



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](#)

플라즈마/쾌속조형공정을 통한 조골세포 재생용 PCL/ β -TCP 세포담체에 대한 연구

Three-dimensional composite scaffolds consisting of polycaprolactone and β -tricalcium phosphate by using a plasma/rapid-prototyping process

2012년 2월 25일

조선대학교 대학원

기계공학과

여 명 구

플라즈마/쾌속조형공정을 통한 조골세포 재생용 PCL/ β -TCP 세포담체에 대한 연구

지도교수 김 근 형

이 논문을 기계공학 석사학위신청 논문으로 제출함

2012년 10월

조선대학교 대학원

기계공학과

여 명 구

여명구의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교 수 박길문 (인)

위 원 조선대학교 교 수 이행남 (인)

위 원 조선대학교 조교수 김근형 (인)

2012년 11월

조선대학교 대학원

목 차

제 1 장 서론

- 1. 연구의 배경 ----- 1
- 2. 연구의 목적 ----- 3

제 2 장 조직공학의 이해

- 1. 조직공학과 세포 지지체 ----- 4
- 2. 세포담체 패턴에 따른 세포의 거동 ----- 8
- 3. 다양한 패턴의 세포담체 제작 방법 -----11
- 4. 참고문헌 -----14

제 3 장 골조직 재생을 위한 생체적합성 세포담체 제작과 이에 따른 조골세포의 영향

- 1. 서론 ----- 49
- 2. 실험 ----- 52
- 3. 결과 ----- 56
- 4. 결론 ----- 60
- 5. 참고문헌 ----- 61

제1장 서론

제1절 연구의 배경

현대 사회에서 생체조직 재생은 질병과 사고의 증가와 함께 고령화 시대에 삶의 질 향상을 위해 병들거나 훼손된 장기를 복원하려 하는 재생의학의 중요성, 필요성과 함께 미래 산업으로서의 시장성과 경제성은 전 세계적으로 부각되고 있다. 식생활 및 주거환경의 개선으로 국민 평균 수명이 연장되어 전 세계적으로 노령 인구가 증가하는 추세이다. 21세기에 접어들면서 이들 환자 수는 더욱 증가할 것이고, 그에 대한 대책이 필요한 상황이다. 이러한 문제의 근본적인 해결책으로 기대되고 있는 의료 요법은 손상된 장거나 조직을 대체, 보완하는 조직공학 및 인공장기 분야에 대한 연구는 더욱 활발해 질것이다.

조직공학 (Tissue Engineering)이란 세포에서부터 인공장기에 이르는 재생의료의 영역으로, 조직이나 기관의 복원을 도울 수 있는 생체물질에서 재료로 이르는 생물학적, 공학적인 기술을 다루는 학문을 기반으로 미래의 생명과학과 의료분야의 중요한 기술이다.¹⁻³ 생체 조직의 구조와 기능의 상관관계를 이해하고, 나아가서 생체 대응품을 만들어 이식함으로써 우리 몸의 기능을 복원, 유지, 향상 하는 것을 목적을 달성하기 위한 다양한 방법이 연구되고 있다.

생체 조직은 시시각각 변화하는 생체 상황에 적절하게 대응할 수 있도록 정밀하게 제어된 고차원적인 기능을 유지하기 때문에 인공 재료에만 주로 의존한 기존의 인공장기로서는 생체 조직을 효과적으로 대체 보완할 수 없는 실정이다. 지금도 매년 수백만의 환자가 손상된 조직이나 장기의 치료를 목적으로 건강한 장거나 조직의 이식을 위한 외과적 수술을 받고 있다. 그러나 장기이식은 장기 제공자 수가 심각하게 부족한

상황이며 따라서 공급의 한계성을 극복하기 힘들다. 그로 인해 현대 사회는 인공장기의 개발이 절실히 요구되는 상황이다.

장기 또는 조직의 회복 및 재생을 유도하기 위해 제작된 세포담체는 내/외부의 구조에 파종 (seeding) 된 세포 부착, 분화 및 조직 주변으로부터 유입되는 세포의 증식과 분화에 적합한 환경을 제공해야 한다.⁴⁻⁶ 요구되는 물리·화학적 성질로는 세포를 지지하고 전달할 수 있는 3차원 구조와 물리적 성질을 가져야 한다. 또한 생체적합성과 생분해성의 특성 및 적절한 가공성을 가져야 한다.⁶⁻⁹

본 연구에서의 쾌속조형 (RP, rapid prototype) 공정은 생체기관/조직의 이식에 필요한 조직공학 및 세포담체의 제작에 쓰이는 시스템을 말하여, 이를 통하여 현재 사용되고 있는 비생체 이식기관/조직을 대체할 수 있는 최적의 세포담체 제작이 가능 할 뿐 아니라, 환자의 생체조직으로 만들어진 생체기관/조직을 이식하는데도 이용될 수 있을 것이다.

제2절 연구의 목적

본 연구의 목적인 골 조직 재생을 위한 대체물로서의 역할을 수행 하는 인공뼈의 경우에는 이식되는 부위에 따라 요구되는 물리적 성질이 다르며, 다른 인공장기에 비해 높은 기계적 물성이 요구된다. 금속, 생체 세라믹 재료에 비해서 고분자 재료는 낮은 기계적 물성을 갖지만, 이들을 합성 및 가공하여 물리화학적 성질을 조절 할 수 있는 RP 방식을 이용하여 골 조직 재생을 위한 세포담체 제작이 진행되고 있다.¹⁰⁻¹⁴

세포담체의 주 소재로서 합성 고분자 재료중 하나인 PCL은 구조적 성분으로서 메틸기를 갖기 때문에 소수성 (hydrophobic) 특성을 갖는다. 이는 소수성의 재료로 제작된 세포담체는 배지 (media) 와의 젖음성을 포함하여 세포의 초기 부착 등의 어려움이 있다. 세포담체 소재의 친수성과 소수성의 특성은 세포의 초기 부착을 위한 중요한 요소중의 하나이며, 초기 부착의 성공적인 여부에 따라 세포담체의 생체조직 내 이식에 따른 조직재생에 영향을 미친다. 골조직 세포 초기 접착률 및 재생, 증식, 분화 등을 높이기 위해 제작된 세포담체에 플라즈마를 처리하여 친수성을 높여 세포 부착에 유리한 표면 구조로 개질을 하고자 한다.

