoxicity (Mutagenicity)	<i>In vitro induced chromatide exchange etc.</i>
Structural Analysis	Evaluation of crystallinity degree of biomaterials, etc.

Table 3. Division and applications of natural polymers- I. ^[58]

Natural polymer	Main applications and comments
Proteins-based polymers	Absorbable, biocompatible, nontoxic, naturally available
Collagen	Absorbable sutures, wound dressing, drug delivery microspheres.
Albumin	Cell and drug microencapsulation.
Poly(amino acids)	Poly(L-lysine), poly(L-glutamic acid), poly(aspartic acid) etc. Nontoxic, nonantigenic and biocompatible. oligomeric drug carriers.
Polysaccharides and derivatives	
<i>Vegetable sources</i>	
<i>Carboxymethyl cellulose</i>	Cell immobilization in drug-delivery and dialysis membranes.
Cellulose sulphate	Component of polyelectrolyte complexes for immunoisolation.
Agarose	Supporting materials in clinical analysis and immobilization matrices.
Alginate (marine sources, algae)	Gel-formation properties, relatively biocompatible, immobilization matrices for cells and enzymes, controlled release of bioactive substances.
Carrageenan	Thermoreversible properties. Used for microencapsulation.
<i>Human and animal sources</i>	
Hyaluronic acid	Excellent lubricant, potential therapeutic agent.
Heparin and heparin-like glycosaminoglycans	Antithrombotic and anticoagulant properties, candidates for ionotropic gelation and capsule formation.
<i>Microbial polysaccharides</i>	
Dextran and its derivatives	Excellent rheological properties, plasma expander, drug carrier.
Chitosan and its derivatives	Biocompatible, nontoxic, gel- and film-formation, natural polycations. Used in controlled-delivery systems (e.g. gel, membranes, microspheres).

Table 4. Division and applications of synthetic polymers– II. ^[58]

Synthetic polymers	Main applications and comments
Aliphatic polyesters Poly(lactic acid), poly(glycolic acid) and their copolymers Poly(hydroxy butyrate), poly(ϵ -caprolactone) and copolymers, poly(alkylene succinates), etc.	Used in sutures, drug-delivery systems and in tissue engineering. Biodegradable. Often copolymerized to regulate degradation time. Biodegradable, a matrix for drug-delivery systems. Cell microencapsulation.
Polyamides (nylons) Polyanhydrides Poly(ortho esters) Poly(cyano acrylates) Polyphosphazenes Thermoplastic polyurethanes	Sutures, dressing, haemofiltration membranes. Biodegradable, useful in tissue engineering and the release of the bioactive molecules. Surface-eroding polymers, sustained drug delivery, ophthalmology. Biodegradable, depending on the length of the alkyl chain. Used as surgical adhesives and glues, potentially used in drug delivery. Versatile side-chain functionality in films and hydrogels formation. Applications in drug delivery. Good elastomeric properties. Used in permanently implanted medical devices (prostheses, vascular grafts), catheters and drug delivery systems. Initial candidates for the artificial heart.
Polyethylene (low density) Poly(vinyl alcohol) Poly(ethylene oxide) Poly(hydroxyethyl methacrylate) Poly(methyl methacrylate) Poly(tetrafluoroethylene) (Teflon) Polydimethylsiloxanes	Sutures, catheters, membranes. Gels and blended membranes used in drug delivery and cell immunoisolation. Highly 'biocompatible'. Different polymer derivatives and copolymers have been utilized in a variety of biomedical applications. Hydrogels as soft contact lenses, for drug delivery, as skin coatings This and its copolymers are used as dental implants and in bone replacement. Vascular grafts, clips and sutures, coatings. A silicone. Implants in plastic surgery, orthopaedics, blood bags and pacemakers.
Environmentally responsive, synthetic polymers Poly(ethylene oxide- β -propylene oxide) Poly(vinyl methyl ether) Poly(N-alkylacrylamides)	Surfactants with amphiphilic properties; protein delivery, skin treatments. Nontoxic, temperature-sensitive polymer; shape-memory properties. Temperature-sensitive gels whose lower critical solution.

Table 5. Optimal pore size of scaffold.^[59]

5 μm for neovascularization
5-15 μm for fibroblast ingrowth
20 μm for the ingrowth of hepatocytes
20-125 μm for adult mammalian skin
40-100 μm for osteoid ingrowth
100-350 μm for regeneration of bone
500 μm for fibrovascular tissues for rapid vascularization and survival of cells

Table 6. Porosities and pore sizes of scaffolds for bone regeneration made from natural polymers.^[60]

Natural polymer	Fabrication technique	Pore size (μm)	Porosity (%)	Application
Hyaluronic acid Salt		100 - 600	80 - 90	BMP-2 delivery and $\text{C}_3\text{H}_{10}\text{T}_{1/2}$ cells in vitro
Collagen	Freeze-drying	11 - 50 and 14 - 34		Tibia defects in rats
Collagen/hyaluronate	Cross-linking	45.7 and 35.4		Cranial defects in rats
Collagen/hyaluronic acid (cross-linked with EDC)	Freeze-drying	84 (-196 °C) 186 (-70 °C) 190 (-20 °C)	62 (-196 °C) 62 (-70 °C) 64 (-20 °C)	
Silk fibroin	Freeze-drying	50 (-20 °C) 15 (-80 °C)	99	
	Salt-leaching	202	84 - 98	Human bone marrow stromal cells in vitro
	Gas foaming	155	87 - 97	

Table 7. Porosities and pore sizes of scaffolds for bone regeneration made from chemically synthesized polymers- I. ^[60]

Polymer	Fabrication technique	Pore size (μm)	Porosity (%)	Application
Poly(lactide)	Salt-leaching	600		
Poly(lactide)/poly(glycolide)	Molding	800		
Poly(L-lactide-co-D,L-lactide)	Porogen melting		58 and 80	
Poly(lactide-co-glycolide)	Sintering	72, 164, 101 and 210	>30	
	Consolidation by pressure drop	100	65	Teeth implants
	Sintering	187	31	
	Gas foaming	200		Human mesenchymal cells in vitro
	Electrospinning	2 - 465	92	
Poly(lactide-co-glycolide)/poly(ethylene glycol)	Porogen dissolving	300 - 500	85	Periosteal cells in vivo
Poly(lactide-co-glycolide)/polyvinyl alcohol	Salt-leaching	200 - 300	90	Cranial defects in rabbits
Poly(multifunctional lactic acid basedoligomer)	Salt-leaching	45 - 150 and 300 - 600	80	
Poly(propylene fumarate)	Gas foaming with effervescent reaction (in vivo)	70	51	Tibia defects in rats
	Salt-leaching	300 - 500	70	TGF-b1 delivery in cranial defects in rabbits
	Salt-leaching		80	
	Salt-leaching	300 - 500 and 600 - 800	57 - 75	Cranial defects in rabbits
Polyethylene terephthalate	Melt-blowing		93 - 97	Rat mesenchymal stem cells in vitro
Polymeric foams	Emulsion polymerization	40 and 100		Rat osteoblasts in vitro
Poly(propylene glycol-cofumaric acid)	Gas foaming with effervescent reaction (in vivo)	100 - 500		Cortical defects in rats
Poly(desaminotyrosyl-tyrosine ethyl ester carbonate)	Salt-leaching	500	80 to 87.5 (gradient)	Cranial defects in rabbits

Table 8. Porosities and pore sizes of scaffolds for bone regeneration made from chemically synthesized polymers- II. ^[60]

Composite	Fabrication technique	Pore size (μm)	Porosity (%)	Application
Hydroxyapatite/poly(ϵ -caprolactone)	Sintering	150 - 200	87	
Hydroxyapatite/chitosan gelatin	Freeze-drying	300 - 500		Rat calvarial osteoblasts in vitro
Hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate/chitosan	Sintering	300 - 600	58 and 80	
Collagen/hydroxyapatite	Freeze-drying	30 - 100	85	Rabbit periosteal cells in vitro
	Freeze-drying	50 - 300	49, 73 and 79	MC3T3-E1 osteoblasts in vitro
Titanium/calcium phosphate	Sintering	50 - 100 (surface coating)	35 (surface coating)	Femoral defects in rabbits
	Sintering	250 (porous meshes)	86 (porous meshes)	Ectopic bone formation in rats
	Soaking			Human osteoblasts in vitro Canine bone-ingrowth
Titanium/polyvinyl alcohol	Sintering	170	60	Femoral condyles in dogs
Titanium/boron	Self-propagating high temperature synthesis		15 - 55	Cranial defects in rats
Poly(L-lactide-co-D,L-lactide)/ β -tricalcium phosphate	Salt-leaching	125 - 150	80 - 87.5 (gradient)	Cranial defects in rabbits
Poly(propylene fumarate)/ β -tricalcium phosphate	Salt-leaching	150 - 300	69 and 74	
Poly(L-lactide)/bioglass	Phase separation	50 - 200		
Silica/ceramic	Sintering	10 - 300	51, 47 and 43	Femoral defects in rabbits
Poly(lactide-co-glycolide)/collagen/apatite	Salt-leaching	355 - 425	87	

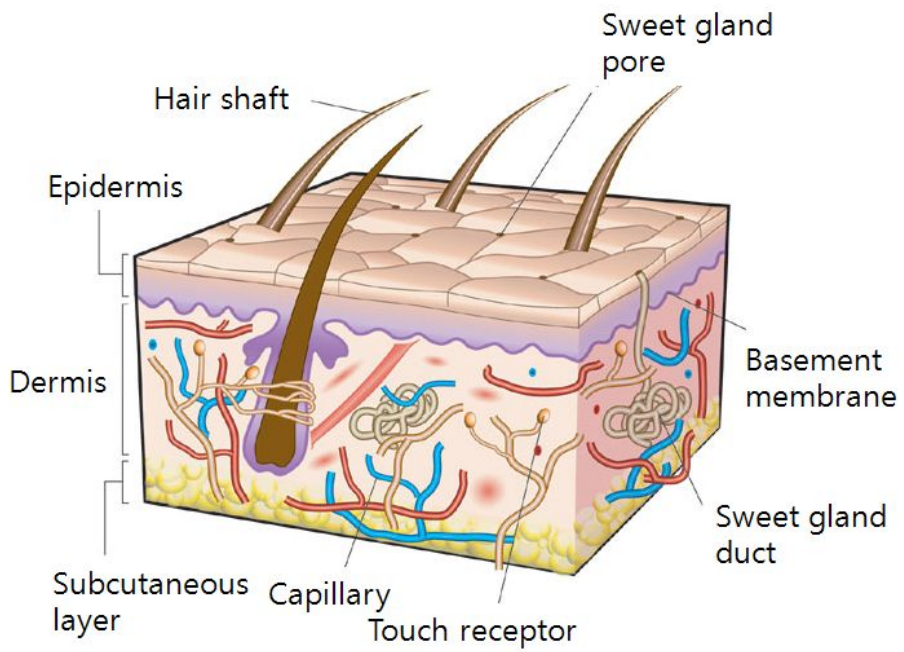


Figure 1. The diagram of human skin.^[61]

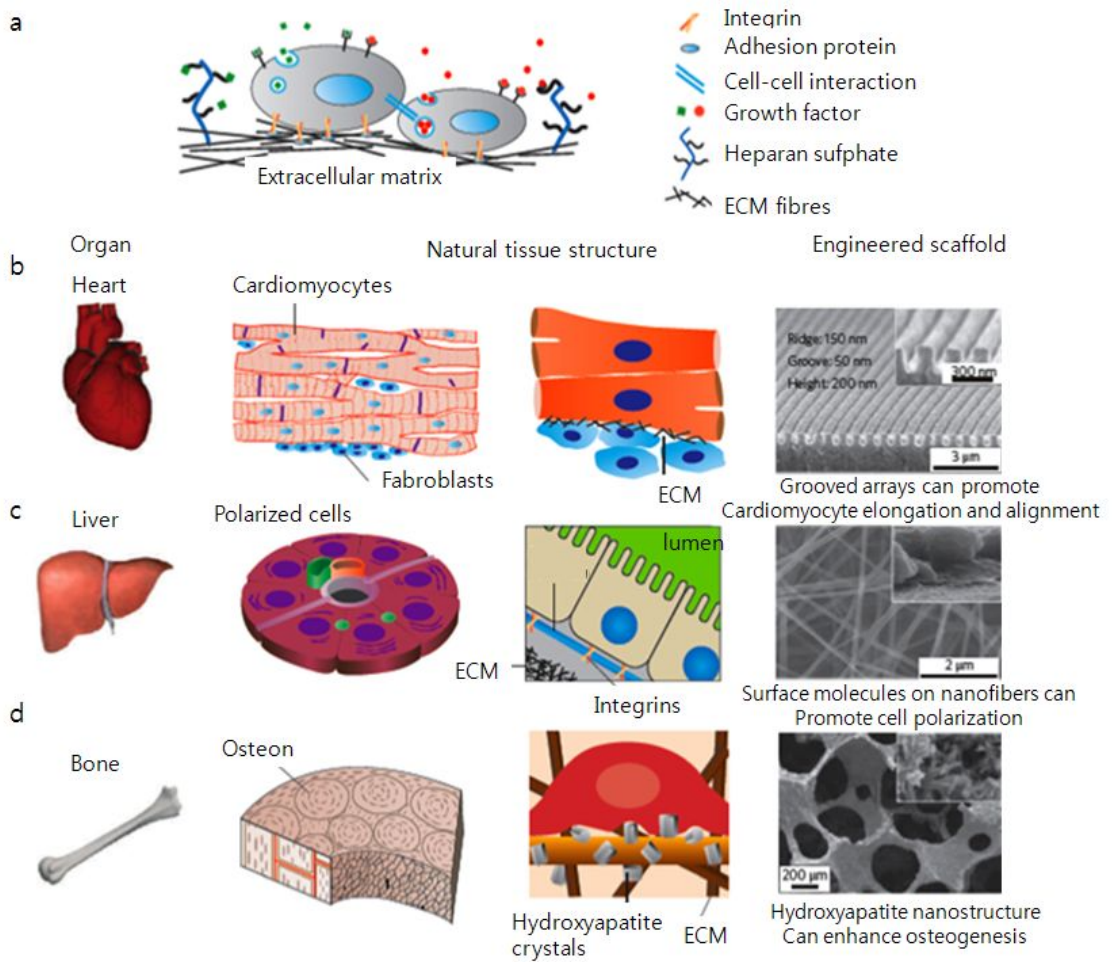


Figure 2. Various applications of tissue engineered scaffolds.^[62]

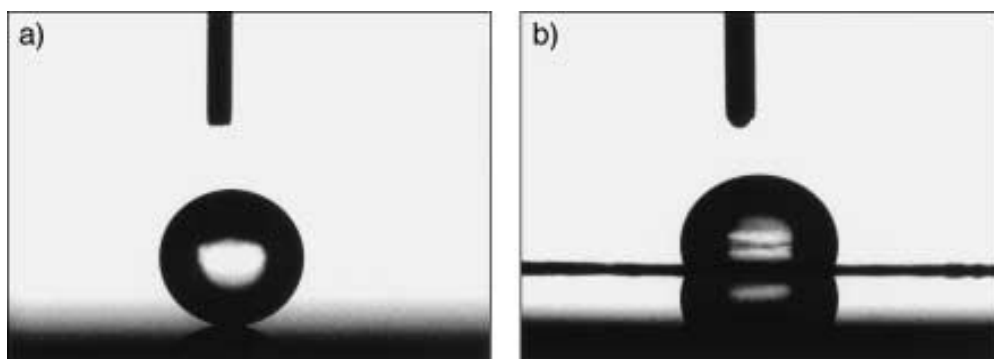


Figure 3. Shapes of water droplets on a) the PAN nanofibers with a rough surface; b) the native PAN film with smooth surface.^[63]

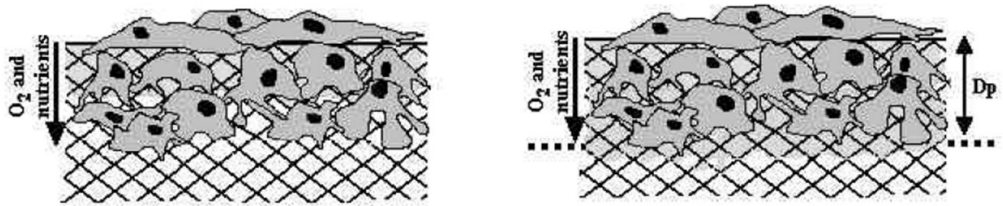


Figure 4. Cellular migration is halted due to the lack of oxygen and nutrients supply. The layer of cells that can survive on the diffusion of oxygen and nutrients from the medium is called the cellular penetration depth (D_p).^[30]

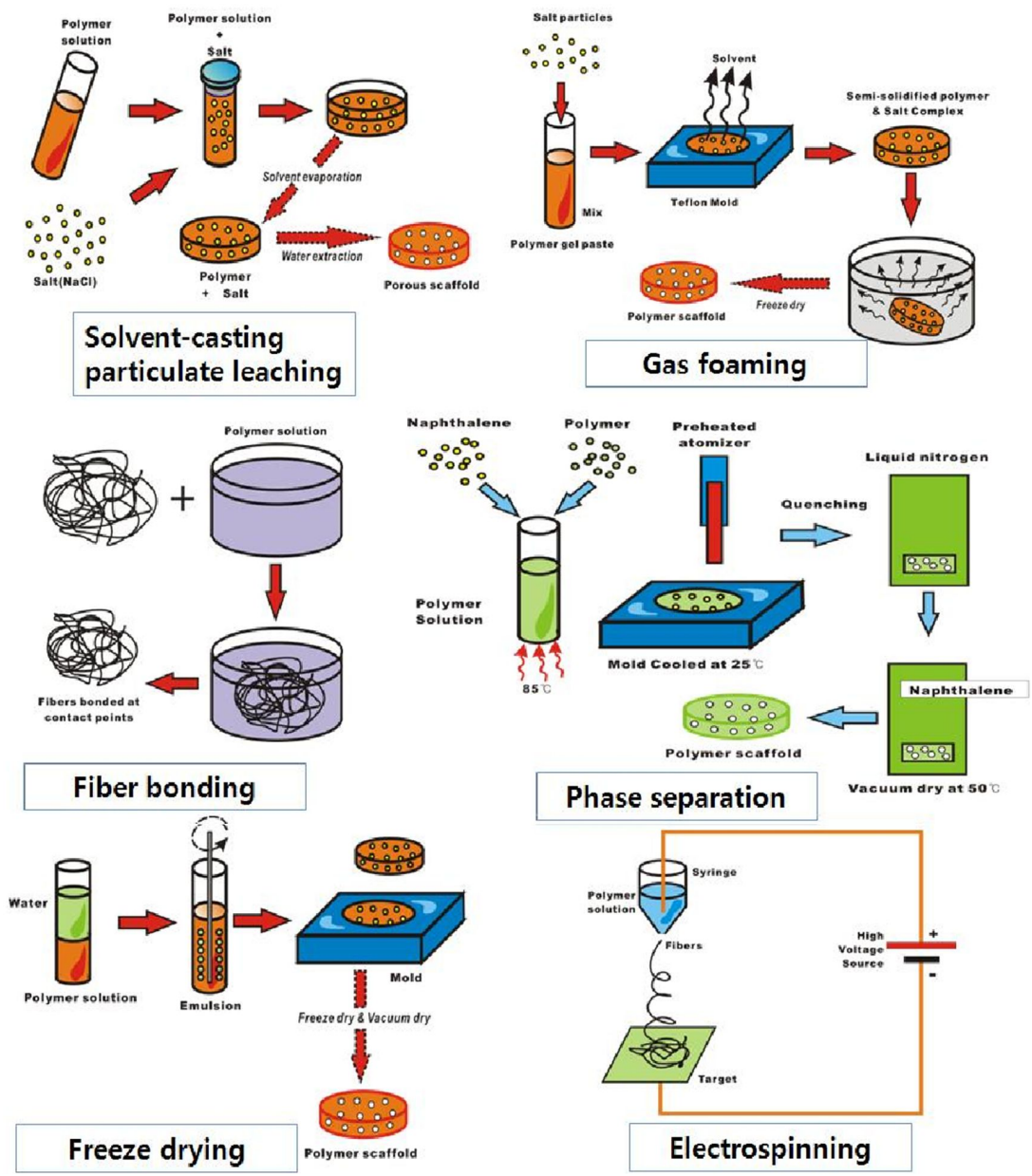


Figure 5. Conventional methods for scaffold fabrication.^[59]

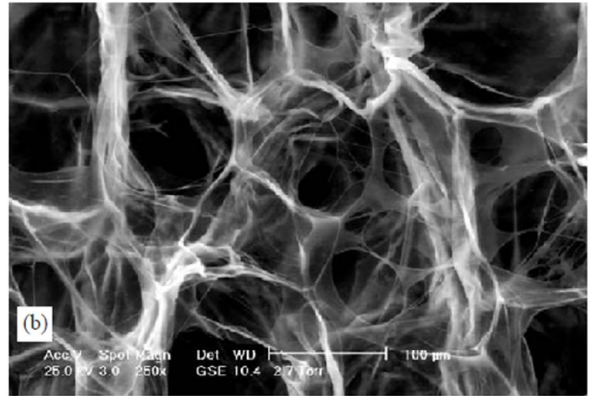
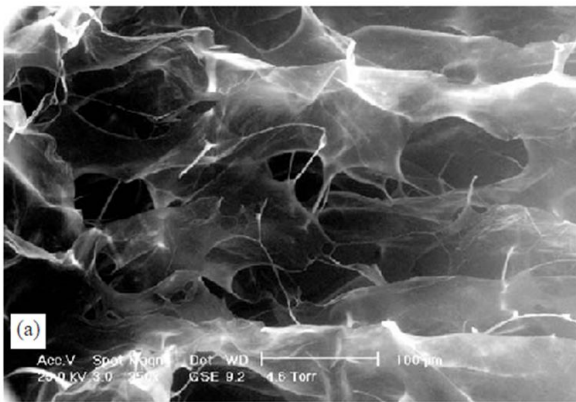


Figure 6. (a) ESEM micrographs of collagen-glycosaminoglycan scaffolds produced using the quenching technique in the large pans, (b) and the constant cooling rate technique (0.9 °C /min) in the small pans.^[39]

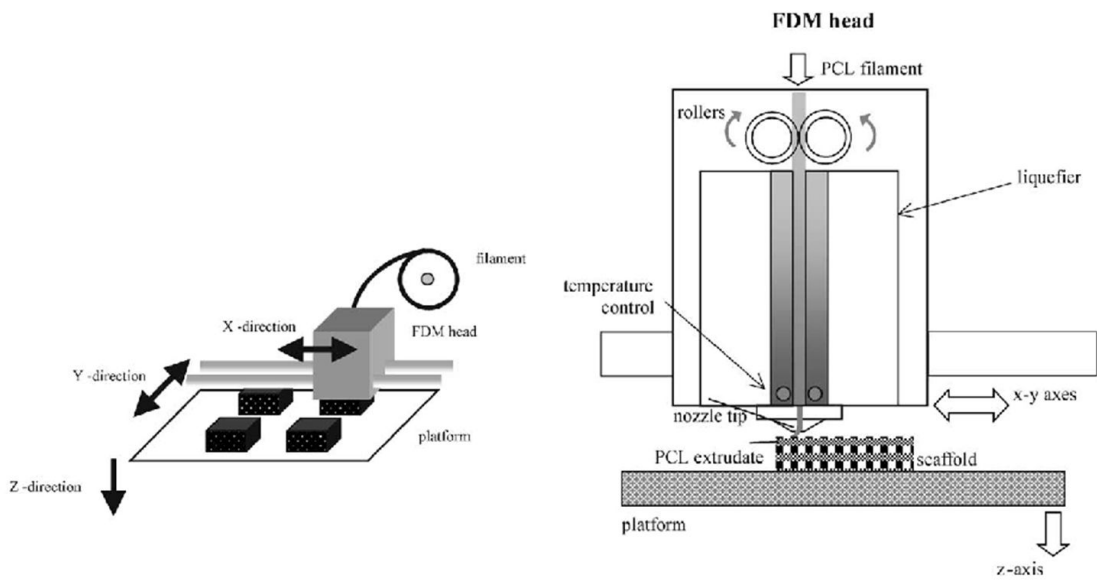


Figure 7. A schematic of the FDM extrusion and deposition process.^[43]

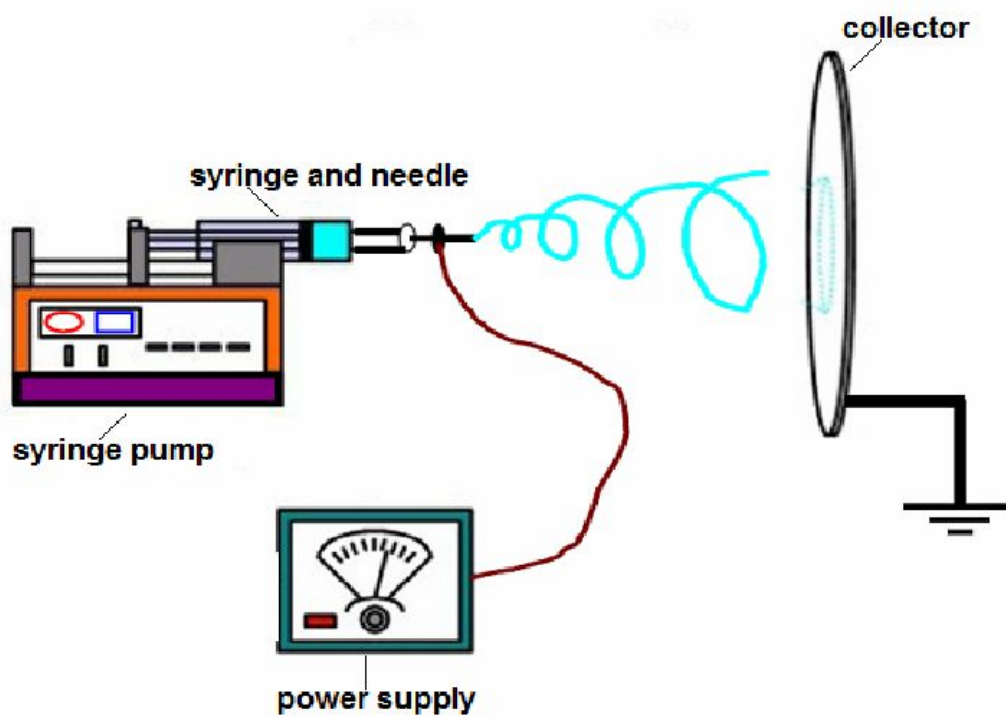


Figure 8. A Schematic of an electrospinning set-up.^[63]

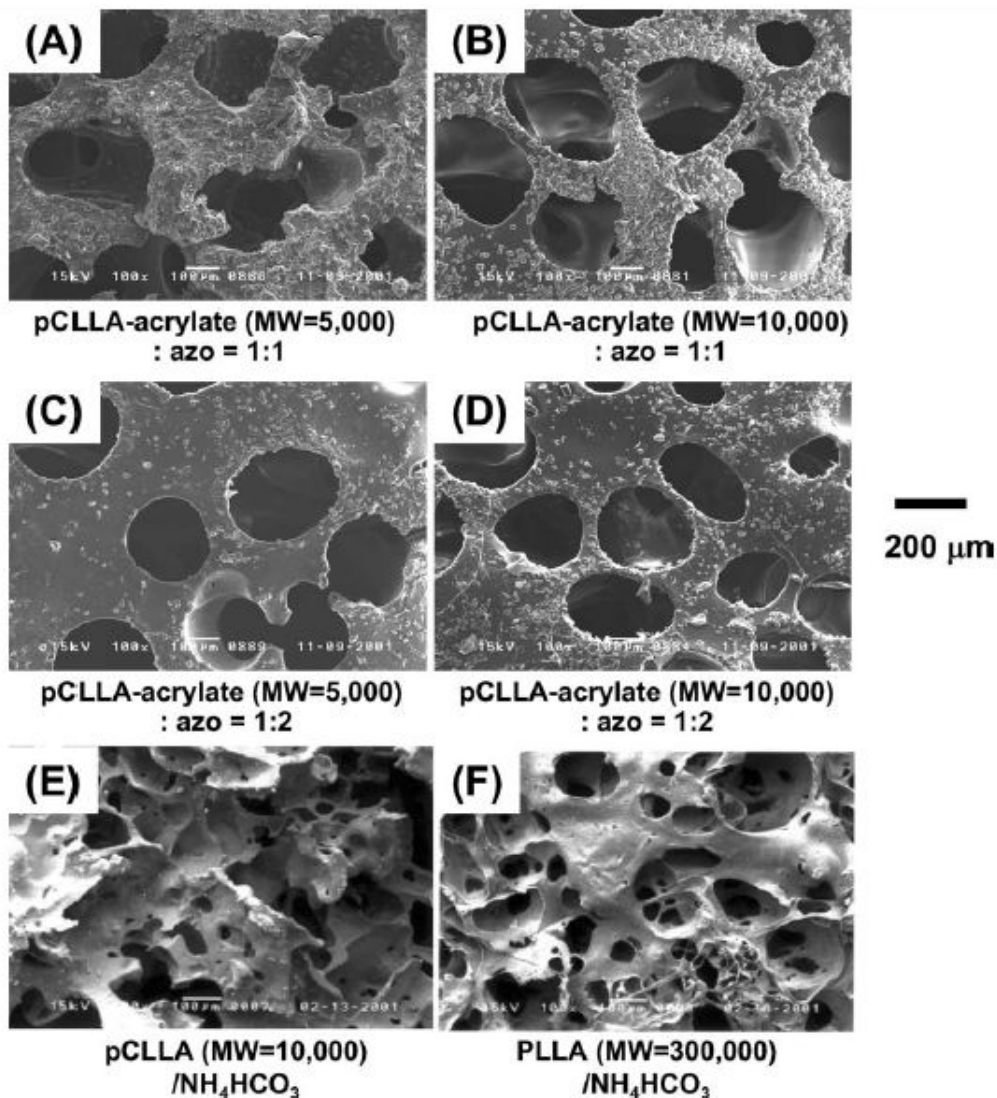


Figure 9. Electromicroscopic appearances of the formed macroporous scaffolds.(A) - D) Scaffolds prepared by UV irradiation of pCLLA-tetraacrylates ($M_w = 5000$ and $10,000$) and the azo-compound (macromonomer:azo-compound acetone solution = 1:1 and 1:2); (E) pCLLA-tetraacrylate scaffold using NH_4HCO_3 particles and UV irradiation; (F) conventional PLLA scaffolds using NH_4HCO_3 particles.^[64]

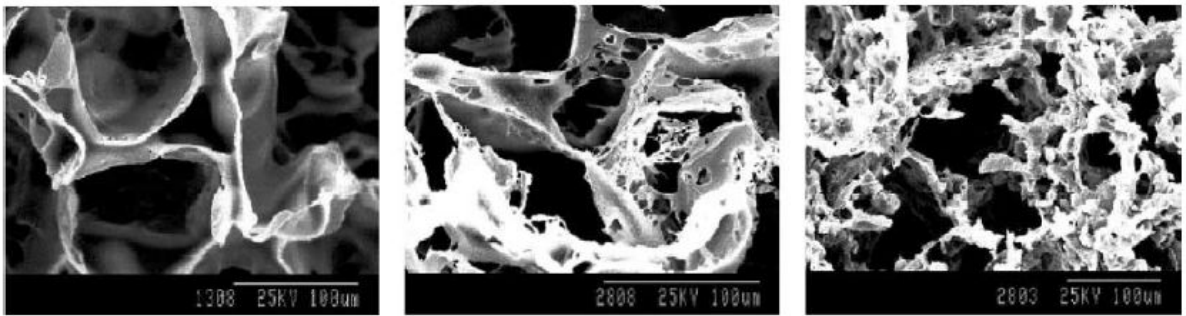


Figure 10. SEM photographs of the cross-section of foams fabricated by combining the phase-separation and particle-leaching techniques.^[65]

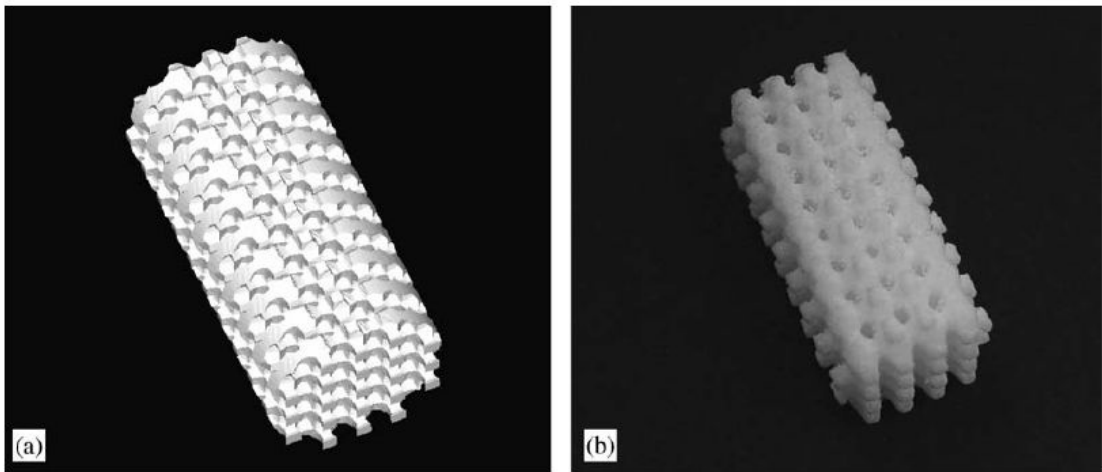


Figure 11. (a) STL design file for the 1.75 mm $x=y=z$ porous scaffold. (b) 1.75 mm $x=y=z$ PCL scaffold fabricated by SLS.^[57]

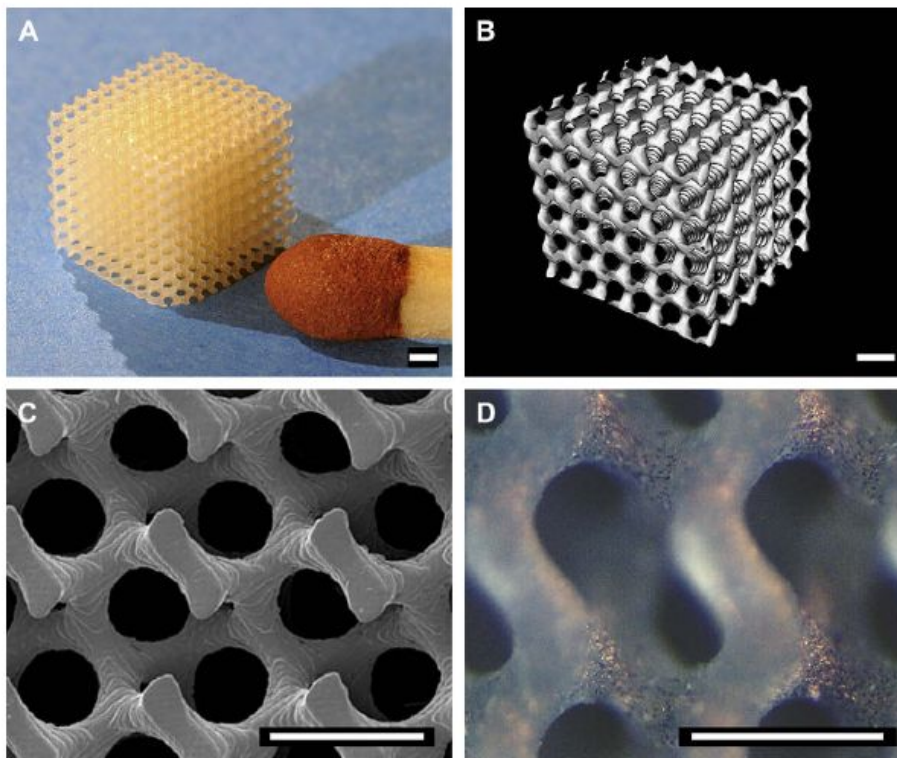


Figure 12. Images of PDLLA network scaffolds with a gyroid architecture, built by stereolithography. (A) Photograph, (B) mCT visualisation and (C) SEM image. In (D) a light microscopy image is shown for a scaffold seeded with mouse pre-osteoblasts after 1 d of culturing. Scale bars represent $500 \mu\text{m}$.^[66]

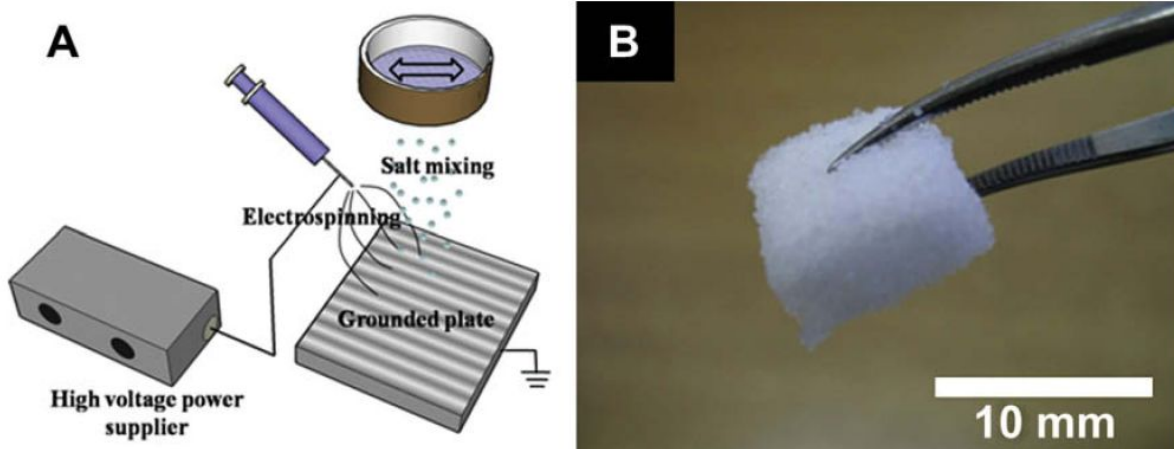


Figure 13. Electrospinning concurrent with salt deposition: (A) schematic diagram of the electrospinning and salt deposition set-up; (B) photograph of resultant nanofibers/salts composite.^[12]

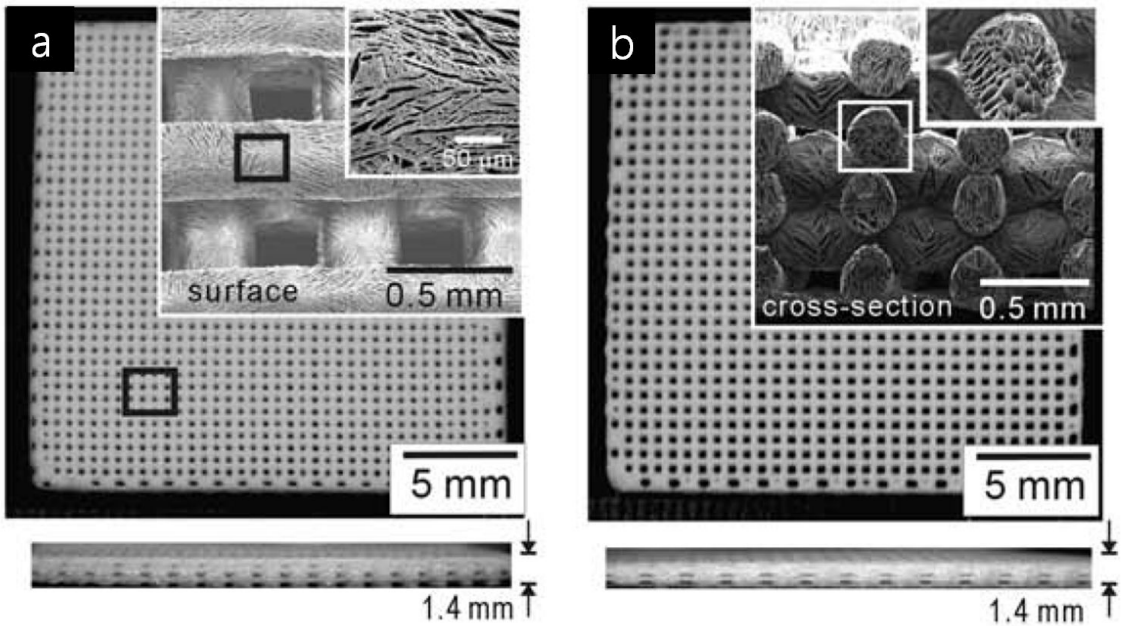


Figure 14. The magnified image in (a) shows the surface of the collagen strands, and the magnified image in (b) shows a cross section of a collagen strand.^[11]

제 3 장 전기방사된 PCL/콜라겐 생복합 지지체 : 설계, 제작, 그리고 물리적 그리고 세포성 반응.