골조직 재생을 위한 생체 세라믹 소재는 결정상의 변화에 따라 흡수특성을 제어할 수 있고, 뼈와 치아의 무기질과 같은 조성을 만들 수 있어 구조적 안정성이 수반되며, 인체 내에서 인체의 구성 이온으로 흡수 될 수 있다는 장점으로 그 어떤 재료보다 인체 친화력과 활성이 뛰어나다. 하지만, 압축력은 강하지만 인장력에는 약한 세라믹스의 취성 때문에 문제가 되었다. 따라서 본 연구를 통해 높은 기계적 강도와 조직간 친화력의 향상을 위해 생분해성 및 생체적합성 합성 고분자인 Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) 과 생체세라믹스인 β -TCP (β -tricalcium phosphate) 를 이용하여 면역거부반응을 최소화 시키고 낮은 기계적 강도를 극복하여 이식 부위에 적절한 최적화된 세포담체를 제작하고자 한다.

본 연구를 통해 제작된 세포담체는 우수한 생체적합성을 갖는 재료를 이용하여, 골 조직 세포의 성장을 유도하며 인체의 골 조직의 성분 및 구조가 동일하여 뼈나 피부속의 이식물이 주변의 생체 조직과 안정적으로 융합되도록 하는데 있다. 또한, 골 조직 대체물로서의 역할 수행을 위한 적절한 기계적강도와 골 조직 세포 재생에 도움을 주는 바이오세라믹스와 혼합하여 세포담체의 물리적 특성 및 세포의 성장성을 높이고자 한다.

제2장 조직공학의 이해

제1절 조직공학과 세포담체

현대 사회에서 생체조직 재생은 사고, 질병 및 고령화 사회로의 진입 등으로 인해 생체조직을 효과적으로 대체하거나 이식할 수 있는 기술 개발이 요구되고 있으며 인체 조직과 기관을 복원하려는 조직재생의 중요성, 필요성은 전 세계적으로 크게 부각되고 있다. 생명 과학 및 의학, 공학 등의 기본 개념과 기술을 융합하여 생체 조직의 구조와 기능 사이의 상관관계를 이해하여 생체 조직을 재생하기 위한 인공장기 및 세포담체 분야의 연구들이 활발히 진행되고 있다.

세포담체는 재생의학의 3대 요소 중 하나로서 세포 (cell)와 성장인자 (growth factor) 와 함께 중요 구성요소로 정의된다. 이러한 조직의 회복 및 재생을 유도하기 위해 제작된 세포담체는 세포의 부착, 분화, 성장 및 세포 이동에 유리한 조건이 필수적이다. 또한, 이식 부분과의 거부반응이 없어야 하며, 적절한 기계적강도, 생체 적합성 및 생분해성, 다공성 등의 조직재생에 적절한 환경을 제공해야 한다. 세포담체의 다양한 특성은 세포의 부착, 증식, 분화 등에 영향을 미치며 조직의 복원에 밀접한 관계가 있으므로 반드시 고려되어야 한다.

세포담체 제작을 위한 재료로서, 주로 사용되는 고분자 소재로서 천연유래 고분자와 합성고분자 재료로 분류된다. 천연고분자 재료는 세포외기질과 비슷한 성질을 가지고 있으며, 비교적 우수한 생체적합성을 지니고 있다. 천연유래 고분자로는 콜라겐 (collagen), 알지네이트 (alginate), 키토산 (chitosan) 및 히알론산 (hyaluronic acid), 실크 피브로인 (silk fibroin) 등이 널리 알려져 있다. 하지만, 천연유래 고분자의 경우, 형상 가공의 어려움이 있기 때문에 제작된 세포담체 외부에 코팅을 하거나 저온 플로팅

및 동결건조 (freeze drying) 기법을 이용하여 사용되어 진다.¹⁵⁻¹⁹

이에 비해 합성 고분자 재료는 비교적 값이 싸며, 분자구조와 분자량을 조절할 수 있어 물리적, 기계적 특성 조절이 가능하고, 생분해성을 조절할 수 있는 장점이 있다. 대표적인 합성고분자재료는 Polyglycolide(PGA), Poly(L-lactic acid)(PLLA), Poly(lactide-co-glycolide)(PLGA) Poly(ϵ -caprolactone)(PCL) 등이 있다.^{19,21} 특히, PCL은 결손 부위에 이식 된 후, 인체 내에서 물과 이산화탄소의 형태로 분해되며 무해한 생체 적합한 고분자 재료이다. 또한, 높은 기계적강도와 성형 제작의 용이함 때문에 골조직 재생을 위한 세포담체의 주재료로 사용되고 있다.²²⁻²⁴

합성 고분자의 경우 우수한 기계적 강도와 분해속도 제어의 장점이 있지만 세포담체의 친수성이 낮고 초기의 세포 접착 및 증식이 천연 고분자 세포담체에 비해 낮다는 단점이 있다. 하지만, 천연 고분자 세포담체는 표면 성질은 우수하지만 기계적 강도는 낮은 것으로 알려져 있다. 이러한 문제점을 개선하기 위해서 자외선, 전자선, 감마선 등을 이용한 물리적 방법과²⁵⁻²⁷ 표면을 플라즈마 처리 한 후, 펩타이드 (peptide) 및 콜라겐 등을 결합하는 화학적인 방법을^{28,29} 이용하여 합성 고분자 세포담체의 친수성 및 세포 재생을 향상시키기 위한 연구가 진행되고 있다.