1. 서 론

조직공학은 생체 조직의 공학적인 접근으로 지지체 (Scaffold)를 제작하여 인체조직의 기능과 손상을 복원하고 개선시키는 것을 목적으로 하고 있다. 활발히 연구되고 있는 생체조직 중 하나인 뼈 조직의 경우 골 결손의 회복을 목적으로 자가 골 이식이나 인공 골 이식등의 방법이 사용되고 있다.^[1-2] 그러나 자가 골 이식의 경우 감염이나 골수급의 어려움, 다수의 의료 사고의 위험성이 존재하는 등 시술의 어려움이 존재한다. 이러한 이유로 인하여 골 조직을 회복시키기 위한 인공 골 세포담체 제작에 관련된 다양한 연구들이 보고되고 있다.^[3-4] 인공 골 세포담체가 조직공학(tissue engineering)에 사용되기 위해서는 생체 적합성, 생분해성, 기계적 강도, 친수성, 세포담체의 표면 구조 등의 조건이 요구된다.^[5-6] 생체재료로서 널리 알려져 있는 콜라겐은 transforming growth factor- β (TGF- β), bone morphogenetic proteins (BMPs), fibroblast growth factor (FGF-2) 등의 성장인자 (growth factor)를 가지고 있어 세포의 성장을 촉진시키는 우수한 물질로 알려져 있다.^[7] 특히 콜라겐에 함유되어 있는 BMPs의 경우 골유도 인자로 알려져 있어 줄기세포가 조골세포로의 분화를 유도하는 물질로 알려져 있다.^[8] 이러한 이점에도 불구하고 콜라겐은 재료자체의 기계적 강도나 가공성 (processability)이 취약한 문제점이 있어,^[9] 주로 합성고분자와 혼합하여 사용되고 있다.^[10-12] 한편 세포담체의 나노/마이크로/마이크로적인 구조나 형태도 세포의 성장에 매우 중요한 요소로 작용하기 때문에 이러한 조건을 만족하는 세포담체 제작방법들 또한 보고되고 있다. 대표적인 세포담체 제작방법에는 용매증발법, 염침출법, 가스발포법, 레

이저 소결법, 쾌속조형등의 방법들이 있으며,^[13-16] 제시된 제작기법과 더불어 최근 전기방사공정을 이용한 세포담체 제작기법이 개발되고 있다. 전기방사공정은 고분자용액에 전압을 가하여 다량의 나노파이버를 생산하는 공정으로서 비교적 간단한 공정으로 제작되는 멤브레인의 표면적이 매우 넓고 강도가 우수한 장점이 있으며 가공성이 좋다.^[17-19] 최근에는 전기방사를 사용하여 세포담체를 이루는 나노섬유의 배열성 제어, 표면특성, 그리고 기존의 문제점이었던, 3차원 형상구현의 해결등 다양한 형태의 전기방사 연구가 보고되고 있다.^[20-23] Li et. al.은 특수한 형태의 전극관을 제작하여 전기방사를 하여 나노파이버를 직교 방향으로 배열할 수 있음을 보여 주었고,^[20] G. Kim et. al.은 배열된 나노파이버 도관을 제작하고, PC-12세포의 증식을 살펴본 결과 세포성장의 형태가 나노파이버의 배열방향과 일치하는 것을 확인 하는 연구가 보고되었다.^[21] 한편 기존 전기방사의 문제점이었던 3차원 형상구현에 관련된 연구들로는 T. G. Kim은 hydroxyapatite/collagen을 전기방사와 염침출법을 통하여 성공적인 3차원 세포담체를 제작하였고, 제작된 세포담체의 콜라겐의 함량에 따라 연골세포의 증식이 증가함을 확인하였으며,^[22] Y. Yokoyama는 육조형태의 접지부와 wet electrospinning이라는 공정을 통하여 높은 공극률을 갖는 PGA 3차원 나노파이버 세포담체를 제작하는 연구를 보고하였다.^[23]

본 연구의 목적은 이방성 구조의 골 재생을 향상시키는 tube형태의 세포담체 제작으로써, 뛰어난 기계적 강도와 미세기공구조, 뛰어난 생체적합성 등의 요건을 필요로 한다. 이러한 요건을 만족하기 위해 기계적 강도가 우수하고 가공성이 뛰어난 생체적합성 고분자인 PCL과 뛰어난 골유도 물질로 알려진 콜라겐을 이용하여 tube형태의 PCL/Collagen (P/Col) tube 세포담체를 제작하였으며, 뼈의 이방성 구조와 기계적 강도를 구현하기 위해 PCL 나노파이버의 배열방향을 조절하였다. 제작된 tube형태의 P/Col 나노파이버 세포담체는 콜라겐의 함량에 따라 다양한 기계적 강도와 MG-63 세포의 증식거동을 보였다.

2. 실험

2.1. 재료 및 시료제조

본 연구에 사용된 시료는 poly(ϵ -caprolactone) (PCL, $M_w = 80,000$ Aldrich)을 10 wt%로 사용하였으며, 용매로는 n,n-dimethylformamide (DMF, JUNSEI) 와 methylene chloride (MC, JUNSEI) 를 4:1의 비율로 혼합하여 사용하였다. 또한 콜라겐 (Matrixen-PSP; Bioland, Cheonan City, South Korea)은 돼지의 피부조직으로부터 추출한 것으로써 3rd 초순수에 용해하여 사용하였다.

2.2. P/Col 나노파이버 tube 제조

P/Col tube은 다음 Fig.1 (a)와 같은 전기방사공정/딥핑 공정을 이용한 단계별 제조 방법을 사용하였다. 전기방사공정은 크게 syringe pumping system, high voltage direct current (HVDC), 접지부 역할을 하는 컬렉터로 구성되며, 컬렉터 회전표면속도는 약 0.2, 7.0 m/s, 실린지 펌프의 고분자 용액 공급 속도는 1 ml/h, 노즐과 컬렉터 사이의 방사거리는 9 cm, voltage는 12 kV로 제조하였다. 전기방사의 컬렉터는 나노섬유가 배열되는 방향을 조절할 수 있도록 Fig.1 (b)와 같은 형태의 랜덤, 배열형태 컬렉터를 자체 제작하였다. 제조 방법은 나노파이버를 10분간의 전기방사과정을 거쳐, 각각 콜라겐 1, 2, 3 wt% 용액으로 콜라겐 코팅을 위해 콜라겐 코팅용액에 딥핑 한 후 상온에서 12h동안 자연건조 하는 딥핑공정을 사용하였다. 2차 전기방사 과정을 통하여 동일한 조건으로 나노파이버를 10분간 방사하고, 2차 코팅과정은 동일한 콜라겐 0.1 wt% 용액을 사용하여 콜라겐 코팅을 하였다. 마지막으로 에탄올에 용해한 50 mM 1-ethyl-(3-(3-diethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) 용액에 10분간 경화한 (cross-linked) 후 세척 및 건조하여 Fig.1 (c)와 같은 형태의 나노파이버 tube 을 제조하였다. 사용된 콜라겐 코팅 용액의 wt%에 따라 sample은 P/Col-1, P/Col-2, P/Col-3으로 표기하였다. PCL, P/Col-2, P/Col-3는 Align컬렉터를 사용하여 제작하였으며, P/Col-1의 경우 랜덤, 배열형태의 컬렉터를 사용하여 나노섬유의 배열방향을 조

절하였으므로 P/Col-R (Random), P/Col-A (Align)으로 구분하여 표기하였다.

2.3. 컬렉터의 회전방향에 따른 나노파이버의 배열성

제작된 P/Col tube의 PCL 나노파이버의 배열방향을 조절하기 위하여 자체 제작된 랜덤, 배열형의 회전형 컬렉터에 전기방사를 실시하여 제조하였다. P/Col-R과 P/Col-A의 나노파이버 배열구조를 관찰하기 위해 먼저 Sputter coater (E-1030, Hitachi)로 60mA에서 2분 동안 7nm의 백금 코팅을 하였으며, 주사전자현미경 (S-4800, Hitachi)을 통하여 5kV의 조건하에 X500, X1000 배율로 관찰하였다. 또한 전자주사현미경을 통해 나노섬유의 직경과 배열성을 측정하였다. 배열성의 분석은 full width half maximum (FWHM) 측정법을 사용하였다.

2.4. 제작된 튜브의 콜라겐 함량

딤핑 공정은 콜라겐 코팅용액의 collagen wt%를 1, 2, 3 wt%로 하여 P/Col-1, P/Col-2, P/Col-3를 제작하였으며, 제작된 P/Col tube 내의 콜라겐 코팅 층의 두께 변화를 광학현미경 (optical microscope) (BX-51, olympus, Japan)을 사용하여 관찰하였다. 콜라겐의 영역의 두께를 측정하기 위하여 딤핑공정에 사용된 콜라겐을 붉은색을 띠는 Rhodamin B (Aldrich)로 염색한 후 tube를 제작하였다. 또한 제작된 P/Col tube의 collagen weight fraction를 측정하기 위해 코팅 전 후의 무게를 측정하여 분석하였다.

2.5. FT-IR 측정

전기 방사된 P/Col tube내의 콜라겐의 경화에 따른 화학적 구조 변화를 확인하기 위하여 파장 400-4000 cm^{-1} 에서 FT-IR (Fourier-transform infrared) (model

6700;Nicolet, West Point, PA, U.S.A.) 측정을 실시하였다.

2.6. 수분 접촉각 측정

제작된 P/Col tube의 친수성을 측정하고자 물방울을 이용한 수분접촉각 (Water Contact Angle)을 측정하였다. 측정방법은 제작된 나노파이버 매트 위에 자체 제작된 접촉각 측정기를 통하여 $10\mu\text{l}$ 의 물방울을 접촉한 후 시간의 변화에 따라 물방울의 접촉각을 각도기를 이용하여 측정하였다.

2.7. 제조된 P/Col tube의 수분흡수율 측정

콜라겐은 생체친화성 고분자이며 동시에 친수성 물질로 알려져 있다. P/Col tube내부에 콜라겐 양의 변화에 따른 P/Col-1, P/Col-2, P/Col-3 tube의 친수성 특성의 변화를 관찰하였다.^[24]

$$WA(\%) = \frac{\omega_{2h} - \omega_0}{\omega_0} \times 100 \quad (1)$$

수분흡수율 측정방법은 X. Y. Li 의 실험방법을 참조하였다. W_0 는 제작된 tube를 1 cm 길이로 절단한 후의 초기 무게이며, W_{2h} 는 1 cm 길이의 tube를 물에 넣어 2h동안 수분흡수 과정을 거친 후 표면의 물기를 제거하고 수분을 흡수한 tube의 무게를 측정하였다.

2.8. 기계적 강도

제조된 P/Col은 이식 될 경우 회복부를 유지하기 위한 적당한 기계적 강도를 가져야 한다. P/Col tube의 나노섬유 배열 방향과 콜라겐 층의 두께가 기계적 강도에 미치는 영향을 확인하기 위하여 인장테스트를 하였다. 시편은 tube을 절개한 후 20 mm (H) x 3 mm (W)사이즈로 제작하였다. 측정에 사용된 장비는 UTM (TopTac 2000, Chemilab)을 사용하였으며 0.5 mm/s의 속도로 인장하중을 가하여 tube의 Young's modulus를 측정하였다.

2.9. MTT-assay

실험에 사용된 osteoblast-like-cells (MG-63) 세포의 배지로는 MEME (ATCC)를, 10% FBS와 1% penicilin/streptiavidin를 첨가하여 사용하였으며, 제작된 나노섬유 tube을 절개하여 10 x 10 mm²에 1 x 10⁵cell/50 μ l 농도의 세포를 각각 접종(seeding)하였다. 세포의 성장율은 MTT assay를 통해 1, 3, 7일차에 걸쳐 측정하였다. MTT assay는 Cell proliferation kit (Roche, Germany)를 사용하였으며, MTT labeling reagent를 통해 4h동안 37 $^{\circ}$ C CO₂ incubator에서 formazan을 형성시킨 후 solubilization buffer를 통해 24h 동안 formazan 결정을 용해하였다. 흡광도는 570 nm에서 ELISA reader(EL800, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, U.S.A)를 사용하여 측정하였다. 또한 세포의 성장형태를 관찰하기 위하여 1, 3, 7일에 걸쳐 배양한 후 SEM을 통하여 성장형태를 관찰하였다.

3. 결과

3.1. 1, 2, and 3 wt% collagen P/Col 튜브의 콜라겐 영역 관찰

Fig.2는 각기 다른 콜라겐 wt%용액으로 딥핑공정을 거쳐 형성된 콜라겐의 표면형상을 주사전자현미경으로 관찰한 결과이다. Fig.2 (a)의 0.1 wt% 콜라겐 용액을 사용한 경우 딥핑 공정 후에도 명확한 나노파이버의 표면형상구조를 관찰할 수 있었다. Fig.2 (b)의 0.5 wt% 콜라겐 용액의 경우 나노섬유층 위로 나노섬유의 형상이 확인 될 정도로 얇은 층의 형성이 확인되었다. 그러나 Fig.2 (c)의 1 wt% 콜라겐 코팅용액을 사용한 경우 나노파이버층 위로 두꺼운 콜라겐 층의 형성을 확인하였다. 이러한 나노파이버에 코팅된 콜라겐의 친수성 특성은 세포담체에 있어서 매우 중요하다. S.R. Benhabbour연구팀은 수지상 돌기 표면에 PEG를 화학적 흡착시켜 친수특성을 가지는 수지상돌기 표면을 제작하였다. 제작된 표면에 사람의 각막상피세포(HCEC)와 생쥐의 3T3 섬유모세포(M-3T3)를 배양하였으며 그 결과 표면의 친수성 특성이 증가할수록 세포의 초기 흡착과 증식률이 증가함을 확인하였다.^[27] 제작된 나노파이버 tube의 경우에도 코팅된 콜라겐 층의 강한 친수성 특성으로 PCL 나노파이버의 소수성특성을 억제하고, 세포의 초기 부착률 및 증식률을 한층 향상시킬 수 있을 것으로 예상된다.

3.2. 전자주사현미경 관찰

나노파이버의 배열성을 조절하기 위해 각기 다른 회전방향을 갖는 컬렉터로 제작되는 tube의 배열성을 조절하였다. 제작된 튜브의 나노파이버 배열성은 배열방향을 다르게 조절한 P/Col-R, P/Col-A tube의 내부, 외부 구조 SEM이미지와 FWHM법을 사용하여 측정하였다. Fig.3 (a), (b)는 랜덤 타입의 회전형 컬렉터를 사용하여 제조된 P/Col-R tube의 외부와 내부를 관찰한 결과로서 나노파이버의 배열방향이 직교형을 띄고 있음을 확인할 수 있다. Fig.4 (a)는 이를 토대로 FWHM를 측정한 결과로서 나

노섬유의 배열성 분포가 직교형 배열을 나타내고 있을 뿐만 아니라 측정값이 23°로 분포가 매우 집중되는 현상을 확인하였다. D. Zhang 연구팀에 의하면 일반적인 전기방사는 제작되는 나노파이버가 랜덤하게 방사되는 경향이 있으나, 수직된 전기장의 방향과 평행하게 돌출된 접지부의 조절으로 나노파이버의 직교형 배열을 유도할 수 있음을 보여주었다.^[28] 제작된 P/Col-R의 경우에도 얇은 폭의 접지부로 인한 전기적인 힘과 컬렉터의 회전력에 의한 수평방향의 물리적인 힘에 영향을 받은 것으로 분석되며 서로 수직된 두 힘의 방향에 따라서 직교형태의 나노파이버 배열이 이루어진 것으로 사료된다. Fig.3 (c), (d)는 배열타입의 회전형 컬렉터를 사용하여 제조된 P/Col-A tube의 외부, 내부 배열구조로서, Fig.3 (b)의 P/Col-1 배열이 회전형 컬렉터의 7.0 m/s에 이르는 매우 빠른 회전속도와 같은 방향으로 돌출되어 있는 접지부로 인하여 나노파이버가 회전 방향으로 배열되어 있는 현상을 확인하였다. Fig.4 (b)의 P/Col-A의 FWHM 측정값은 20°로 P/Col-R에 비하여 높은 배열 집중도를 보였다. 일반적으로 나노파이버의 높은 배열성은 세포담체의 배열방향에 대한 기계적 강도를 향상시켜주는 것으로 알려져 있다. 때문에 이러한 높은 배열구조의 tube는 높은 강도를 필요로 하는 이방성 구조의 뼈 재생에 효과적일 것으로 판단된다. 또한 P/Col-R, P/Col-A를 이루는 내·외부 fiber의 직경은 각각, Fig.3(a) $2.1 \pm 0.5 \mu\text{m}$, (b) $1.8 \pm 0.4 \mu\text{m}$, (c) $1.9 \pm 0.7 \mu\text{m}$ (d) $2.0 \pm 0.5 \mu\text{m}$ 로 방사조건의 동일함으로 인하여 큰 차이를 보이지 않았다.

3.3. 코팅wt%에 따른 두께 변화와 함량

각각의 콜라겐 코팅용액의 wt%에 따라서 나노파이버 tube 내부에 콜라겐 층의 변화를 확인하기 위하여 광학현미경을 사용해 형상 및 두께를 확인하였다. Fig.5(a)는 순수한 PCL tube의 단면을 관찰한 광학사진이며, Fig.5 (b)는 붉은색을 띠는 Rhodamin B로 염색된 콜라겐으로 제작된 P/Col-3 이다. Fig.5 (b)의 경우 붉은 영역의 콜라겐 층이 tube 내부에 형성되어 있음을 알 수 있지만, 콜라겐이 나노파이버 층으로 흡수되면서 uniform한 층은 형성되지 않음을 확인하였다. Fig.5 (c)는 1, 2, 3wt%의 콜라겐

용액으로 딥핑 공정을 거쳐 제작한 tube의 콜라겐 층의 두께변화를 측정된 결과로써 콜라겐의 두께는 1, 2, 3 wt%의 콜라겐 딥핑용액에 대해서, $8.3 \pm 1.6 \mu\text{m}$, $18.4 \pm 5.4 \mu\text{m}$, $28.4 \pm 13.2 \mu\text{m}$ 로 점차적으로 증가하였다. 또한 Table.1은 콜라겐 코팅 전, 후의 무게측정과 완성된 tube의 무게측정으로 콜라겐의 weight fraction을 나타내었다. 딥핑 용액의 콜라겐 wt%가 증가할수록 tube내의 콜라겐 weight fraction이 $5.4 \pm 0.8 \%$, $19.1 \pm 1.6 \%$, $21.3 \pm 1.8 \%$ 으로 순차적인 증가를 확인하였다.

3.4. 경화에 따른 콜라겐의 화학적 구조 확인

Fig.6은 제조된 P/Col tube을 FT-IR을 통하여 분석한 결과이다. S. Park연구팀에 의하면 콜라겐의 화학적 구조는 주로 아미드 그룹으로 이루어져있으며, EDC를 통하여 경화를 할 경우 구조적인 변화 없이 IR의 intensity가 감소하는 것으로 알려져 있다.^[27] 콜라겐 경화전의 IR 그래프에서는 콜라겐의 주 아미드 그룹인 amide I (1629 cm^{-1}), amide II ($1550 - 1456 \text{ cm}^{-1}$)로 구성되어 있음을 확인하였다. EDC 경화 후 아미드 그룹인 amide I, amide II bands의 intensity 감소가 있었지만, 콜라겐의 다양한 function의 구조적인 변화가 없었으므로 EDC에 의한 경화가 잘 이루어진 것으로 판단된다.

3.5. 수분접촉각

Fig.7 (a-c)는 제조된 다양한 나노파이버 tube (Pure PCL, P/Col-R, P/Col-A)의 콜라겐의 유무, 그리고 PCL 나노파이버의 배열성에 따른 친수성 특성의 변화를 측정하기 위하여 $10\mu\text{l}$ 의 물방울을 접촉시킨 후 30분까지의 접촉각을 관찰한 결과이며, Fig.7 (d)에 그래프로 나타내었다. 콜라겐을 코팅한 P/Col-R, P/Col-A의 경우 비교군인 순수 PCL 나노파이버 mat에 비하여 낮은 접촉각을 이루고 있어 콜라겐 코팅에 의한 친수성 특성이 향상되었음을 확인할 수 있었다. 또한 P/Col-A tube의 경우 물방울의 흡수

진행방향이 나노파이버의 배열방향과 일치하는 것을 확인할 수 있었다. Fig.7 (c)의 이러한 결과는 나노파이버 tube의 이방성 구조가 친수성 특성을 향상시킬 수 있으며, 나노파이버의 배열방향이 세포와 세포외기질 (ECM)의 성장확산방향을 조절 할 수 있을 것으로 보인다.

3.6. 코팅조건에 따른 수분흡수율의 변화

일반적으로 세포담체의 높은 수분흡수율은 세포담체의 세포 초기 부착률 및 성장률을 향상시켜주는 것으로 알려져 있다.^[24] Fig.8은 제조된 P/Col tube 내부에 있는 콜라겐의 양에 따라 수분흡수성의 변화를 확인한 결과로서, 콜라겐 층의 두께가 증가할수록 수분흡수량이 증가하였다. 이러한 이유는 지지체 내부에 강한 친수성 특성을 가지고 있는 콜라겐 양의 증가로 인하여 P/Col tube의 수분흡수성이 증가한 것으로 사료된다.

3.7. 기계적 강도

세포담체의 이식 후에는 움직임이나 충격과 같은 여러 가지 상황에서의 인장이나 압축하중을 받게 된다. 때문에 재생하기 전까지의 회복부를 유지하기 위한 세포담체의 기계적 강도는 매우 중요하다.^[28-29] Fig.9 (a)는 P/Col-R, P/Col-A tube의 Stress-Strain curve로서 이를 토대로 Young's modulus를 측정하였다. P/Col-A의 Young's modulus는 82.3 ± 8.4 MPa으로 P/Col-R tube의 8.8 ± 1.1 MPa에 비하여 약 9배 증가하였다. P/Col-R tube의 직교형 나노파이버 배열구조는 서로 다른 방향으로 배열되어 있는 나노파이버가 인장하중이 가해짐에 따라 순차적으로 인장하중을 받게 되고 그 결과 높은 신율과 낮은 탄성한도로 나타났다. 하지만 P/Col-A tube의 경우 나노파이버가 같은 방향으로 배열되어 있어 대부분의 나노파이버가 인장하중을 동시에 받게 되고 낮은 신율을 갖는 대신에 높은 탄성한도를 가지는 것으로 판단된다. Fig.9 (b)는 콜라겐 코팅 정도에 따른 P/Col tube의 Young's modulus 결과이다. PCL tube의 경우

Young's modulus가 53.9 ± 6.0 MPa으로 나타난 반면, P/Col-3의 경우 113.2 ± 1.8 MPa로 두 배 이상 증가하였다. Fig.9 (c-d)는 인장테스트 통하여 파괴된 PCL, P/Col-3 시편의 이미지이다. Fig.9 (d) P/Col-3 시편은 PCL 나노파이버 사이의 콜라겐 층이 인장시험을 거쳐 전체적으로 파괴되어 있는 현상을 확인 할 수 있는데, 이는 제작된 P/Col tube의 콜라겐 층이 PCL 나노파이버와 성공적으로 흡수 및 결합되어 있으며, P/Col tube에 가해지는 인장하중을 함께 흡수하여 기계적 강도가 크게 증가된 것으로 보인다.

3.8. *In vitro* test of MG63s

Fig.10는 osteoblast-like-cells (MG-63)를 P/Col tube에 키운 결과이다. Fig.10 (a) 1일차 결과를 통하여 PCL 실험군에 비하여 콜라겐이 함유되는 P/Col-3의 MG-63 세포의 초기 부착율이 증가하였다. 또한 Fig.10 (a) 3, 7일차에는 PCL 실험군에 비하여 콜라겐 층이 함유되어 있는 P/Col-1, P/Col-2, P/Col-3의 증식이 향상되었다. 특히 P/Col-3의 경우 PCL에 비하여 조골세포의 증식률이 약 60% 이상 향상되었다. 이러한 결과는 tube내의 콜라겐 층에 함유된 성장인자의 releasing 효과와 높은 친수성에 의하여 세포의 증식이 향상된 것으로 예상된다. Fig.10 (b-c)는 7일차의 PCL, P/Col-3의 셀 형상을 관찰 한 것으로서 Fig.10 (c)의 증식이 우수함을 확인하였으며 ECM의 진행방향이 나노파이버의 배열방향과 일치하고 있음을 확인하였다. 이는 나노파이버의 수분흡수 진행방향이 세포의 ECM의 확산방향을 조절할 수 있으며 세포의 성장방향이 유도할 수 있음을 의미 것으로 보인다.

4. 결론

본 연구에서는 조골세포 재생을 목적으로 하는 tube형태의 생체 모방형 세포담체를 제작하였다. PCL 나노파이버를 배열한 tube에 대표적인 골 유도물질 중 하나인 콜라겐을 딥핑 공정을 통하여 tube 내에 콜라겐 층을 함유시켰다. P/Col tube의 배열성이 증가할수록 기계적 강도와 친수성 특성이 향상됨을 확인하였으며, tube 내에 함유된 콜라겐 층의 두께가 증가함에 따라 tube의 수분흡수성, 기계적강도, 조골세포의 증식률이 향상되었다. 또한 나노파이버의 배열을 통해 ECM의 확산방향을 조절하여 MG-63 세포의 성장방향을 길이방향으로 유도할 수 있었다. 이를 통하여 tube형 골 재생 세포담체로 적용할 수 있음을 확인하였다.

5. 참고문헌

1. P. Bianco, M. Riminucci, S. Gronthos, P. G. Rbey, Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*, 19, 180, 2001.
2. L. Cui, B. Liu, G. Liu, W. Zhang, L. Cen, J. Sun, S. Yin, W. Liu, Y. Cao, Repair of cranial bone defects with adipose derived stem cells and coral scaffold in a canine model. *Biomaterials*, 28, 5477, 2007.
3. Y. Wang, F. Z. Cui, K. Hu, X. D. Zhu, D. D. Fan, Bone regeneration by using scaffold based on mineralized recombinant collagen. *J. Biomed. Mater. Res. Part B*: 1, 29, 2008.
4. H. Yoshimoto, Y. M. Shin, H. Terai, J. P. Vacanti, A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 24, 2077, 2003.
5. D. M. L. Cooper, J. R. Matyas, M. A. Katzenberg, B. Hallgrimsson, Comparison of microcomputed tomographic and microradiographic measurements of cortical bone porosity. *Calcif. Tissue Int.* 74, 437, 2004.
6. M. F. Leong, K. S. Chian, P. S. Mhaisalkar, W. F. Ong, B. D. Ratner, Effect of electrospun poly(D,L-lactide) fibrous scaffold with nanoporous surface on attachment of porcine esophageal epithelial cells and protein adsorption. *J. Biomed. Mater. Res.* 89A, 1040, 2009.
7. J. P. Hodde, M. C. Hiles, Bioactive FGF-2 in Sterilized Extracellular Matrix. *Wounds*, 5, 195, 2001.
8. M. Geiger, R. H. Li, W. Friess, Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 1613, 2003.
9. K. N. An, Y. L. Sun, Z. P. Luo, Flexibility of type I collagen and mechanical property of connective tissue. *Biorheology*, 41, 239, 2004.

10. N. Bhattarai, D. Edmondson, O. Veiseh, F. A. Matsen, M. Zhang, Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. *Biomaterials*, 26, 6176, 2005
11. Y. Ji, K. Ghosh, X. Z. Shu, B. Li, J. C. Sokolov, G. D. Prestwich, R. A. F. Clark, M. H. Rafailovich, Electrospun three-dimensional hyaluronic acid nanofibrous scaffolds. *Biomaterials*, 27, 3782, 2006.
12. P. Petrini, C. Parolari, M. C. Tanzi, Silk fibroin-polyurethane scaffolds for tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 10, 849, 2001.
13. Y. C. Chiu, J. C. Larson, A. Isom, E. M. Brey, Generation of porous poly (ethylene glycol) hydrogels by salt leaching. *Tissue Eng.* 16, 5, 2010.
14. A. Finne-Wistrand, A. Albertsson, O. H. Kwon, N. Kawazoe, G. Chen, I. K. Kang, H. Hasuda, J. Gong, Y. Ito, Resorbable scaffolds from three different techniques: electrospun fabrics, salt Leaching porous films, and smooth flat surfaces. *Macromolecular bioscience*, 8, 951, 2008.
15. J. M. Williams, A. Adewunmi, R. M. Schek, C. L. Flanagan, P. H. Krebsbach, S. E. Feinberg, S. J. Hollister, S. Das, Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. *Biomaterials*, 26, 4817, 2005.
16. T. Hadlock, C. Ssunback, D. Hunter, M. Cheney, J. P. Vacanti, A polymer foam conduit seeded with Schwann cells promotes guided peripheral nerve regeneration. *Tissue Eng.* 2, 119, 2000.
17. S. Zhong, W. E. Teo, X. Zhu, R. W. Beuerman, S. Ramakrishna, L. Y. L. Yung, An aligned nanofibrous collagen scaffold by electrospinning and its effects on in vitro fibroblast culture. *J. Biomed. Mater. Res.* 3, 456, 2006.
18. K. Kim, M. Yu, X. Zong, J. Chiu, D. Fang, Y. Seo, B. S. Hsiao, B. Chu, M. Hadjiargyrou, Control of degradation rate and hydrophilicity in electrospun

- non-woven poly (,-lactide) nanofiber scaffolds for biomedical applications. *Biomaterials*, 24, 4977, 2003.
19. P. Zhang, Z. Hong, T. Yu, X. Chen, X. Jing, In vivo mineralization and osteogenesis of nanocomposite scaffold of poly (lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with poly (L-lactide). *Biomaterials*, 30, 58, 2009.
 20. D. Li, Y. Wang, Y. Xia, Electrospinning nanofibers as uniaxially aligned arrays and layer-by-layer stacked films. *Advanced materials*, 16, 4, 2004.
 21. S. G. Hong, G. H. Kim, Electrospun micro/nanofibrous conduits composed of poly(ϵ -caprolactone) and small intestine submucosa powder for nerve tissue regeneration. *J. Biomed. Mater. Res.* 2, 421, 2010.
 22. T. G. Kim, H. J. Chung, T. G. Park, Macroporous and nanofibrous hyaluronic acid/collagen hybrid scaffold fabricated by concurrent electrospinning and deposition/leaching of salt particles. *Acta Biomater.* 4, 1611, 2008.
 23. Y. Yokoyama, S. Hattori, C. Yoshikawa, Y. Yasuda, H. Koyama, T. Takato, H. Kobayashi, Novel wet electrospinning system for fabrication of spongiform nanofiber 3-dimensional fabric. *Materials letters* 63, 754, 2009.
 24. X. Y. Li, X. Y. Kong, S. Shi, Y. C. Gu, L. Yang, G. Guo, F. Luo, X. Zhao, Y. Q. Wei, Z. Y. Qian, Biodegradable MPEG-g-Chitosan and methoxy poly(ethylene glycol)-b-poly(ϵ -caprolactone) composite films: Part 1. Preparation and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 79, 429, 2010.
 25. S. R. Benhabbour, H. Sheardown, A. Adronov, Cell adhesion and proliferation on hydrophilic dendritically modified surfaces. *Biomaterials*, 29, 4177, 2008.
 26. D. Zhang, J. Chang, Electrospinning of three-dimensional nanofibrous tubes with controllable architectures. *Nano lett.* 10, 3283, 2008.
 27. S. N. Park, J. C. Park, H. O. Kim, M. J. Song, H. Suh, Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylamino

- propyl) carbodiimide cross-linking. *Biomaterials*, 23, 1205, 2002.
28. X. H. Wang, D. P. Li, W. J. Wang, Q. L. Feng, F. Z. Cui, Y. X. Xu, X. H. Song, M. V. D. Werf, Crosslinked collagen/chitosan matrix for artificial livers. *Biomaterials*, 24, 3213, 2003.
29. D. W. Hutmacher, Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21, 2529, 2000.

Table 1. Weight fractions of PCL and collagen for fabricated P/Col tube.

	PCL	P/Col-1	P/Col-2	P/Col-3
Weight of collagen (mg)	24.6 ± 0.2	26.0 ± 0.2	30.3 ± 0.5	31.2 ± 0.6
Weight fraction of collagen (%)	-	5.4 ± 0.8	19.1 ± 1.6	21.3 ± 1.8

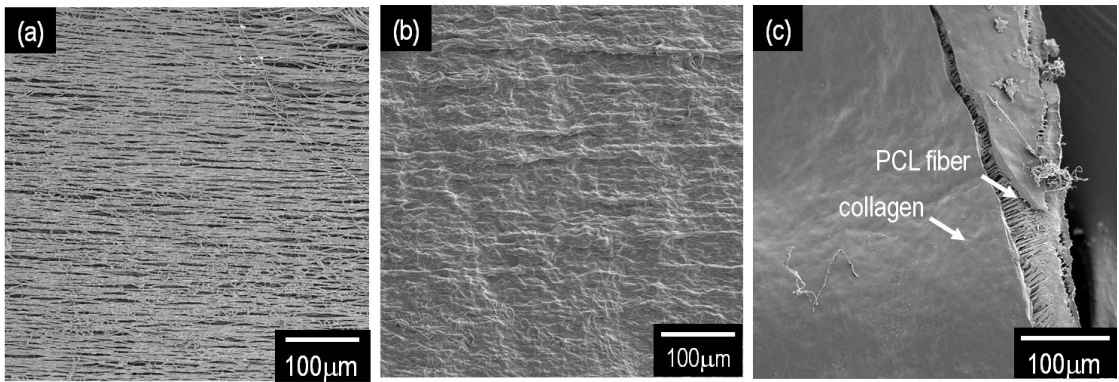


Figure 2. Surface shape of nanofiber mat after collagen dipping process. (a) 0.1 wt%. (b) 0.5 wt%. (c) 1 wt%.

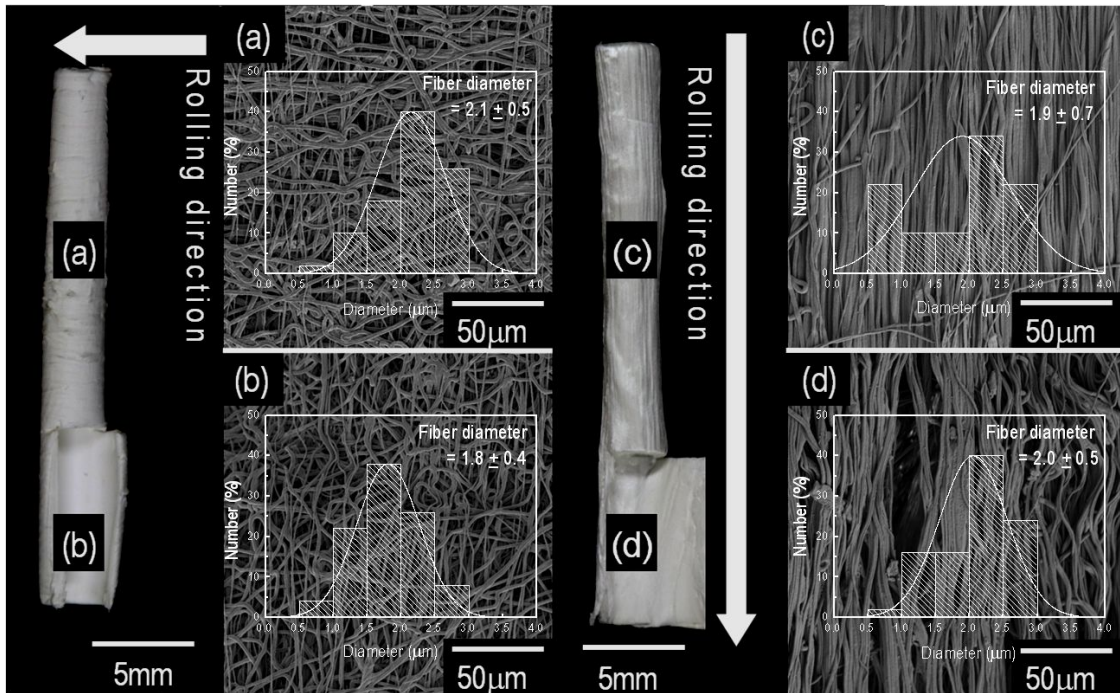


Figure 3. SEM image and diameter distribution of fabricated fibrous tube. (a-b) Random type, (a) Internal section ($D = 2.1 \pm 0.5 \mu\text{m}$), (b) External section ($1.8 \pm 0.4 \mu\text{m}$). (c-d) Align type, (c) Internal section ($1.9 \pm 0.7 \mu\text{m}$), (d) External section ($2.0 \pm 0.5 \mu\text{m}$).

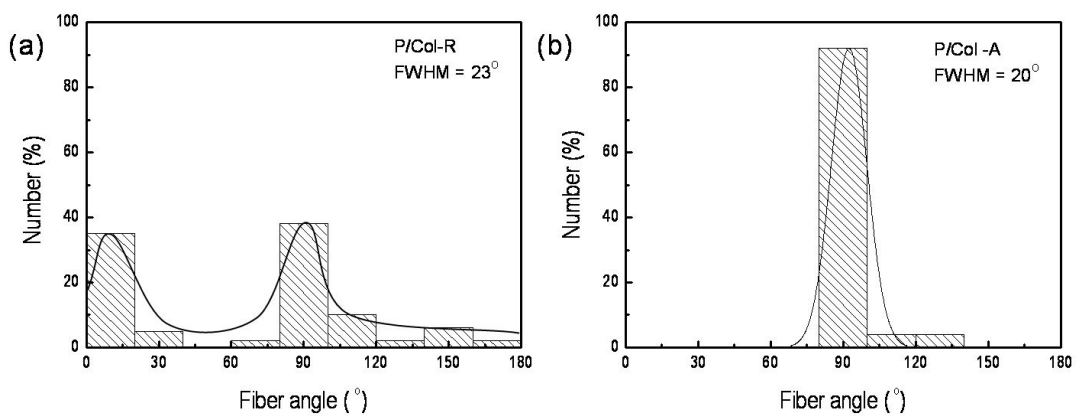


Figure 4. Alignment of nanofibrous tube by using FWHM. (a) P/Col-R = 23°. (b) P/Col-A = 20°.

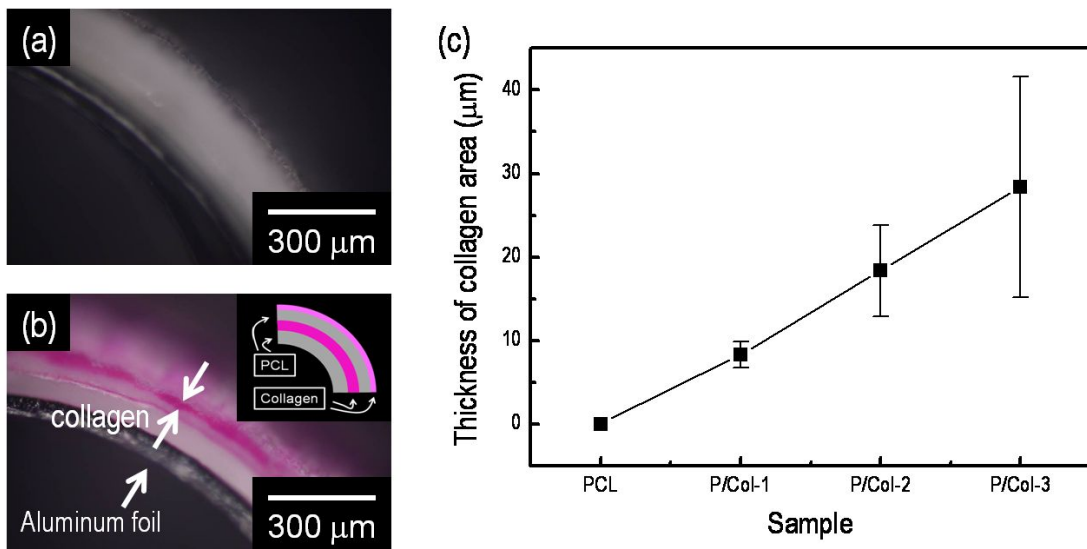


Figure 5. Cross sectional image of (a) PCL, (b) P/Col-3, (c) Thickness of collagen layer of P/Col. tube.