다양한 생체재료를 사용하여 손상된 조직 혹은 생체 장기를 재생하기 위한 세포담체가 개발되고 있다. 전통적으로 조직공학에서의 세포담체 가공에서 사용되는 공정으로서 염침출법, 동결건조법, 상분리법, 파이버 분당법, 전기방사법 등이 있지만, 이식 부위에 맞는 적절한 기계적강도 및 일정하지 않는(ununiform) 구조, 세포의 증식 및 분화의 어려움 등의 문제점이 있다.²⁹ 이에 높은 세포 친화력을 갖는 세포담체를 제작하기 위해 3차원 자유형상 가공기술 (SFFs, solid freeform fabrications) 과 같은 제작 기술들이 조직공학에 적용되어 시도되고 있다.³⁰⁻³⁴

자유형상 가공기술의 일종인 RP 기술을 이용한 3차원 구조의 바이오 세포담체 제작 등 세계적으로 지속적인 연구개발이 진행되고 있다. 이러한 RP 기술로는 stereo-lithography, selective laser sintering, fused deposition modeling, 3D printing, 3D plotting³⁵⁻³⁸ 등이 있으며, 최근 전통적인 공정과 RP 기술을 융합하여 세포담체를 제작하는 연구도 진행되고 있다.^{16,18,21}

이처럼 조직공학에서의 세포담체는 기계, 생명, 화학, 의학 등의 다학제간의 학문 분야가 요구되며, 다양한 공정 및 기술들을 접목, 보완, 융합하여 손상되거나 기능을 상실한 환자에게 이식함으로써 인체에 거부반응이 없는 새로운 인공장기의 완벽한 조직을 형성하는 것이 주된 목표이다. 따라서 이식부위의 다양한 특성에 맞는 세포 담체의 제작은 매우 중요하며, 수많은 세포담체 제작공정 방법들 중에서 필요로 하는 세포담체를 제작하기 위한 제작공정의 선정은 매우 중요하다.

제2절 합성 고분자 및 생체세라믹스 세포담체 제작

손상된 조직이나 기관을 재생 및 대체하기 위한 수단으로써 세포들의 배양을 돕는 최적화된 세포담체 (scaffold)에 대한 연구가 지속적으로 진행되고 있다. 골조직 재생을 위한 세포담체는 인체 혹은 체내에 사용되는 물질이므로, 세포가 증식됨에 따라 구조물이 세포로 대체되도록 생분해 (biodegradable)가 가능해야 하며 분해된 성분들이 체내에 흡수 (bioabsorbable) 되어도 문제가 없어야 한다. 또한, 재생부위 이식 시에 유지 가능한 적절한 기계적 강도가 요구된다.³⁹⁻⁴²

3차원 형태의 적절한 기공 (pore) 구조는 균일하게 상호 연결되어 세포들의 증식 통로로 이용될 수 있어야 한다. 또한, 세포담체 내부에서 osteons 및 골조직의 성장을 위한 적절한 기공 크기는 약 300~400 μm 정도가 적절한 것으로 보고되고 있다.^{43,44} 최근 연구에 따르면, 조직 재생을 위한 이상적인 세포담체의 조건으로써, 균질세포 (homogeneous)의 균일성 (uniformity)과 유체의 확산 효과를 높이는 친수성 (hydrophilic) 성질이 중요한 요소로 꼽히고 있다.^{45,46}

SFF (solid freeform fabrication) 시스템은 세포담체의 기공크기와 공극률 (porosity)을 컨트롤 할 수 있으며, 원하는 형상으로의 제작이 가능하다. 이 시스템은 어느 정도의 점도를 가진 재료를 미세한 노즐을 통해 압출시키는 기법으로, 종래의 제조방법과는 달리 layer-by-layer 제작법으로서 3차원 형태의 복잡한 내부구조 제작이 용이한 장점이 있다.⁴⁷ 이와 더불어, SFF 공정은 전기방사 (electrospinning),^{48,49} 동결건조 (freeze-drying)^{50,51} 와 같은 전통적인 제조공법과 함께 융합에 따른 공정의 응용 및 다양화가 가능하다.

β -TCP (β -tricalcium phosphate)는 생체의 대용물로 이용되는 바이오세라믹스로서, 합성고분자 물질보다 비교적 높은 생체 작용 효과로 골 조직 재생에 탁월한 의료용 물

질이다.^{52,53} 또한, 골 유도 및 전도 특성을 지니며 최근, HA (hydroxyapatite), α -TCP (α -tricalcium phosphate), β -TCP와 같은 바이오세라믹스를 이용한 다양한 연구들이 진행되고 있다. 하지만, 바이오세라믹스 자체만으로는 낮은 취성 (brittleness) 등과 같은 기계적 특성의 영향에 따라 제한요소가 되고 있다. 이러한 문제를 극복하기 위해 poly(lactic acid) (PLA), poly(glycolic acid) (PGA), poly(lactic-co-glycolide) (PLGA), polycaprolactone (PCL)과 같은 합성고분자 물질과 함께 혼합/합성하는 연구들이 진행되고 있다.^{54,55}

β -TCP는 우수한 생체적합성을 띄고 뼈세포의 성장을 유도하며, 인체의 뼈나 치아의 주성분과 구조가 동일하여 뼈나 피부속의 이식물이 주변의 생체 조직과 안정적으로 융합되는 특징을 가지고 있다. PCL은 쾌속조형 공정에서 용융하여 비교적 쉽게 사용할 수 있어 가공성이 우수하며 뼈 대체물의 역할을 할 수 있는 기계적 강도가 우수하기⁵⁶ 때문에, β -TCP와 PCL의 우수한 장점을 결합하여 골 조직 재생을 위한 세포담체를 제작하고자 한다.

본 연구에서는 3차원 형태의 복잡한 내/외부 구조를 제작 할 수 있는 쾌속조형 공정을 이용한 PCL/ β -TCP가 혼합된 세포담체를 연구하였다. 제작된 세포담체는 골조직 세포의 증식과 분화, 적절한 기공 크기와 공극률, 기계적강도, 내/외부에서의 친수성 및 표면 특성, 조골세포 (MG-63, osteoblast like-cells)의 생리활성 영향 등을 분석 하였다.