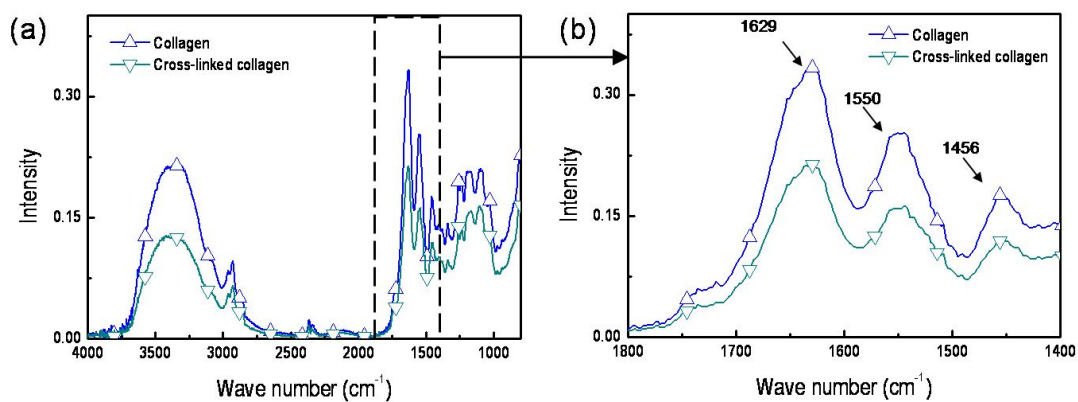


Figure 6. FTIR spectra of collagen sponge before and after cross-linking with EDC solution.

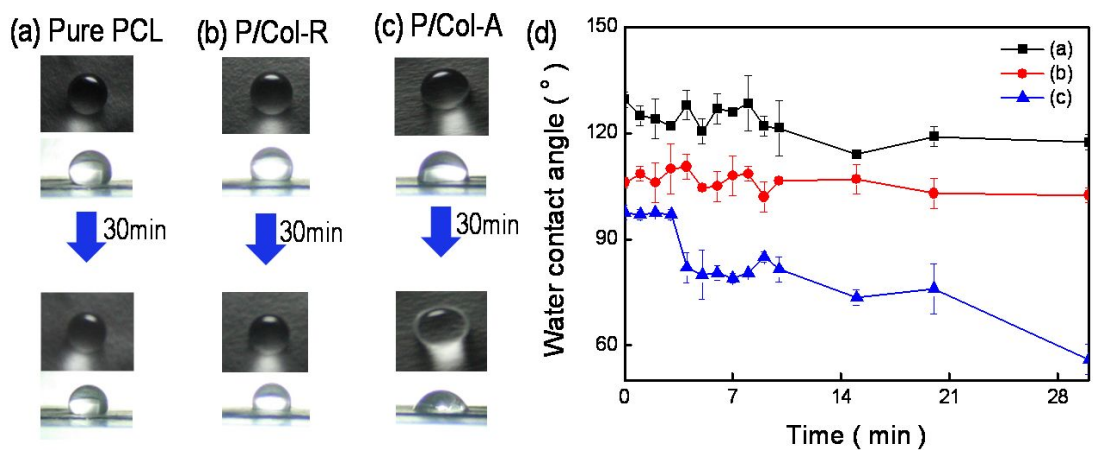


Figure 7. WCA of P/Col tube. (a)PCL (b)P/Col-R. (c)P/Col-A. (d) water contact angle VS. time.

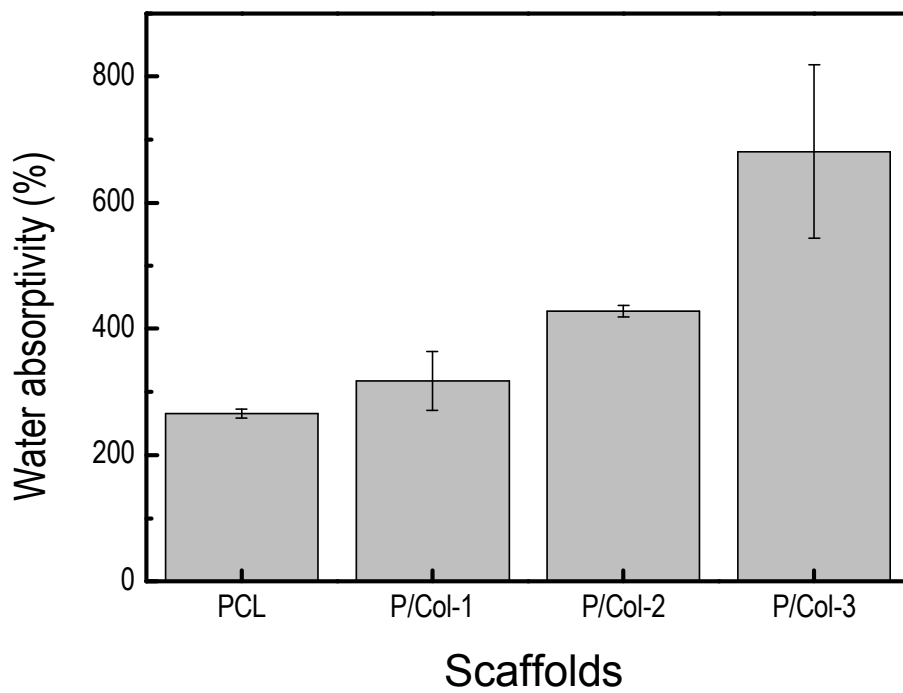


Figure 8. Water absorption-ability of P/Col tube scaffolds.

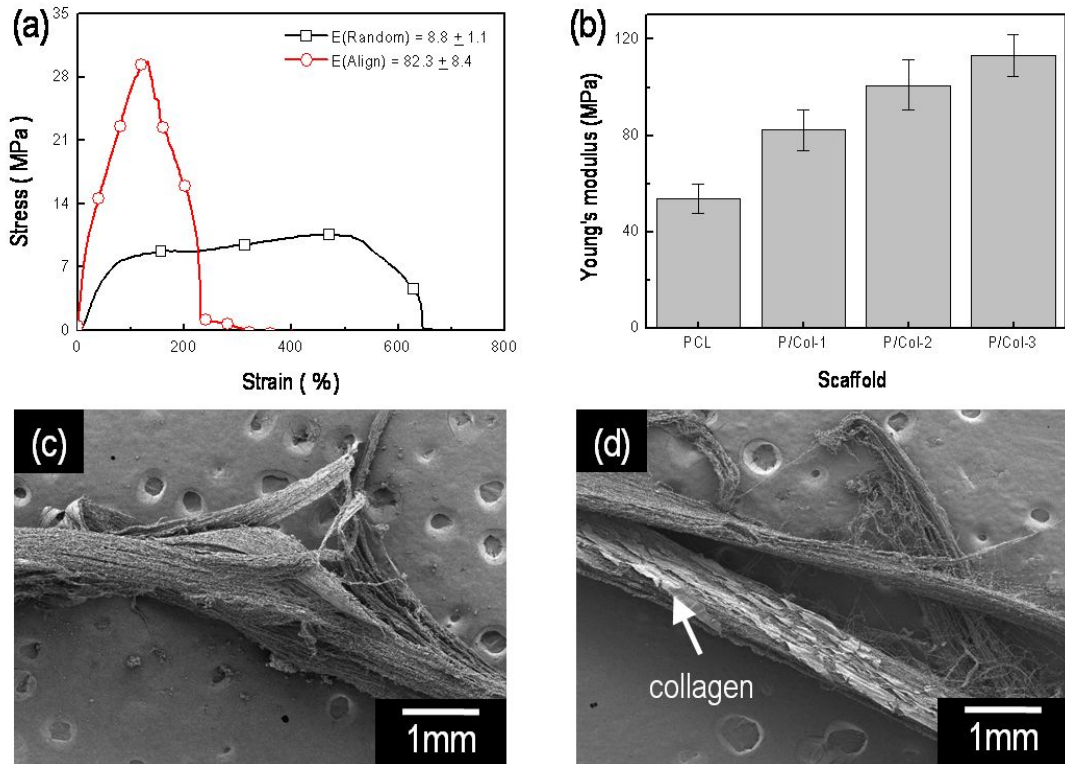


Figure 9. (a) Stress-strain curves of P/Col-1 tubes. (b) Young's modulus of coated P/Col. SEM image of P/Col tube after tensile test. (c) PCL, (d) P/Col-3.

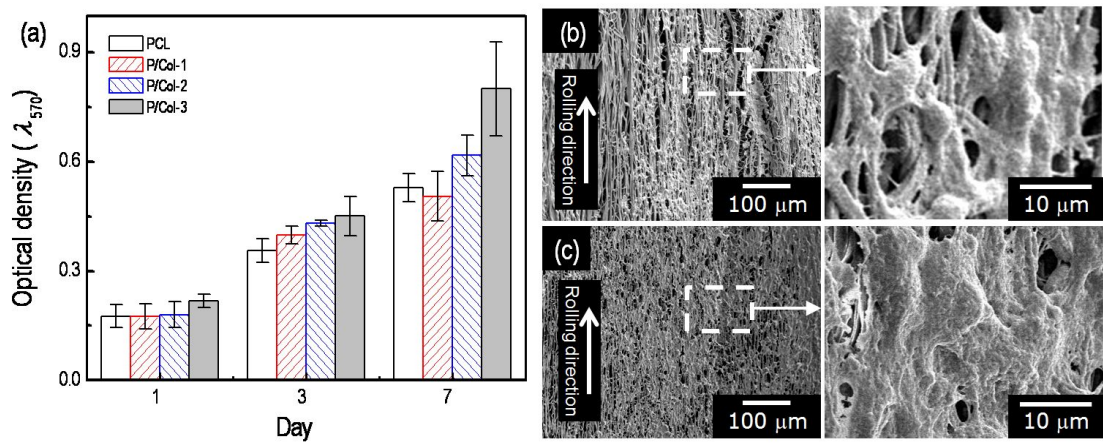


Figure 10. (a) MTT assay result of MG-63 Cells cultured on a scaffold. SEM micrographs of MG-63 cells cultured on (b) Pure PCL, (c) P/Col-3 after 7 days of cell culture.

제 4 장 쾌속조형 방법으로 제작된 PCL/콜라겐 하이브리드 지지체 제작에 대한 연구.

1. 서 론

사고나 질병으로 인하여 회복하기 어려운 상처나 장기의 손상등을 입게 되면 일반적인 자연적 회복이 불가능하다. 조직공학에서는 회복에 한계가 있는 조직의 재생을 세포 지지체, 세포, 성장인자를 사용하여 회복 및 복원 또는 개선하는 연구방법이 제시되고 있다.^[1-3] 이 중 세포 지지체는 이식된 부위가 회복되기까지 외부의 충격으로부터 보호하고 재생 및 복원을 돕는 기능을 갖추어야 한다. 그리고 재생속도를 향상시킬 수 있는 이상적인 세포 지지체를 제작하기 위한 설계는 구조나 공극, 생체적합성, 형상구현성등 다양한 특성들을 고려해야 한다.^[4-6] 조직공학에 응용되는 지지체의 최적의 구조는 인체 조직의 구조와 유사한 미세 구조체로서, 대표적으로 ECM을 들 수가 있다.^[7-8] 다양한 세포 지지체 제작법중 하나인 동결건조법은 용매의 상변화를 이용하여 스폰지 구조체를 제작하는 공정으로서 제작된 구조체는 물질의 교환이 자유로우며 세포의 성장 및 침투에 유리한 구조를 가지고 있다.^[9] 또한 용매의 상변화를 이용하기 때문에 다양한 생분해성 고분자를 사용할 수 있어 재료선택의 폭이 넓은 이점이 있다. 합성고분자인 PLA, PGA, PCL, PLGA나 천연고분자인 콜라겐, 아가로스, 알지네이트, 히아루론산, 키토산등을 사용할 수 있으며, 특히 천연고분자의 경우 형성구현에 어려움이 많았으나 동결건조를 사용할 경우 보다 쉽게 제작할 수 있다.^[10] 또한 조직공학용 지지체는 필요한 부위에 따른 3차원 형상의 조절 및 구현성도 매우 중요한데, 동결건조의 경우 지지체를 얼린 후 동결건조과정을 거치기 때문에 3차원 형상을 보다 쉽게 구현할 수 있다. 동결 건조된 지지체는 조직의 회복을 향상시키는 대부분의 요건을 가지고 있으나, 높은 공극률로 제작될 경우 낮은 기계적 강도를 가지게 되어 사용에 제

한이 있다.^[11-12] 최근에는 이러한 문제점을 해결하기 위한 방법들이 제시되고 있다. G. Chen 연구팀은 PLGA mesh에 collagen을 동결건조하여 낮은 기계적 강도를 보완한 성공적인 지지체를 제작하였다.^[13]

본 연구의 목적은 적절한 기계적 강도와 미세구조를 갖는 하이브리드 지지체의 구현으로서, 쾌속조형법과 동결건조법을 통한 단계별 제작방법을 통하여 성공적인 하이브리드 지지체를 구현하였다. 제작된 하이브리드 지지체는 제작조건에 따라 다양한 내부 형상과 크기를 보였으며, 이를 통해 두 가지의 물음에 답변을 하고자 한다. 1) PCL 지지체와 collagen/ β -TCP sponge의 다양한 공극크기가 세포의 성장 및 침투, 분화에 미치는 영향. 2) 하이브리드 지지체의 collagen/ β -TCP 함량이 세포의 증식 및 분화에 미치는 영향. 쾌속조형법으로 제작된 PCL 지지체는 다양한 공극사이로 제작되었으며, 내부구조를 이루는 sponge의 경우 collagen/ β -TCP 용액의 다양한 wt%로 제작되었다. 제작된 하이브리드 지지체는 PCL 지지체의 공극크기, collagen/ β -TCP sponge의 제작조건에 따라 다양한 기계적 강도와 MG-63 세포의 증식거동을 확인하였다.

2. 실험

2.1. 재료 및 시료제조

본 연구에 사용된 시료는 poly(ϵ -caprolactone) (PCL, $M_w=80,000$ Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A)을 사용하였으며, 내부 연결구조를 만들기 위한 용액의 제조는 돼지의 피부조직으로부터 추출한 콜라겐(Matrixen-PSP; Bioland, Cheonan City, South Korea)과 bioceramic의 한 종류인 β -TCP (Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A)를 0.05, 0.1, 0.5wt %로 3rd 초순수에 용해하여 사용하였다.

2.2. 하이브리드 지지체의 제조

하이브리드 지지체는 Fig.1의 Pure PCL 지지체를 제작하는 과정, 3차원 배양을 위한 PCL 지지체 내부에 collagen/ β -TCP sponge를 주입하고 제작하는 과정 등의 세 단계의 과정을 거쳐 제조하였다. Pure PCL 지지체의 제작은 SFF를 통해 제작하였으며, 본 실험에 사용된 SFF공정은 3축 시스템으로 조절할 수 있는 실린더부에 열을 가하여 고분자를 용융시키고, 압력을 통해 밀어내어 제작하는 공정을 채택하였다. PCL 지지체의 제작은 압력 500 kPa, 온도 94 °C, 노즐 팁의 직경 350 μ m 조건하에 제작하였다. Pure PCL 지지체의 공극크기는 300, 500, 1000 μ m 세 가지 조건으로 제작하였으며, 두 번째 단계인 Collagen sponge구조를 제작하기 위해 collagen/ β -TCP 용액은 3rd 초순수에 각각 0.05, 0.1, 0.5 wt%의 비율로 제조하였다. 제조된 collagen/ β -TCP 용액은 Pure PCL 지지체에 injection 시켜 영하 80°C의 조건하에 24시간 동안 동결하였다. 동결된 PCL/collagen/ β -TCP 지지체는 24시간 동안 동결건조과정을 거친 후 collagen을 경화하였다. 이때 collagen의 경화는 1-ethyl-(3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC; $M_w = 191.7$; Sigma-Aldrich)를 사용하였으며, 경화 후 제조된 샘플

플은 3rd 초순수에 세척과정을 거친 후 동결건조를 하여 완성하였다. 제조된 지지체의 표기는 공극크기가 미치는 영향과 collagen/ β -TCP의 영향을 확인하기 위하여 다양한 조건으로 제작하였으므로 지지체의 제작조건으로 나타내었다. 공극크기와 collagen/ β -TCP sponge의 wt%를 기준으로 300 - 0.05, 300 - 0.1, 300 - 0.5, 500 - 0.05, 500 - 0.1, 500 - 0.5, 1000 - 0.05, 1000 - 0.1, 1000 - 0.5로 나누어 표기하였다.

2.3. 제작된 하이브리드 지지체의 weight fraction 분석

제작된 하이브리드 지지체의 collagen/ β -TCP 함량은 PCL scaffold에 collagen/ β -TCP를 주입 후 동결 전 과 후의 무게를 측정하여 계산하였으며, 함량을 토대로 식1을 참조하여 하이브리드 지지체의 공극률을 분석하였다.^[13]

$$\phi = 1 - \frac{w_p/\rho_p + w_c/\rho_c + w_t/\rho_t}{v_h} \quad (1)$$

ϕ 는 하이브리드 지지체의 공극률이며, 단위는 %이다. PCL의 무게는 w_p , 밀도는 ρ_p 로 표기하였으며, 각각 collagen의 무게는 w_c , β -TCP의 무게는 w_t 로 표기하였다. 또한 v_h 는 하이브리드 지지체의 체적을 의미한다.

2.4. 제작된 하이브리드 지지체의 구조 관찰

제작된 하이브리드 지지체의 구조를 분석하기 위하여 PCL 지지체의 공극크기, collagen/ β -TCP 용액의 wt%에 따라 형성된 sponge의 형상 및 구조를 주사전자현미경 (E-1030, Hitachi)을 사용하여 관찰하였다. SEM을 통해 관찰하기 전 sputter coater (E-1030, Hitachi)로 60mA에서 2분 동안 코팅, 7nm의 백금 코팅을 하였으며, 전압 5kV 조건하에 X50, X100, X300, X500 배율로 관찰하였다.

2.5. FT-IR 측정

제작된 하이브리드 지지체에 첨가된 collagen의 경화에 따른 화학적 구조 변화를 확인하기 위하여 FT-IR (Fourier-transform infrared) (model 6700; Nicolet, West Point, PA, U.S.A.) 측정을 실시하였다. 시편은 동결건조된 collagen/ β -TCP sponge의 경화 전 후의 IR spectrum을 비교 및 관찰하였다.

2.6. 기계적 강도

제조된 지지체는 이식 될 경우 회복 부를 유지하기 위한 적당한 기계적 강도를 가져야 한다. 때문에 공극크기, collagen/ β -TCP wt%의 첨가량에 따른 하이브리드 지지체의 기계적강도의 변화를 측정하였다. 기계적 강도 측정은 인장강도 테스트로서 UTM (TopTac 2000, Chemilab)을 사용하였다. 측정조건은 2 mm/s의 속도로 인장하중을 가하였으며, 시편은 20 mm (H) x 3 mm (W) x 3 mm (T)사이즈로 제작하였다.