제3절 표면개질을 위한 플라즈마 처리

조직공학에서의 세포담체 주소재로서, 최근 물리적 성질과 생체 기능이 우수한 고분자 재료에 대한 공급이 급속히 증대됨에 따라 소재의 성분이 다르고, 서로 결합되지 않는 두 성분으로 이루어진 구성물을 혼합 또는 결합으로 상호보완적인 복합재료 시스템에 대한 많은 연구가 실시되고 있다.⁵⁷⁻⁵⁹ 이러한 고분자재료를 복합적으로 사용하기 위해, 기계적 물성 향상에 대한 연구는 열 표면처리, 화학적 표면처리, 전기화학적 표면처리, 플라즈마 표면처리, 표면코팅 처리 등과 같은 고분자 표면처리방법 등으로 많은 연구가 진행되고 있다.^{60,61}

그 중 플라즈마에 의한 표면처리방법은 금속, 플라스틱, 생체 세라믹스 소재들의 표면에 관능기의 특성을 부여하여 친수성 또는 소수성으로 성질을 부여할 수 있다.⁶² 현재 플라즈마 처리공정은 표면에 관계되는 특성들 즉, 젖음성, 접착성, 결합성, 생체 적합성, 표면강화, 표면 열 저항성의 개질 등에 널리 이용되고 있으며,^{63,64} 고분자 표면처리 가공 및 건식 공정 등으로 각광 받고 있는 첨단 가공 기술 분야이다.^{65,66} 특히, 대기압 플라즈마를 이용한 표면 개질법은 물리-화학적 특성화 반응을 일으켜 표면 접착력 향상 및 멸균, 친/소수성화, 불순물 제거 등의 효과를 얻을 수 있을 뿐만 아니라 연속적인 표면 처리 공정이 가능한 특징을 갖고 있어 산업 현장의 생산성 및 경제성을 향상시킬 수 있다.⁶⁷⁻⁶⁹

조직공학에서의 생체재료는 친수성 및 생체적합성, 생분해성, 내부연결구조가 잘 이루어져 기공성이 좋아야한다.^{70,71} 합성 고분자를 이용해 만들어진 3차원 세포담체의 경우 우수한 기계적 강도와 분해속도 제어의 장점이 있지만 세포담체의 친수성이 낮고 초기의 세포 접착 및 증식이 천연 고분자 세포담체에 비해 낮다는 단점이 있다. 따라서 최근에는 이러한 문제점을 해결하기 위해 화학적으로 표면을 개질 시키거나 플라즈마를 처리하여 친수성을 높이는 방법이 연구되고 있다.⁷²⁻⁷⁴

플라즈마 처리는 고분자 표면에 극성을 띠게 하여 표면 에너지를 높이는 효과가 있으며, 그 결과 고분자의 표면 에너지를 증가시킬 뿐만 아니라 표면의 거칠기를 다소 증가시켜 세포 부착에 유리한 구조로 개질시킨다.⁷⁵⁻⁷⁷ 조직공학 기법을 이용하여 골 조직을 재생시키는 목적은 손실 부위에 대한 골 조직을 대체 또는 회복시키기 위해 본래의 뼈조직과 같은 상태로 만드는 것이다. 즉, 뼈 조직을 재생시키기 위해서는 세포담체 내/외부에 조골세포가 잘 부착하여 증식하고 분열 할 수 있도록 도와주어야 하는데, 이때 표면을 친수성의 특성 등을 갖도록 플라즈마를 이용해 개질화하여 뼈 조직 생성을 촉진 시키고자 한다.

제4절 참고 문헌

- (1) Griffith LG, Naughton G, Tissue Engineering–Current Challenges and Expanding Opportunities. *Science*, 295, 8, 2002.
- (2) Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. *nature materials* 4, 518, 2005.
- (3) Sobral JM, Caridade SG, Sousa RA, Mano JF, Reis RL, Three-dimensional plotted scaffolds with controlled pore size gradients: Effect of scaffold geometry on mechanical performance and cell seeding efficiency. *Acta Biomaterialia* 7, 1009, 2011.
- (4) Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 260, 920, 1993.
- (5) Kretlow JD, Mikos AG. From material to tissue: biomaterial development, scaffold fabrication, and tissue engineering. *AIChE J* 52, 3048, 2008.
- (6) Sachlos E, Czernuszka JT. Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur Cel Mater* 5, 29, 2003.
- (7) Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater* 4, 518, 2005.
- (8) Murphy CM, Haugh MG, O'Brien FJ. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen - glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 31, 461, 2010.
- (9) Lee KW, Wang S, Dadsetan M, Yaszemski MJ, Lu L. Enhanced cell ingrowth and proliferation through three-dimensional nanocomposite scaffolds with controlled pore structures. *Biomacromolecules* 11, 682, 2010.
- (10) Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng* 7, 679, 2001.
- (11) Ozkan S, Kalyon DM, Yu X. Functionally graded β -TCP/PCL nanocomposite scaffolds: In vitro evaluation with human fetal osteoblast cells for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 92, 1007, 2010.

- (12) Arafat MT, Lam CXF, Ekaputra AK, Wong SY, Li X, Gibson I. Biomimetic composite coating on rapid prototyped scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomater* 7, 809, 2011.
- (13) Zhou Y, Hutmacher DW, Varawan SL, Lim TM. In vitro bone engineering based on polycaprolactone and polycaprolactone - tricalcium phosphate composites. *Polym Int* 56, 333, 2007.
- (14) Yeo MG, Lee H, Kim GH. 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. *12*, 502, 2011.
- (15) Ma L, Gao C, Mao Z, Zhou J, Shen J, Hu X, Han C. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials* 24, 4833, 2003.
- (16) Lee H, Kim GH. Three-dimensional plotted PCL/ β -TCP scaffolds coated with a collagen layer: preparation, physical properties and in vitro evaluation for bone tissue regeneration. *J Mater Chem* 21, 6305, 2011.
- (17) Hong SG, Kim GH. Mechanically improved electrospun PCL biocomposites reinforced with a collagen coating process: preparation, physical properties, and cellular activity, *Bioprocess and Biosystems Engineering* DOI 10.1007/s00449-012-0776-3
- (18) Ahn SH, Yoon H, Kim GH, Kim YY, Lee SH, Chun W. Designed three-dimensional collagen scaffolds for skin tissue regeneration, *tissue engineering*, 16, 813, 2010.
- (19) Chen Y, Pe'pin A. Nano fabrication : conventional and nonconventional methods. *Electrophoresis* 22, 187, 2001.
- (20) Mikos AG, Temenoff JS. Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Electronic Journal of Biotechnology* 3, 1, 2000.
- (21) Bae SE, son JS, Park K, Han DK. Fabrication of covered porous PLGA microspheres using hydrogen peroxide for controlled drug delivery and

- regenerative medicine. *J Controlled Release* 133, 37, 2009.
- (22) Tian T, Jiang D, Zhang J, Lin Q. Fabrication of bioactive composite by developing PLLA onto the framework of sintered HA scaffold. *Mater Sci Eng C* 28, 51, 2008.
- (23) Miao X, Tan DM, Li J, Xiao Y, Crawford R. Mechanical and biological properties of hydroxyapatite/tricalcium phosphate scaffolds coated with poly (lactic-co-glycolic acid). *Acta Biomater* 4, 638, 2008.
- (24) Lundberg RD, Koleske JV, Wischmann KV. Lactone polymers. III. Polymerization of ϵ -caprolactone, *J Polym Sci* 7, 2915, 1969.
- (25) Ma Z, Gao C, Gong Y, Shen J. Chondrocyte behaviors on poly-L-lactic acid (PLLA) membranes containing hydroxyl, amide or carboxyl groups. *Biomaterials*, 24, 3725, 2003.
- (26) Nuutinen JP, Clerc C, Virta T, Tormala P. Effect of gamma, ethylene oxide, electron beam, and plasma sterilization on the behaviour of SR-PLLA fibres in vitro. *J Biomater Sci Polym Edn* 13, 1325, 2002.
- (27) Ma Z, Cao C, Yuan J, Ji J, Gong Y, Shen J. Surface modification of poly L lactide by photografting of hydrophilic polymers towards improving its hydrophilicity. *J Appl Polym Sci* 85, 2163, 2002.
- (28) Steffens GCM, Nothdurft L, Buse G, Thissen H, Hoher H, Klee D. High density binding of proteins and peptides to poly (D, L-lactide) grafted with polyacrylic acid. *Biomaterials* 23, 3523, 2002.
- (29) Yang J, Bei J, Wang S. Enhanced cell affinity of poly (D, L-lactide) by combining plasma treatment with collagen anchorage. *Biomaterials* 23, 2607, 2002.
- (30) Yang S, Leong K, Du Z, Chua C. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional Factors. *Tissue engineering* 7, 6, 2001.
- (31) 김완두, 박수아, 이준희. 맞춤형 스캐폴드 제작을 위한 3차원 바이오조형기술. 2011.
- (32) Kim SH, Oh AY, Choi JH, Jung SH, Hong HH, Jeon NR, Shin HS, Rhee JM,

- Khang G. Recent advances in manufacturing method of smart scaffold for regenerative medicine. *Tissue Eng Regen Medicine* 3, 351, 2008.
- (33) Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21, 2529, 2000.
- (34) Sacholos E Czernuszka JT. Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Euro Cells Mater* 5, 29, 2003.
- (35) Matthews JA, Wnek GE, Simpson DG, Bowlin GL. Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules* 3, 232, 2002.
- (36) Liao CJ, Chen CF, Chen JH, Chiang SF, Lin YJ, Chang KY. Fabrication of porous biodegradable polymer scaffolds using a solvent merging/particulate leaching method. *J Biomed Mater Res* 59, 676, 2002.
- (37) Mooney DJ, Baldwin DF, Suh NP, Vacanti JP, Langer R. Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. *Biomaterials* 17, 1417, 1996.
- (38) Dalton PD, Woodfield T, Hutmacher DW. Snapshot: Polymer scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 30, 701, 2009.
- (39) Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 260, 920, 1993.
- (40) Kretlow JD, Mikos AG. From material to tissue: biomaterial development, scaffold fabrication, and tissue engineering. *AIChE J* 52, 3048, 2008.
- (41) Sachlos E, Czernuszka JT. Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur Cel Mater* 5, 29, 2003.
- (42) Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater* 4, 518, 2005.
- (43) Hing KA, Best SM, Tanner KE, Bonfield W, Revell PA. Mediation of bone ingrowth in porous hydroxyapatite bone graft substitutes. *J Biomed Mater Res A* 2004, 68, 187.
- (44) Whang K, Healy KE, Elenz DR, Nam EK, Tsai DC, Thomas CH, Nuber GW,

- Glorieux FH, Travers R, Sprague SM. Engineering Bone Regeneration with Bioabsorbable Scaffolds with Novel Microarchitecture. *Tissue Eng* 5, 35, 1999.
- (45) Salerno A, Guarnieri D, Iannone M, Zeppetelli S, Netti PA. Engineered μ -bimodal poly(ϵ -caprolactone) porous scaffold for enhanced hMSC colonization and proliferation. *Tissue Eng Part A* 16, 2661, 2010.
- (46) Yao D, Smith A, Chaudhry GR, Nagarajan P, Vasquez A, Dang LJ. Fabrication of polycaprolactone scaffolds using a sacrificial compression-molding process. *Biomed Mater Res B* 77, 287, 2006.
- (47) Hutmacher DW, Sittinger M, Risbud M, Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *Trends Biotechnol* 22, 354, 2004.
- (48) Moroni L, Schotel R, Hammann D, de Wijn JR, van Blitterswijk CA. 3D fiber-deposited electrospun integrated scaffolds enhance cartilage tissue formation. *Adv Funct Mater* 18, 53, 2008.
- (49) Yoon H, Ahn SH, Kim GH. Three-dimensional polycaprolactone hierarchical scaffolds supplemented with natural biomaterials to enhance mesenchymal stem cell proliferation. *Macromolecular Rapid Commun* 30, 1632, 2009.
- (50) Sachlos E, Reis N, Ainsley C, Derby B, Czernuszka JT. Novel collagen scaffolds with predefined internal morphology made by solid freeform fabrication. *Biomaterials* 24, 1487, 2003.
- (51) Jiankang H, Dichen L, Yaxiong L, Bo Y, Hanxiang Z, Qin L, Bingheng L, Yi L. Preparation of chitosan - gelatin hybrid scaffolds with well-organized microstructures for hepatic tissue engineering. *Acta Biomater* 5, 453, 2009.
- (52) Klein CP, Driessen AA, de Groot K, van den Hooff A. Biodegradation behavior of various calcium phosphate materials in bone tissue. *J Biomed Mater Res* 17, 769, 1983.
- (53) Ravaglioli A, Krajewski A. *Bioceramics: Materials, Properties and Applications*. Chapman and Hall: London (Book), 1992.
- (54) Tian T, Jiang D, Zhang J, Lin Q, Fabrication of bioactive composite by