2.7. 제조된 하이브리드 지지체의 수분흡수율 측정

Collagen은 생체친화성 고분자인 동시에 친수성 물질로 알려져 있으며, β -TCP는 강한 친수성 특성을 가지고 있는 생체활성 세라믹으로 알려져 있다. 이에 공극률, collagen/ β -TCP wt%에 따른 하이브리드 지지체의 수분흡수율을 측정하였다.

$$WA(\%) = \frac{\omega_{2h} - \omega_0}{\omega_0} \times 100 \quad (2)$$

수분흡수율 측정방법은 X. Y. Li 의 실험방법을 참조하였다. W_0 는 제작된 하이브리드 지지체를 1cm 길이로 절단한 후의 초기 무게이며, W_{2h} 는 1cm 길이의 지지체를 물에 넣어 2h동안 수분흡수 과정을 거친 후 표면의 물기를 제거하고 수분을 흡수한 하이브리드 지지체의 무게를 측정하였다.^[14]

2.8. MTT-assay

실험에 사용된 osteoblast-like-cells (MG-63) 세포의 배지로는 MEME (ATCC)를, 10% FBS와 1% penicilin/streptiavidin를 첨가하여 사용하였으며, 제작된 하이브리드 지지체 5 x 5 mm²에 1 x 10⁵cell/50 μ l 농도의 세포를 각각 접종(seeding)하였다. 세포의 성장율은 MTT assay를 통해 1, 3, 7일차에 걸쳐 측정하였다. MTT assay는 Cell proliferation kit (Roche, Germany)를 사용하였으며, MTT labeling reagent를 통해 4h 동안 37 $^{\circ}$ C CO₂ incubator에서 formazan을 형성시킨 후 solubilization buffer를 통해 염색된 formazan을 24h 동안 용해하였다. 흡광도는 570nm에서 ELISA reader (EL800, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, U.S.A)를 사용하여 측정하였다. 또한 세포의 성장형태를 관찰하기 위해 1, 3, 7일에 걸쳐 배양한 하이브리드 지지체를 glutaldehyde 2.5 %에 24h 동안 고정한 후 SEM을 통하여 성장형태를 관찰하였다.

2.9. Bone mineralization

실험에 사용된 osteoblast-like-cells (MG-63) 세포의 배지로는 MEME (ATCC)를, 10% FBS와 1% penicilin/streptiavidin 그리고 Vitamin을 첨가하여 사용하였다. 제작된 하이브리드 지지체 5 x 5 mm²에 1 x 10⁵cell/50 μ l 농도의 세포를 각각 접종(seeding)하였다. 세포의 bone mineralization은 7, 11일차에 걸쳐 측정하였다. bone mineralization에 사용된 시약은 40mM alizarin red-s(PH 4.2)를 통하여 칼슘을 염색한 후 10mM sodium phosphate buffer + 10% cetylpyridum chloride으로 15분간 용해하

였으며, 흡광도는 562nm에서 ELISA reader (EL800, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, U.S.A)를 사용하여 측정하였다. 또한 7, 11일에 걸쳐 배양한 하이브리드 지지체를 40mM alizarin red-s를 통해 염색한 후 광학현미경(Olympus, BX51)으로 내부를 관찰하였다.

3. 결과

3.1. 하이브리드 지지체의 함량

Fig.2는 제작된 하이브리드 지지체의 모습으로서 300, 500, 1000 μm 의 공극크기를 갖는 PCL 지지체를 사용하였다. 또한 각각 collagen/ β -TCP sponge의 제작조건은 wt%를 0.05, 0.1, 0.5 wt%로 조절하여 제작하였다. collagen/ β -TCP sponge의 wt%가 0.05, 0.1, 0.5 wt%로 높아질수록 PCL 지지체의 내부 구조가 치밀해짐을 육안으로 관찰할 수 있었다. Fig.3 (a)와 Tab.1은 하이브리드 지지체 내부의 collagen과 β -TCP의 양을 측정된 결과로서 가장 적게 들어간 300-0.05의 0.07 wt%에서 많게는 1.2 wt%가 첨가된 것을 확인할 수 있었다. Pure PCL 지지체의 공극크기에 따라 함유량이 크게 변하는 것을 확인할 수 있는데, 이는 공극의 크기가 커질수록 공극률이 높아져 더 많은 collagen/ β -TCP 용액이 첨가된 것으로 보여진다. Fig.3 (b)는 하이브리드 지지체의 공극률로서 첨가된 collagen/ β -TCP wt%에 따라서 공극률은 큰 차이를 보이지 않았으며 PCL 지지체의 공극크기에 따라서 크게 변화하였다.

3.2. 하이브리드 지지체의 내부 형상 관찰

제작된 하이브리드 지지체의 collagen/ β -TCP 첨가량에 따른 collagen/ β -TCP sponge의 형성구조를 SEM을 이용하여 확인하였다. Fig.4 (a-f)는 300mm의 공극 크기를 갖는 PCL 지지체에 0.05, 0.1, 0.5 wt%의 각각 다른 collagen/ β -TCP solution을 injection한 지지체의 SEM이미지 이다. Fig.4를 통해 collagen/ β -TCP solution의 wt%가 (a-b) 0.05 wt%, (c-d) 0.1 wt%, (e-f) 0.5 wt% 으로 증가할수록 sponge의 구조가 치밀해지는 것을 확인할 수 있었다. Fig.4 (a) 0.05, (c) 0.1 wt% collagen/ β -TCP

sponge의 경우 collagen/ β -TCP sponge의 형상이 파이버에 가까운 형태를 띄고 있음이 관찰되었다. 또한 Fig.4 (b), (d), (f)은 지지체의 단면형상으로서 3차원 내부 연결 구조를 이루고 있음을 확인하였다. 한편 Fig.5, Fig.6의 하이브리드 지지체의 내부구조는 300 μ m와 비교하여 크게 변화하지 않았다. 이를 통하여 collagen/ β -TCP sponge의 형성은 PCL 지지체의 공극크기와는 관계가 없으나 collagen/ β -TCP의 wt%가 매우 중요한 요소로 작용함을 확인하였다.

3.3. 경화에 따른 collagen의 화학적 구조 확인

Fig.7은 제조된 하이브리드 지지체를 FT-IR을 통하여 분석하였다. S. Park연구팀에 의하면 콜라겐의 화학적 구조는 주로 아미드 그룹으로 이루어져있으며, EDC 경화 후의 콜라겐의 화학적 구조는 경화 전과 비교하여 구조적인 변화 없이 IR의 intensity가 감소하는 것으로 알려져 있다.^[15] 콜라겐 경화 전의 IR 그래프에서는 콜라겐의 주 아미드 그룹인 the amide I(1726 cm^{-1}), amide II (1548 and 1450 cm^{-1}), and amide III bands (1202, 1232, and 1277 cm^{-1}) 로 구성되어 있음을 확인하였다. EDC 경화 후 아미드 그룹인 amide I, amide II bands의 intensity 감소가 있었으나, 콜라겐의 다양한 function의 구조적인 큰 변화가 관찰되지 않았다. 때문에 EDC에 의한 경화가 잘 이루어진 것으로 판단된다.

3.4. 기계적 강도(mechanical property)

세포 지지체가 이식된 부위는 움직임이나 충격과 같은 여러 가지 상황에서의 인장이나 압축하중을 받게 된다. 때문에 재생하기 전까지의 이식부를 외부의 충격이나 하중으로부터 보호하기 위한 세포 지지체의 기계적 강도는 매우 중요하다.^[16-17] Fig.8 (a), (b), (c)는 각각 공극 크기 300, 500, 1000 μ m으로 제조된 하이브리드 지지체의 Stress - Strain curve로써, Fig.8 (a) 300 μ m pore로 제조된 하이브리드 지지체의 경우

collagen/ β -TCP의 첨가량의 증가로 인한 기계적 강도의 증가는 거의 미미한 것으로 나타났다. 이러한 현상은 Fig.8 (b) 500 μm , (c) 1000 μm 에서도 동일하게 나타남을 확인하였다. 하지만 Fig.8 (d)의 collagen/ β -TCP 0.5 wt%의 조건이 고정된 경우, 공극크기가 커짐에 따라 지지체의 Young's modulus가 각각 14.7 ± 0.5 , 12.8 ± 1.0 , 9.7 ± 2.1 μm 으로 낮아지는 현상을 확인하였다. 일반적으로 세포 지지체의 공극률과 기계적 강도는 반비례 관계를 가지고 있는 것으로 알려져 있다.^[18] Fig.9는 collagen/ β -TCP 0.5wt%에서의 공극크기별 기계적 강도와 공극률을 비교분석한 그래프로써 하이브리드 지지체의 공극률과 Young's modulus가 반비례함을 확인할 수 있었다.

3.5. 하이브리드 지지체의 수분흡수율

일반적으로 세포담체의 높은 수분흡수율은 세포담체의 세포 초기 부착률 및 성장을 향상시켜주는 것으로 알려져 있다.^[14] Fig.10은 공극크기, collagen/ β -TCP wt% 별로 제조된 하이브리드 지지체의 수분흡수성의 변화를 확인한 결과이다. 같은 공극크기로 제작된 실험군의 경우 collagen/ β -TCP의 첨가량이 증가할수록 지지체의 수분흡수성이 증가하였는데, 이는 collagen과 β -TCP의 강한 친수성 특성에 기인된 것으로 보인다. 또한 collagen/ β -TCP의 첨가량이 동일한 경우 공극의 크기가 증가함에 따라 세포 지지체의 수분흡수성이 증가함을 확인하였다. 이러한 이유는 공극의 크기 변화에 따른 높은 공극률과 collagen의 weight fraction이 증가하여 수분흡수성의 증가로 나타나는 것으로 사료된다.

3.6. *In vitro* test of MG-63 cells

제조된 하이브리드 지지체의 *In vitro* test는 osteoblast-like-cells (MG-63)를 접종하고 MTT assay test를 1, 3, 7일차에 걸쳐 세포 증식률을 측정하였다. 1일차에는 지지체, plate의 세포의 부착을 비교하고 세포의 초기부착효율을 측정하였으며, 1, 3, 7일

차에는 MTT assay를 통하여 MG-63 세포의 증식률을 확인하였다. 일반적으로 osteoblast 계열의 cell은 350 μm 정도의 공극크기를 요구하는 것으로 알려져 있으며, 지지체는 이러한 최적의 공극을 만족시키는 것이 중요하다.^[19] hybrid scaffold의 경우에는 collagen/ β -TCP sponge가 함유됨에 따라 요구되는 공극의 크기에 변화가 있을 것으로 예상되었다. Fig.11 (a), (b)는 내부의 collagen/ β -TCP sponge wt%를 0.1 wt%로 고정하고 공극의 크기를 300, 500, 1000 μm 으로 조절한 실험군의 결과이다. Fig. 11 (a)는 MTT assay 1일차의 결과로서 공극의 크기가 커질수록 높은 초기 부착력을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 이유는 높은 수분흡수성을 가지고 있어 세포의 초기 부착률이 증가된 것으로 보여진다. Fig.11 (b)는 MTT assay 1, 3, 7일까지의 결과로서 공극크기가 클수록 세포의 증식률이 향상된 것을 볼 수 있다. 또한 Fig. 12는 7일 동안 증식시킨 하이브리드 지지체의 내부구조로서 균일하게 증식하고 있음을 확인할 수 있다. 제작된 하이브리드 지지체는 PCL 지지체의 공극크기가 300, 500, 1000 μm 으로 제작되었으나 collagen/ β -TCP sponge로 인하여 osteoblast 세포가 요구하는 공극크기에 비하여 매우 작은 공극을 이루고 있다. 하지만 세포의 증식에는 긍정적인 영향을 보였으며, 이는 collagen/ β -TCP sponge가 성장을 저해하는 공극으로 인식되지 않는 것을 의미한다. 또한 이러한 지지체의 미세구조는 세포의 이동이나 물질교환에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.^[20] Fig. 13 (a), (b)는 공극크기를 1000 μm 으로 고정하고 collagen/ β -TCP solution의 wt%를 0.05, 0.1, 0.5 wt%로 조절한 실험군의 MTT assay 결과이다. Fig.13 (a)는 지지체와 plate의 MG-63 세포의 양을 비교한 것으로서 collagen/ β -TCP solution의 wt%가 증가할수록 세포의 초기부착효율도 증가함을 확인하였다. 이러한 이유는 collagen/ β -TCP solution의 함유량이 증가함에 따라 증가한 높은 수분흡수성에 기인된 것으로 보인다. Fig.13 (b)는 collagen/ β -TCP의 sponge의 제작조건에 따른 1, 3, 7일차 MTT assay 결과이며, Fig. 14은 7일차의 하이브리드 지지체의 내부 관찰 결과로서, collagen/ β -TCP의 wt%가 증가할수록 MG-63 세포의 증식이 증가하였으며, 균일한 증식을 확인하였다. 이러한 결과는 세포의 성장에 도움을 주는 collagen의 weight fraction이 증가함에 따라 세포의 증식도 증가한 것으로

로 판단된다.

3.7. Bone mineralization test of MG-63 cells

Fig.15, Fig.16은 제조된 하이브리드 지지체의 bone mineralization 결과로서 osteoblast-like-cells (MG-63)를 접종하고 7, 14일차에 걸쳐 세포의 골분화도를 측정하였다. Fig.15 (a)는 collagen/ β -TCP 0.1wt% 제작조건에서의 PCL 지지체의 공극의 크기변화에 따른 골분화도를 측정한 결과로 PCL지지체 공극의 크기가 커질수록 골분화도가 높아지는 것을 확인할 수 있었다. 또한 Fig.15 (b)는 14일동안 증식시킨 하이브리드 지지체를 40mM alizarin red-s로 염색한 결과로서 Fig.15 (c, d)를 통해 분화된 골조직이 염색되어 있는 것을 확인할 수 있으며 전체적으로 균일하게 분포되어 있음을 확인할 수 있다. 또한 Fig. 15 (c)의 pure PCL 지지체에 비하여 Fig. 15 (d)의 1000 μ m 하이브리드 지지체의 분화된 골조직의 개체수가 확연히 증가함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 PCL 지지체의 공극이 증가함에 따라 collagen/ β -TCP의 실제적 함량이 증가함에 기인된 것으로 보여진다. 일반적으로 β -TCP나 hydroxyapatite(HA)와 같은 바이오세라믹은 조골세포의 골분화를 유도하는 것으로 알려져 있다. Fig.16 (a)는 1000 μ m인 PCL 지지체에 collagen/ β -TCP sponge의 제작조건에 따른 골분화도를 측정한 결과로서, collagen/ β -TCP의 wt%가 0.05, 0.1, 0.5로 증가할수록 골분화도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. Fig.16 (b)는 14동안 증식 후의 하이브리드 지지체의 모습으로서 결과로서 40mM alizarin red-s에 의해 분화된 골 조직이 염색되어 있는 것을 확인할 수 있으며, Fig. 16 (c) pure PCL에 비하여 Fig. 16 (d) 0.5wt% 하이브리드 지지체의 분화된 골세포가 크게 증가함을 육안으로 확인할 수 있었다. 이러한 이유를 통하여 collagen/ β -TCP의 wt%가 증가할수록 분화된 골 조직이 증가하는 것을 육안으로 확인할 수 있었다. 이러한 이유는 하이브리드 지지체 내에 세포의 골분화도에 영향을 미치는 β -TCP의 실제적 함량이 증가하였기 때문으로 분석된다.

4. 결론

본 연구에서는 조골세포 재생을 목적으로 하는 하이브리드 지지체를 제작하였다. 3차원 쾌속조형기술을 통한 PCL 지지체를 제작하고 대표적인 골 유도물질 중 하나인 콜라겐과 β -TCP을 주입하여 생체모사형 인공골 지지체를 제작하였다. PCL 지지체의 공극이 증가할수록 기계적 강도는 감소하는 현상을 보였으나 수분흡수율, 세포의 증식, 골분화능력이 향상되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 collagen/ β -TCP의 wt%가 증가할수록 수분흡수성, 세포의 증식, 골분화도가 증가하는 현상을 확인할 수 있었다. 또한 내부 구조를 관찰한 결과 세포의 증식 및 분화가 지지체에 균일하게 이루어 졌음을 확인하였으며, 이를 통하여 tube형 골 재생 세포담체로 적용할 수 있음을 확인하였다.

5. 참고문헌

1. D. Yixiang, T. Yong, S. Liao, C. K. Chan, S. Ramakrishna, Degradation of Electrospun Nanofiber Scaffold by Short Wave Length Ultraviolet Radiation Treatment and Its Potential Applications in Tissue Engineering. *TISSUE ENGINEERING: Part A*, 14, 8, 2008.
2. T. A. E. Ahmed, E. V. Dare, M. Hincke, Fibrin: A Versatile Scaffold for Tissue Engineering Applications. *TISSUE ENGINEERING: Part B*, 14, 2, 2008.
3. X. Hu, H. Shen, F. Yang, J. Bei, S. Wang, Preparation and cell affinity of microtubular orientation-structured PLGA(70/30) blood vessel scaffold. *Biomaterials* 29 (2008) 3128 - 3136.
4. T. Kofidis, P. Akhyari, B. Wachsmann, K. Mueller-stahl, J. Boublik, A. Ruhparwar, H. Mertsching, L. Balsam, R. Robbins, A. Haverich, Clinically Established Hemostatic Scaffold (Tissue Fleece) as Biomatrix in Tissue- and Organ-Engineering Research. *TISSUE ENGINEERING*, 9, 3, 2003.
5. F. Tian, H. Hosseinkhani, M. Hosseinkhani, A. Khademhosseini, Y. Yokoyama, G. G. Estrada, H. Kobayashi, Quantitative analysis of cell adhesion on aligned micro- and nanofibers. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 84A, 2, 291 - 299, 2008.
6. J. Y. Kim, E. K. Park, S. Y. Kim, J. W. Shin, D. W. Cho, Fabrication of a SFF-based three-dimensional scaffold using a precision deposition system in tissue engineering. *Journal of micromechanics and microengineering*, 18, 7, 2008.
7. J. J. Yoon, T. G. Park, Degradation behaviors of biodegradable macroporous scaffolds prepared by gas foaming of effervescent salts. *Journal of Biomedical Materials Research*, 55, 3, 401 - 408, 2001.
8. A. J. Beattie, T. W. Gilbert, J. P. Guyot, A. J. Yates, S. F. Badylak, Chemoattraction of Progenitor Cells by Remodeling Extracellular Matrix Scaffolds. *TISSUE ENGINEERING: Part A*, 15, 5, 2009.

9. R. G. J. C. Heijkants, T. G. V. Tienen, J. H. D. Groot, A. J. Pennings, P. Buma, R. P. H. Veth, A. J. Schouten, Preparation of a polyurethane scaffold for tissue engineering made by a combination of salt leaching and freeze-drying of dioxane. *Journal of materials science*, 41, 8, 2423-2428, 2006.
10. Q. Zhou, Y. Gong, C. Gao, Microstructure and Mechanical Properties of Poly(L-lactide) Scaffolds Fabricated by Gelatin Particle Leaching Method. *Journal of Applied Polymer Science*, 98, 3, 1373 - 1379, 2005.
11. L. Ma , C. Gao , Z. Mao , J. Zhou, J. Shen, X. Hu, C. Han, Collagen/ chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials*, 24, 4833 - 4841, 2003.
12. A. S. Lin, T. H. Barrows, S. H. Cartmell, R. E. Guldberg, Microarchitectural and mechanical characterization of oriented porous polymer scaffolds. *Biomaterials*, 24, 3, 481 - 489, 1993.
13. M. G. Yeo, H. Lee, G. Kim, Three-Dimensional Hierarchical Composite Scaffolds Consisting of Polycaprolactone, β -Tricalcium Phosphate, and Collagen Nanofibers: Fabrication, Physical Properties, and In Vitro Cell Activity for Bone Tissue Regeneration. *Biomacromolecules*, 12, 2, 502 - 510, 2011.
14. X. Y. Li, X. Y. Kong, S. Shi, Y. C. Gu, L. Yang, G. Guo, F. Luo, X. Zhao, Y. Q. Wei, Z. Y. Qian, Biodegradable MPEG-g-Chitosan and methoxy poly(ethylene glycol)-b-poly(ϵ -caprolactone) composite films: Part 1. Preparation and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 79, 429 - 436, 2010.
15. S. N. Park, J. C. Park, H. O. Kim, M. J. Song, H. Suh, Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide cross-linking. *Biomaterials*, 23, 1205 - 1212, 2002.
16. X. H. Wang , D. P. Li , W. J. Wang , Q. L. Feng , F. Z. Cui , Y. X. Xu , X. H. Song, M. V. D. Werf, Crosslinked collagen/chitosan matrix for artificial livers. *Biomaterials*, 24, 3213, 2003.

17. D. W. Hutmacher, Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21, 2529, 2000.
18. Z. Fang, B. Starly, W. Sun, Computer-aided characterization for effective mechanical properties of porous tissue scaffolds. *Computer-Aided Design*, 37, 65 - 72, 2005.
19. J. W. Lee, G. Ahn, J. Y. Kim, D. W. Cho, Evaluating cell proliferation based on internal pore size and 3D scaffold architecture fabricated using solid freeform fabrication technology. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21, 3195 - 3205, 2010.
20. M. Mastrogiacomo, S. Scaglione, R. Martinetti, Laura Dolcini, F. Beltrame, Ranieri Cancedda, Rodolfo Quarto, Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials*, 27, 3230 - 3237, 2006.