- developing PLLA onto the framework of sintered HA scaffold. *Mater Sci Eng C* 28, 51, 2008.
- (55) Miao X, Tan DM, Li J, Xiao Y, Crawford R. Mechanical and biological properties of hydroxyapatite/tricalcium phosphate scaffolds coated with poly(lactic-co-glycolic acid). *Acta Biomater* 4, 638, 2008.
- (56) Williams JM, Adewunmi A, Schek RM, Flanagan CL, Krebsbach PH, Feinberg SE, Hollister J, Das S. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. *Biomaterials* 26, 4817, 2005.
- (57) Kim YH, Wool RP. A Theory of healing at a polymer-polymer interface. *Macromolecules* 16, 1115, 1983.
- (58) Jia W, Chen X. Effect of Polymer Filler Interactions on PTC behaviors of LDPE/EPD M Blends Filled with Carbon Blacks. *J Appl Polym Sci* 66, 7885, 1997.
- (59) Papirer E, Wu DY, Study of the behavior and conformation of linear hydrocarbon chains grafted on the surface of carbon black. *Carbon* 28, 393, 1990.
- (60) Park SJ, Kim JS, Modifications Produced by Electrochemical Treatment on Carbon Blacks: Microstructures and Mechanical Interfacial Properties, *Carbon* 39, 2011, 2001.
- (61) Kim JS, Kim YK, Lee KH. Effects of atmospheric plasma treatment on the interfacial characteristics of ethylene-vinyl acetate/polyurethane composites. *J Colloid Interface Sci* 271, 187, 2004.
- (62) Inagaki N, Plasma surface modification and plasma polymerization. CRC 1996.
- (63) Babukty Y, Prat R, Endo K, Kogoma M, Ozaki S, Kodama M. Poly(vinyl chloride) surface modification using tetrafluoroethylene in atmospheric pressure glow discharge. *Langmuir* 15, 7055. 1999.
- (64) Jeong JY, Park J, Hennins I. Research of atmospheric pressure plasma technology *J Phys Chem A* 104, 8027, 2000.
- (65) Friedrich JF, Geng SH, Unger W, Lippitz A, Erdmann J, Gorsler HV, Woll CH,

- Schertel A, Bierbaum K, Plasma functionalization and reorientation of macromolecules at polymer surfaces. *surface and coatings technology* 74, 664, 1995.
- (66) Dahl S, Rats D, Martinu JL, Klemberg-Sapieha JE, Micromechanical characterisation of plasma treated polymer surfaces. *Thin Solid Films* 355, 290, 1999.
- (67) Yu QS, Reddy CM, Meives MF, Yasuca HK, Surface modification of Poly(terafluoroethylene) by a low-temperature cascade arc torch and radio-frequency plasma. *J Polym Sci Polym Chem* 37, 4432, 1999.
- (68) Xizo ZG. Effects of solvents on the surface properties of oxygen plasma-treated polyethylene and polypropylene films. *J Adhesion Sci Technol* 11, 655, 1997.
- (69) Kanazawa S, Kogoma M, Moriwaki T, Okazaki S. Stable glow plasma at atmospheric pressure. *J Phys D Apply Phys* 21, 838, 1988.
- (70) Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21, 2529, 2000.
- (71) Hollister SJ, Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature materials* 4, 518, 2005.
- (72) Marray MM, Spindler KP, Ballard P, Welch TP, Zurakowski D, Nanney LB. Enhanced histologic repair in a central wound in the anterior cruciate ligament with a collagen - platelet-rich plasma scaffold. *J Orthopaedic Res* 25, 1007, 2007.
- (73) Schuckert KH, Jopp S, Teoh SH. 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 Eng* 15, 493, 2009
- (74) Jung YJ, Lee KH, Park CW, Suh TS, Hong CM, Hong SH, Ahn WS, Chun HJ. Characterization of surface-modified poly(DL-lactide-co-glycolide) scaffolds from hydrophilic monomers using plasma-enhanced CVD. *J Ind Eng Chem* 11, 165, 2005.

- (75) Duan Y, Wang Z, Yan W, Wang S, Zhang S, Jia J. Preparation of collagencoated electrospun nanofibers by remote plasma treatment and their biological properties. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition* 18, 1153, 2007.
- (76) Yang F, Wolke JGC, Jansen JA. Biomimetic calcium phosphate coating on electrospun poly (epsilon-caprolactone) scaffolds for bone tissue engineering. *Chemical Engineering Journal* 137, 154, 2008.
- (77) Li X, Xie J, Lipner J, Yuan X, Thomopoulos S, Xia Y. Nanofiber scaffolds with gradations in mineral content for mimicking the tendon-to-bone insertion site. *Nano Letters* 9, 2763, 2009.
- (78) 김강희, 이준우, 고병열, polymeric biomaterials. *기술산업정보분석* 2003.
- (79) Park SA, Lee JH, Kim W. Development of biomimetic scaffold for tissue engineering. *Elastomers and Composites* 44, 106, 2009.
- (80) Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 26, 5474, 2005.
- (81) Kim SH, Oh AY, Choi JH, Jung SH, Hong JH, Jeon NR, Shin HS, Rhee JM, Khang GS. Recent advances in manufacturing method of smart scaffold for regenerative medicine. *Tissue Eng Regen Med* 5, 351, 2008.
- (82) 이원규. 다양한 대기압 플라즈마 발생 장치 시스템. *Atmospheric plasma technology & applications* 2006.

Table 1 Polymer scaffold processing for tissue engineering.¹⁰

	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 methods for biocompatibility.⁷⁸

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.¹⁹

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.¹⁹

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.⁷⁹

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 chemically synthesized polymers.⁸⁰

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	
	Gas foaming with effervescent reaction (in vivo)	70	51	Tibia defects in rats
Poly(propylene fumarate)	Salt-leaching	300 - 500	70	TGF- β 1 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

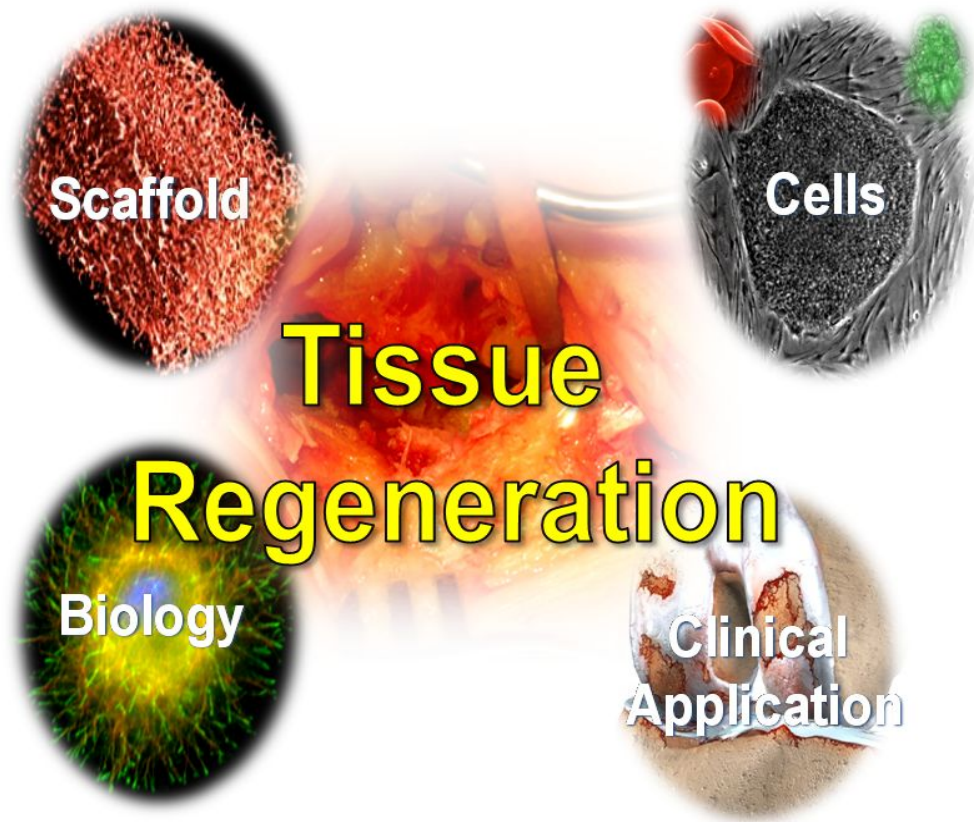


Fig. 1 The elements of tissue engineering.³³

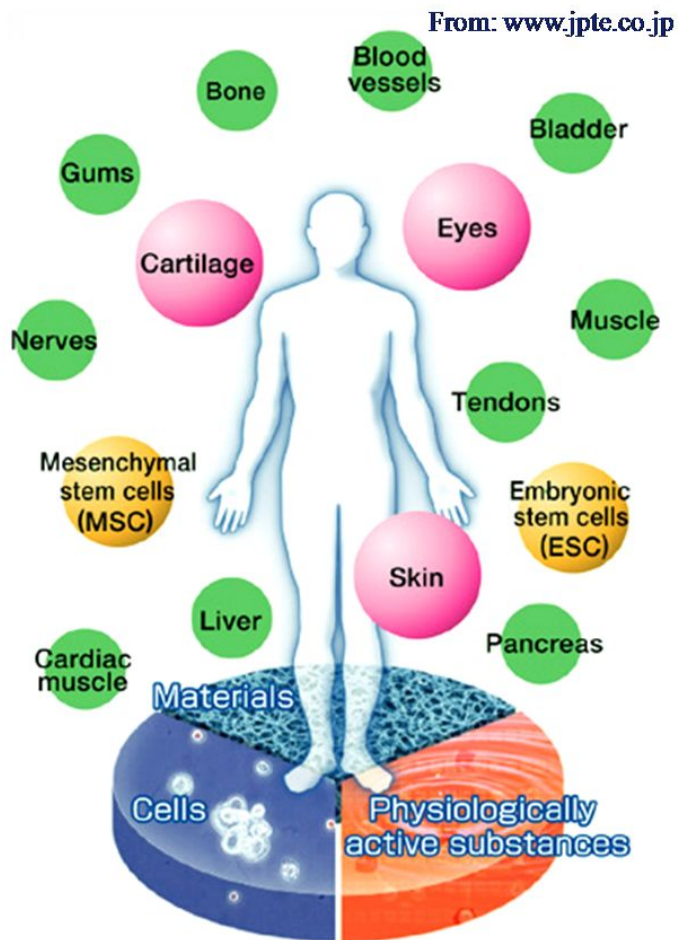


Fig. 2 Various applications of tissue engineering. (<http://www.jppte.co.jp>)