Table 1. Weight fractions of hybrid scaffold.

weight fraction (%)	0.05 wt%	0.1 wt%	0.5 wt%
300 μm	0.07 ± 0.002	0.14 ± 0.004	0.71 ± 0.02
500 μm	0.1 ± 0.003	0.2 ± 0.007	1.0 ± 0.03
1000 μm	0.15 ± 0.009	0.3 ± 0.018	1.5 ± 0.09

Table 2. Comparison of Young's modulus between various hybrid scaffold.

	300 μ m	500 μ m	1000 μ m
Young's modulus (MPa)	14.7 \pm 0.5	12.8 \pm 1.0	9.7 \pm 2.1
Ultimate stress (MPa)	4.9 \pm 0.1	3.6 \pm 0.2	1.8 \pm 0.9
Break strain (%)	278.4 \pm 87.9	200.1 \pm 41.8	152.4 \pm 79.34

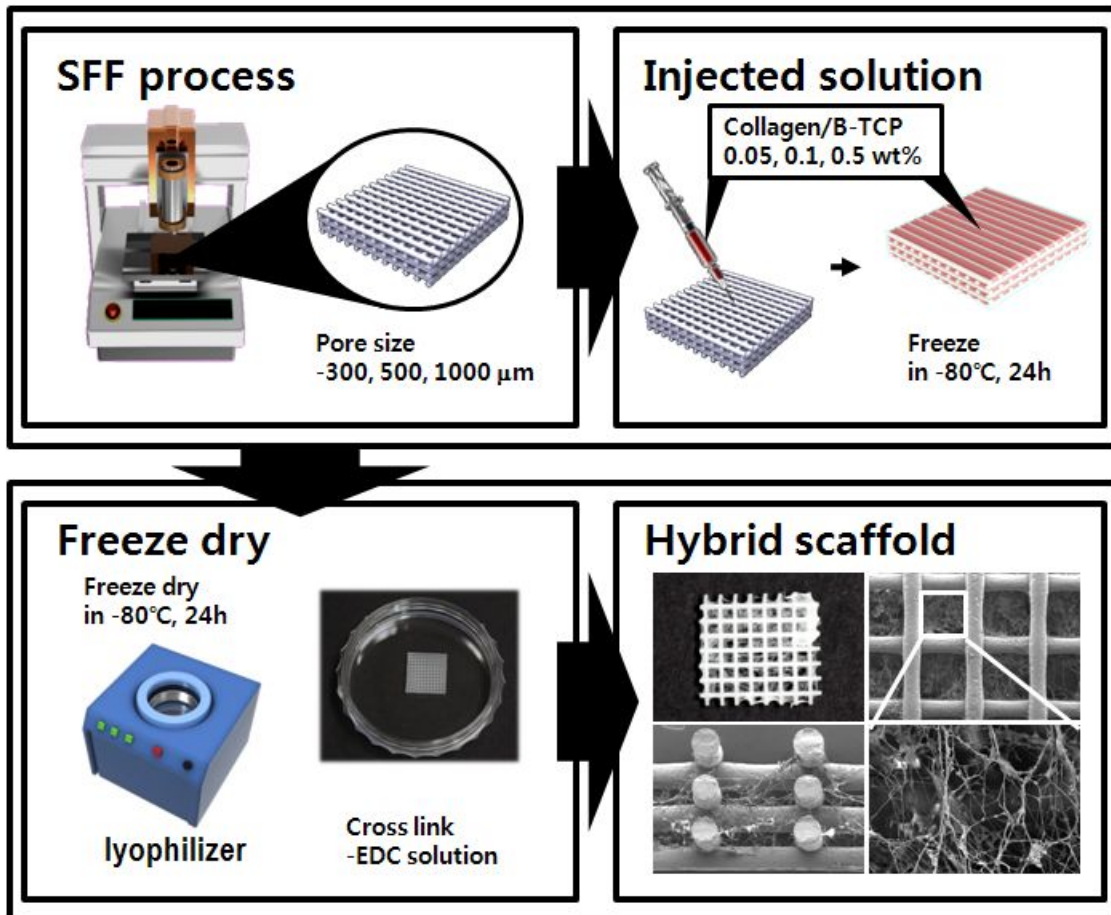


Figure 1. Schematic of fabrication process for hybrid scaffold.

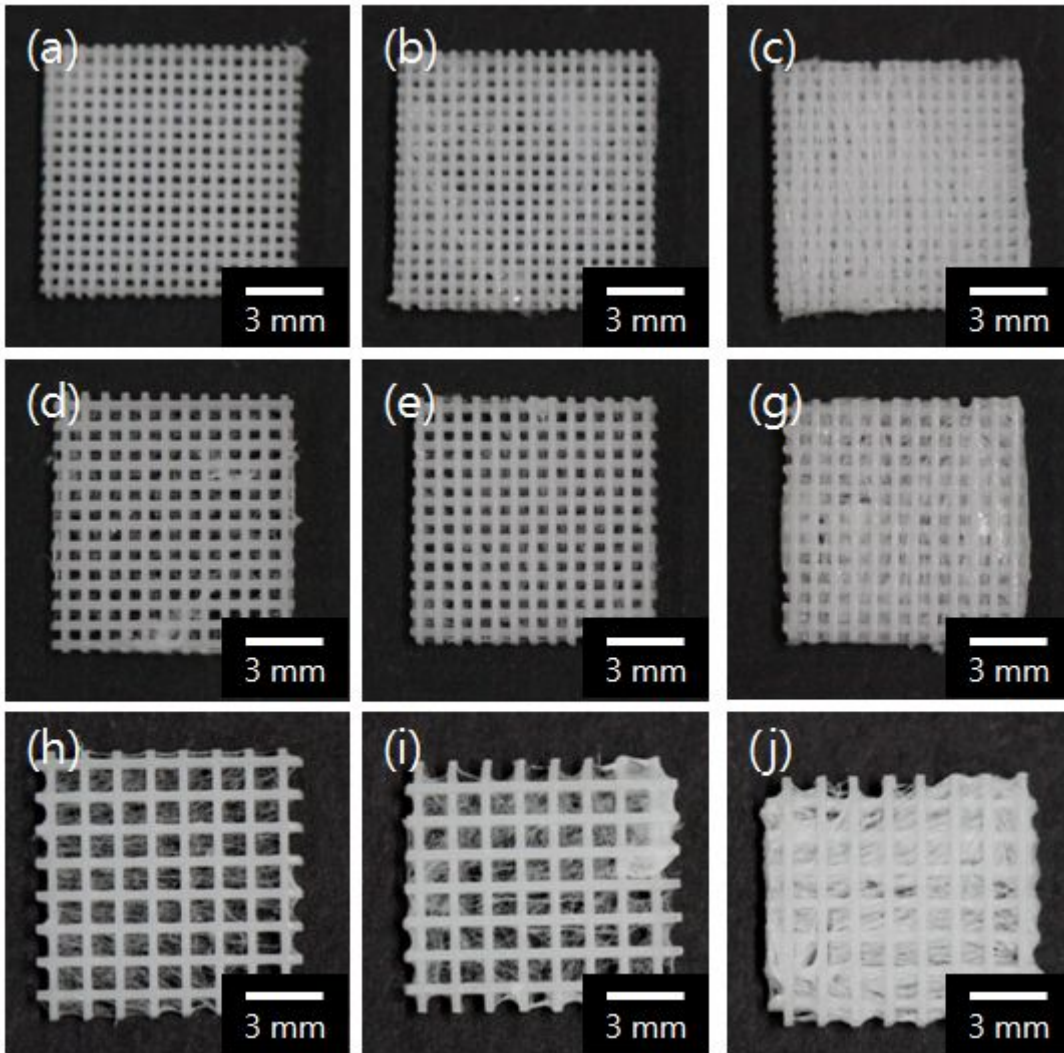


Figure 2. Fabricated scaffolds with various pore size and weight fraction of collagen.

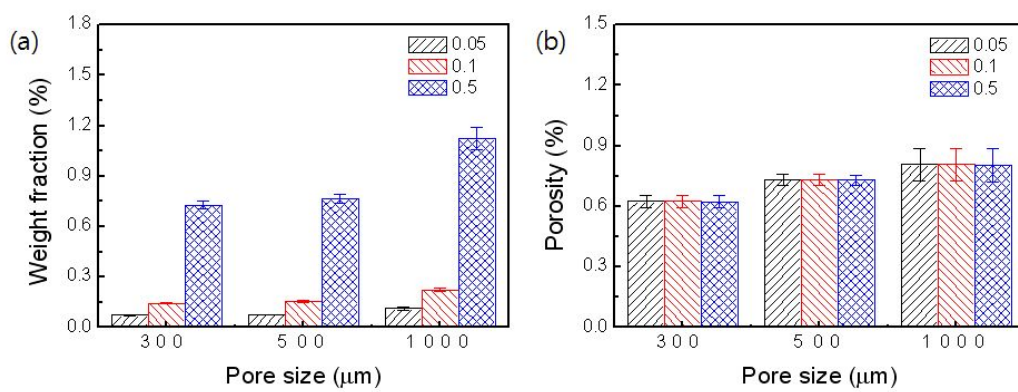


Figure 3. (a) weight fraction of collagen and β -TCP in hybrid scaffolds. (b) Porosity of hybrid scaffold.

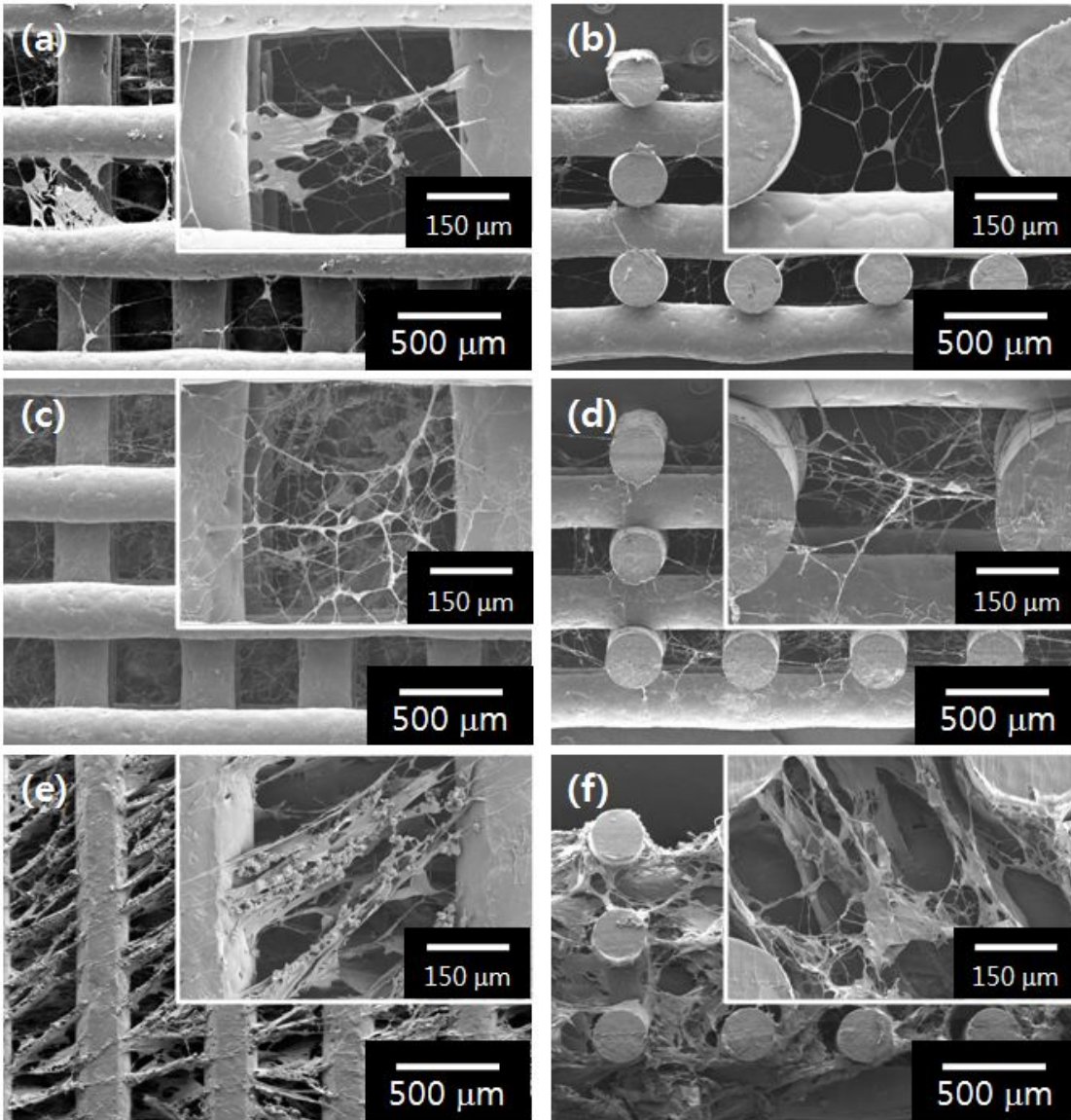


Figure 4. SEM images of hybrid scaffold with a pore size, $300\mu\text{m}$. (a, c, e) surface image, (b, d, f) cross-sectional images.

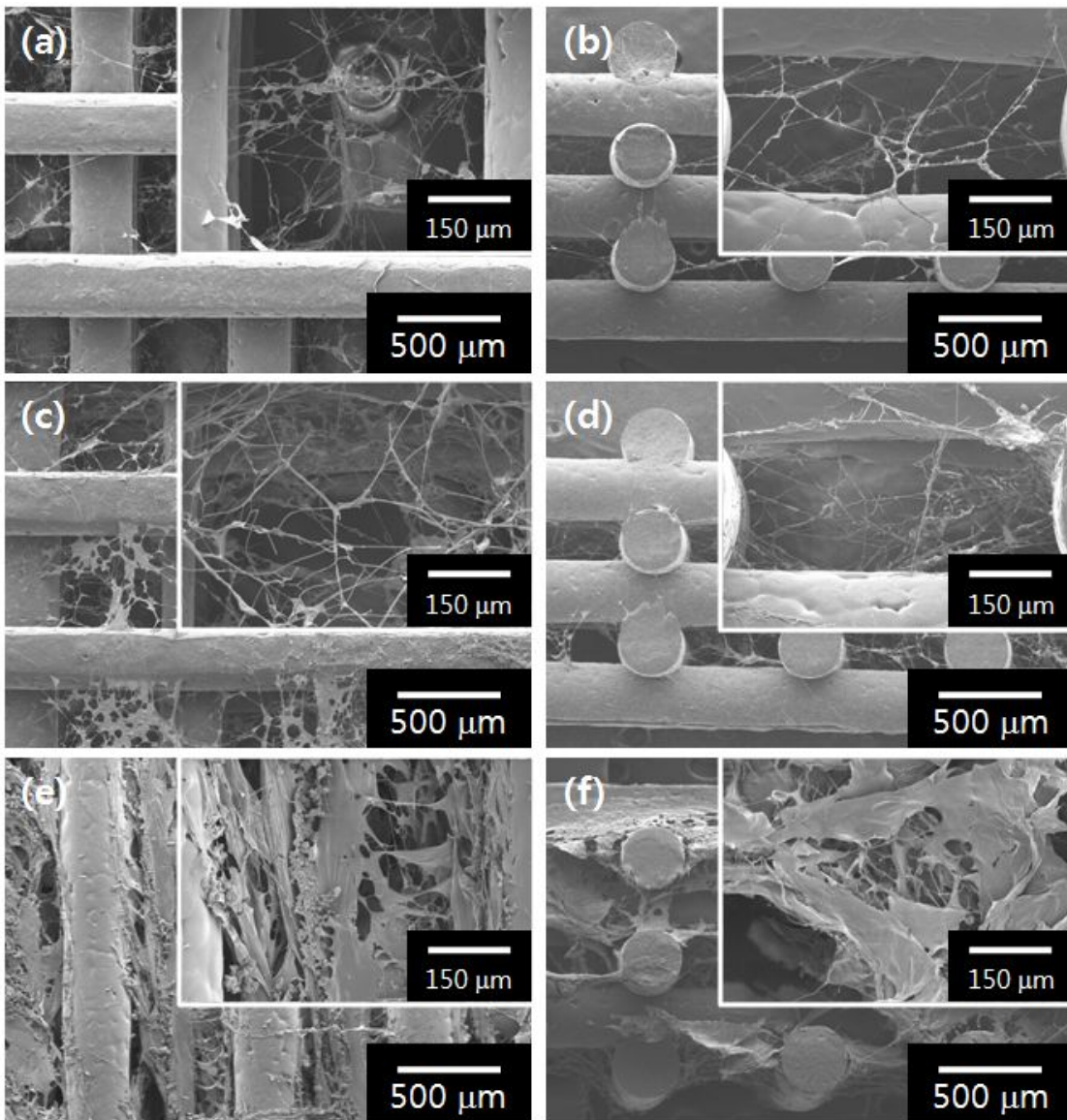


Figure 5. SEM images of hybrid scaffold with a pore size, $500\mu\text{m}$. (a, c, e) surface image, (b, d, f) cross-sectional images.

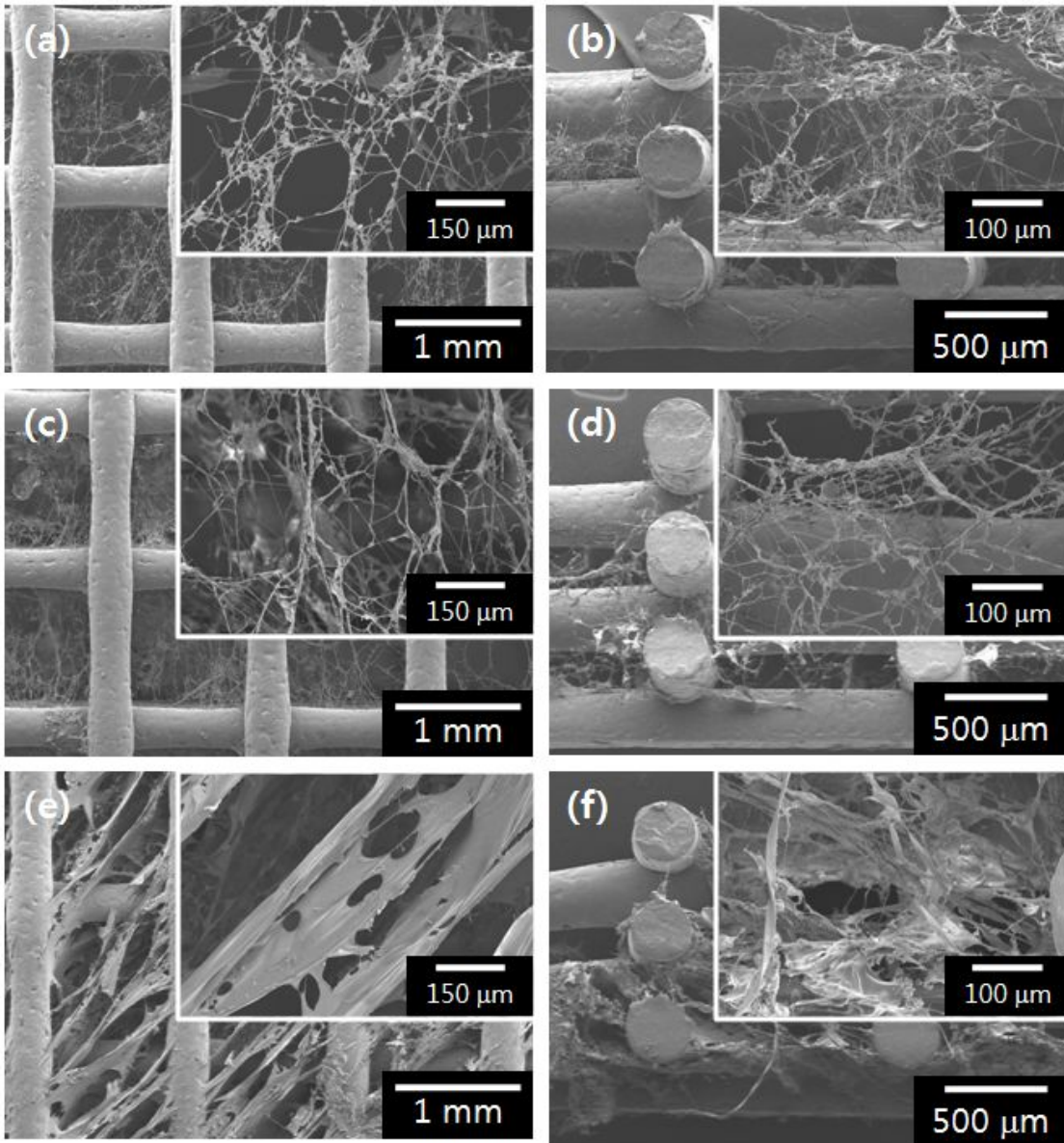


Figure 6. SEM images of hybrid scaffold with a pore size, $1000\mu\text{m}$. (a, c, e) surface image, (b, d, f) cross-sectional images.

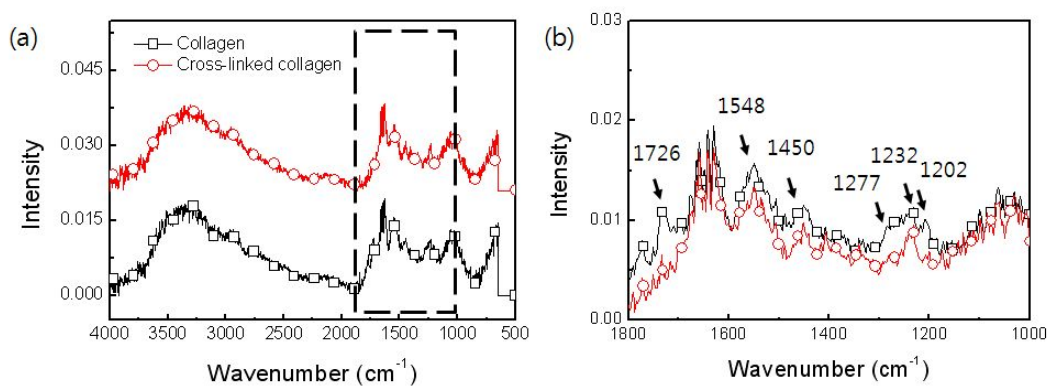


Figure 7. FTIR spectra of collagen sponge of the hybrid scaffold before and after cross-linking with EDC solution.

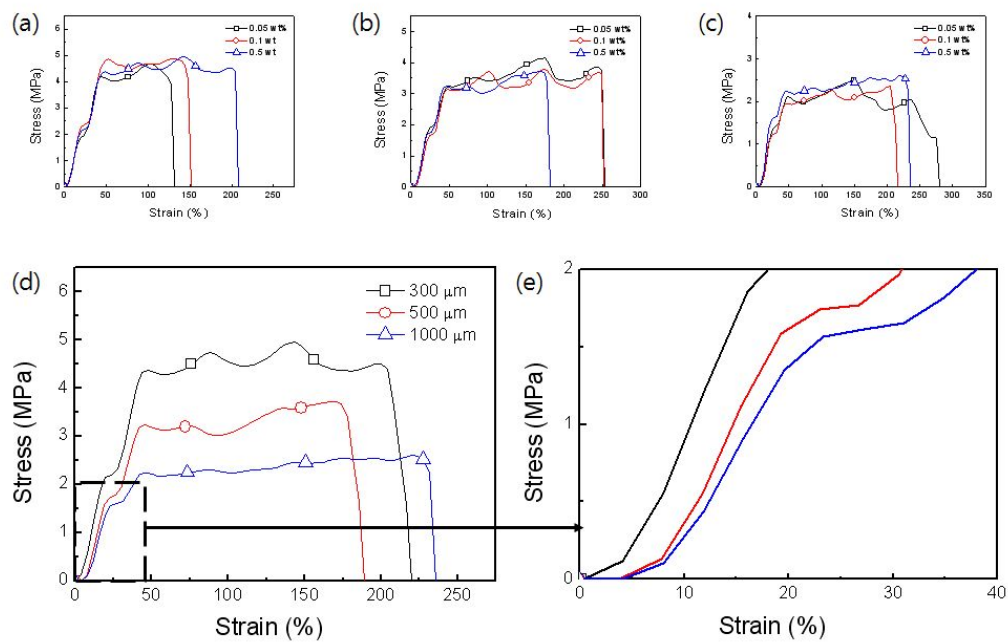


Figure 8. Stress - Strain curves of hybrid scaffold. (a) $300\mu m$, (b) $500\mu m$, (c) $1000\mu m$, (d) 0.5 wt% collagen/ β -TCP.

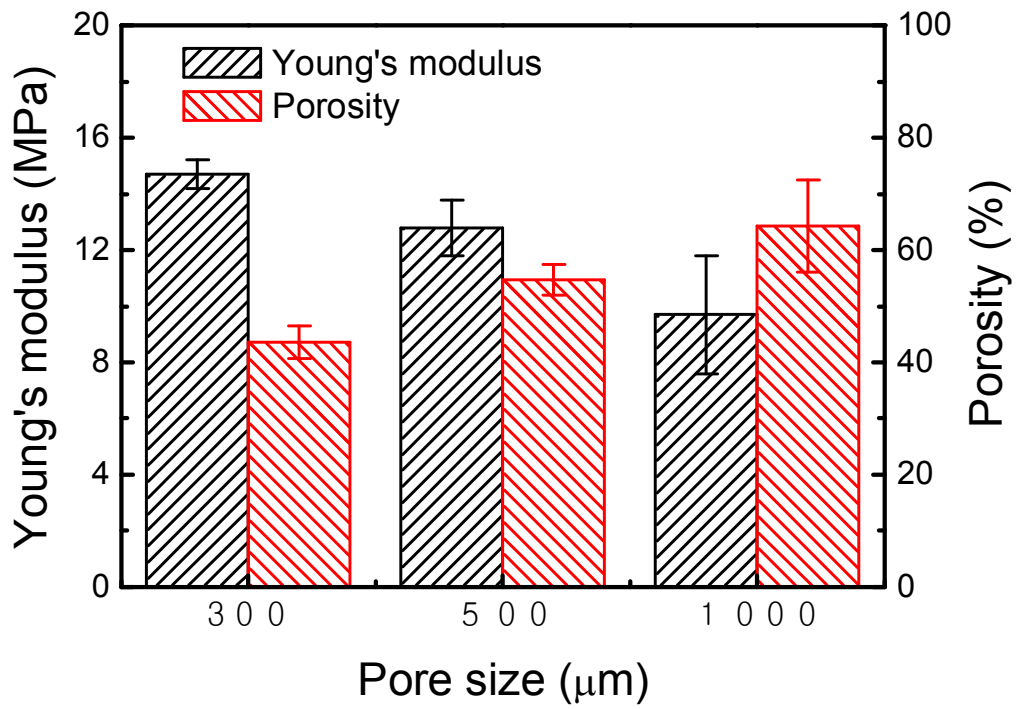


Figure 9. Comparison of hybrid scaffolds between Young's modulus and porosity.

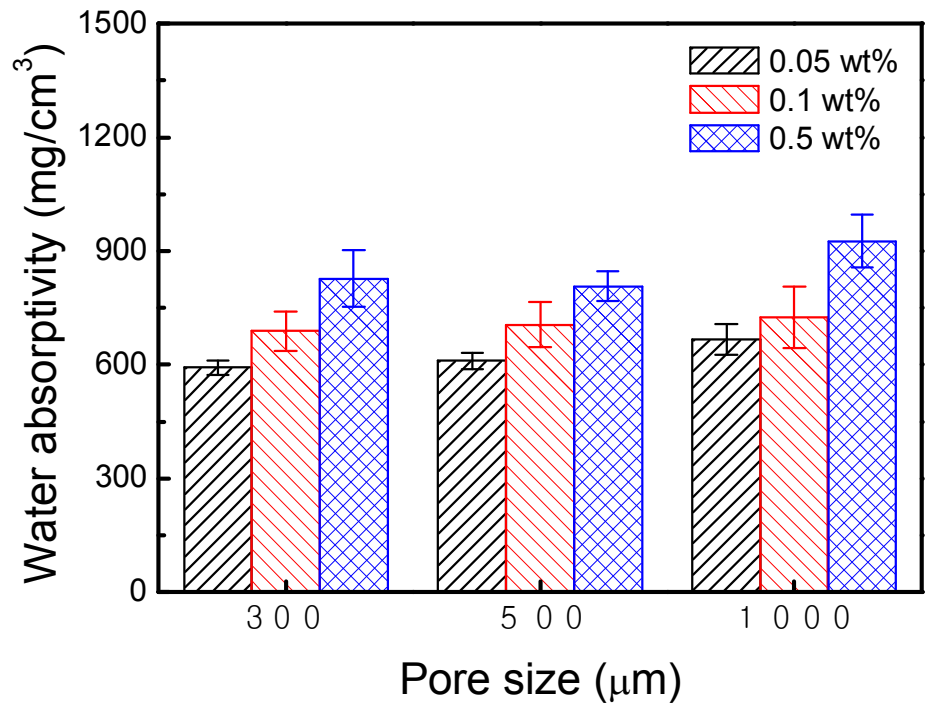


Figure 10. Water absorption of hybrid scaffolds.

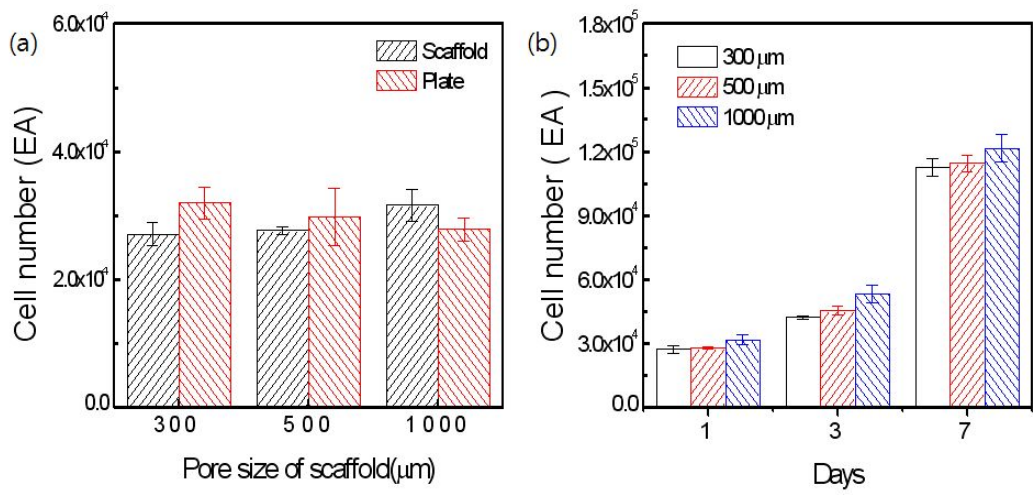


Figure 11. (a) Initial cell attachment results of MG63 cell. (b) Cell proliferation as indicated by the MTT assay of MG63 cells seeded on various hybrid scaffolds(different pore size).

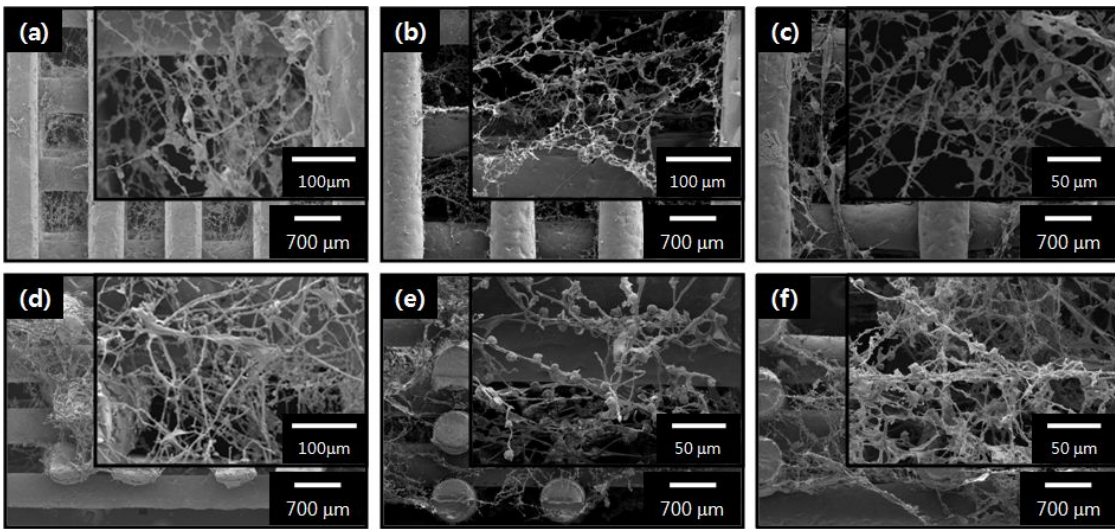


Figure 12. SEM micrographs of MG63 cells cultured on the hybrid scaffolds(different pore size). (a, d) 300 μm , (b, e) 500 μm , (c, f) 1000 μm .

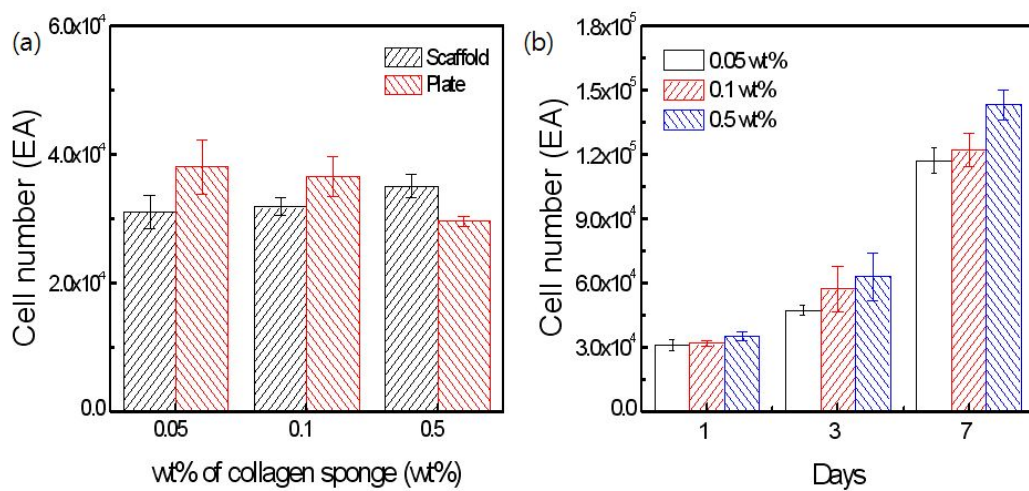


Figure 13. (a) Initial cell attachment results of MG63 cells. (b) Cell proliferation as indicated by the MTT assay of MG63 cells seeded on various hybrid scaffolds (different weight fractions of collagen).

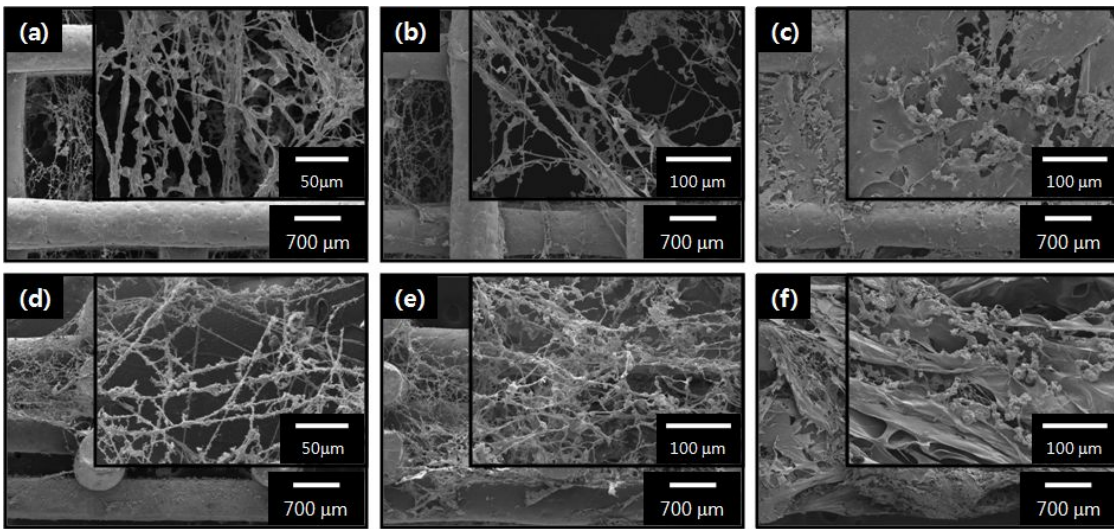


Figure 14. SEM micrographs of MG63 cells cultured on the hybrid scaffolds(different weight fractions of collagen). (a, d) 0.05 wt%, (b, e) 0.1 wt%, (c, f) 0.5 wt%.

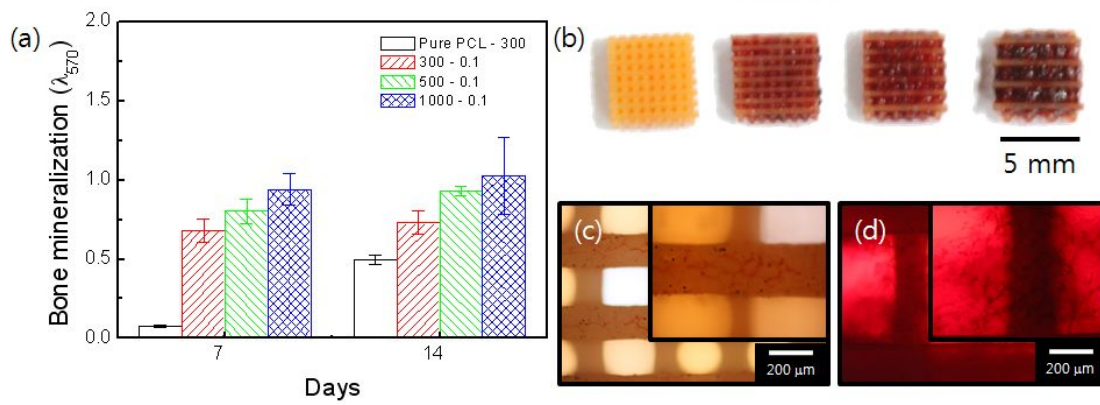


Figure 15. (a) Calcium mineralization for the scaffolds from 7 to 14days.(different pore size). (b) Optical image of ARS-staining indicating mineralization for the hybrid scaffolds. Optical micrographs of ARS-staining indicating mineralization for the pure PCL and hybrid scaffold after 14 days.

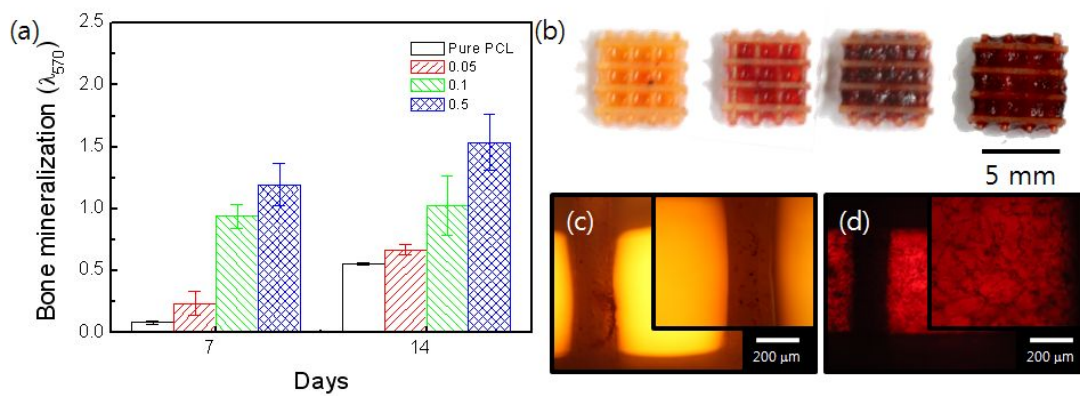


Figure 16. (a) Calcium mineralization for the scaffolds from 7 to 14days.(different weight fraction of collagen). (b) Optical image of ARS-staining indicating mineralization for the hybrid scaffolds. (c-d) Optical micrographs of ARS-staining indicating mineralization for the pure PCL and hybrid scaffold after 14 days.