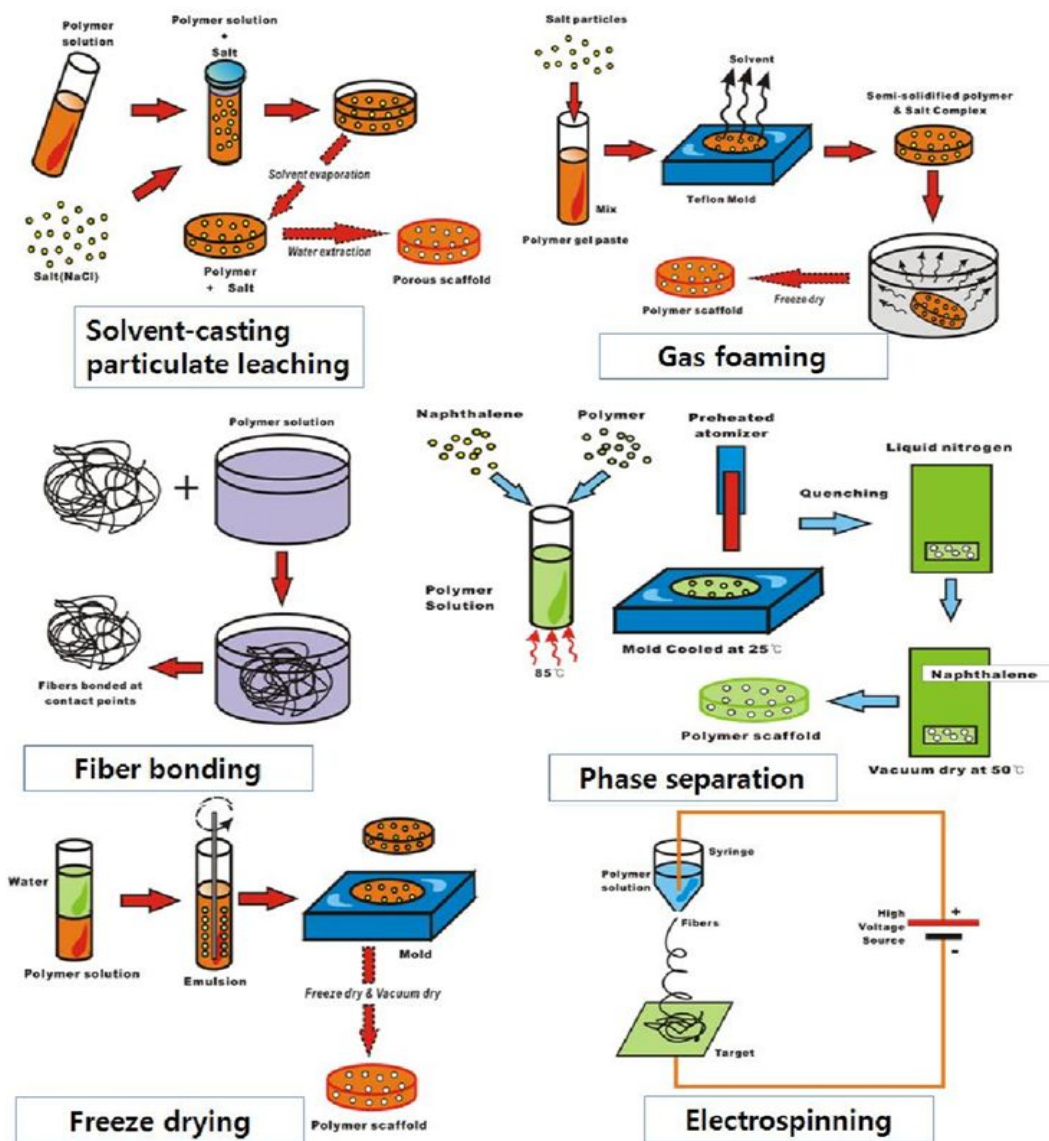


Fig. 3 Conventional methods for scaffold fabrication- I.⁷⁹

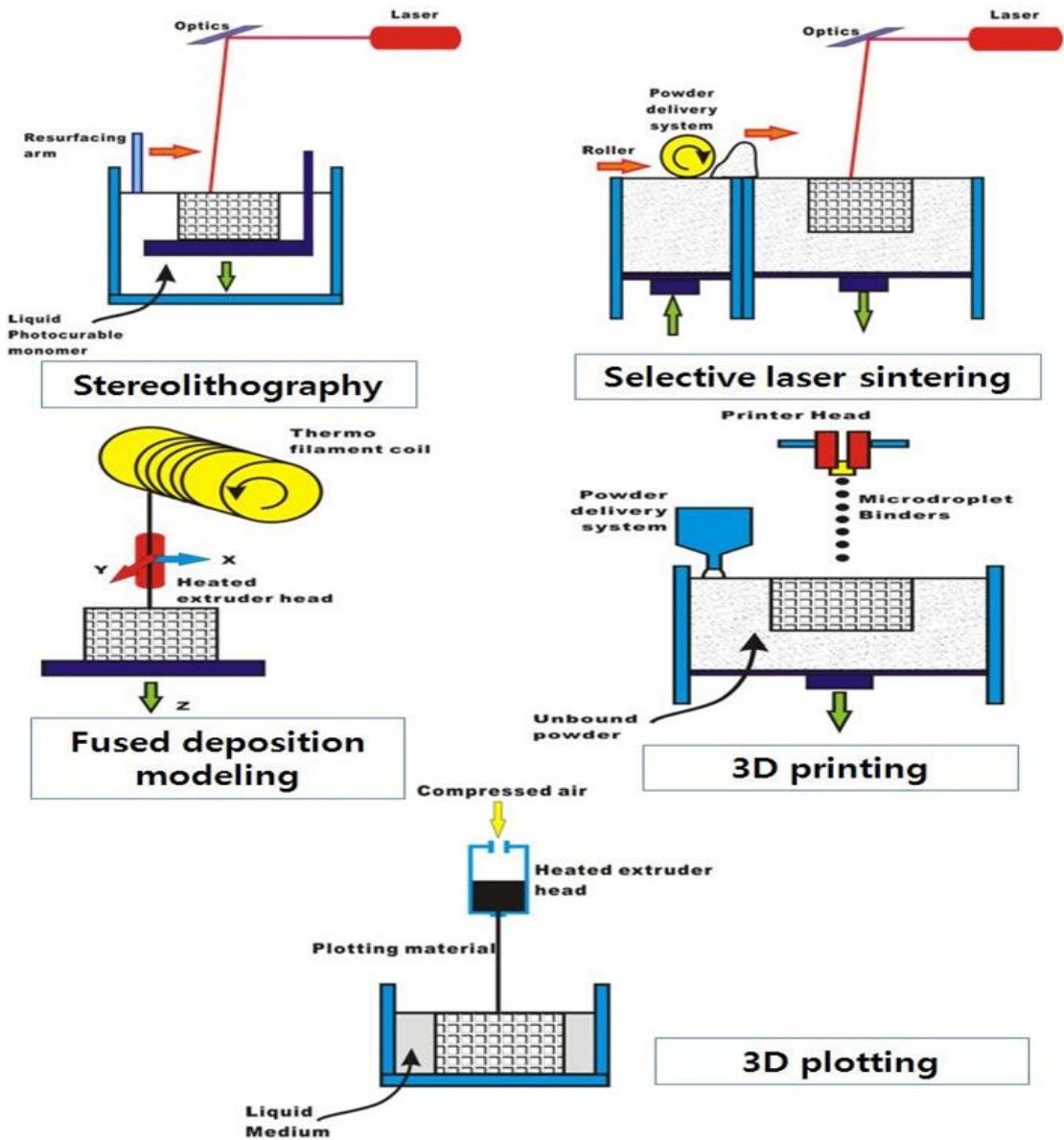


Fig. 4 Conventional methods for scaffold fabrication-II.⁷⁹

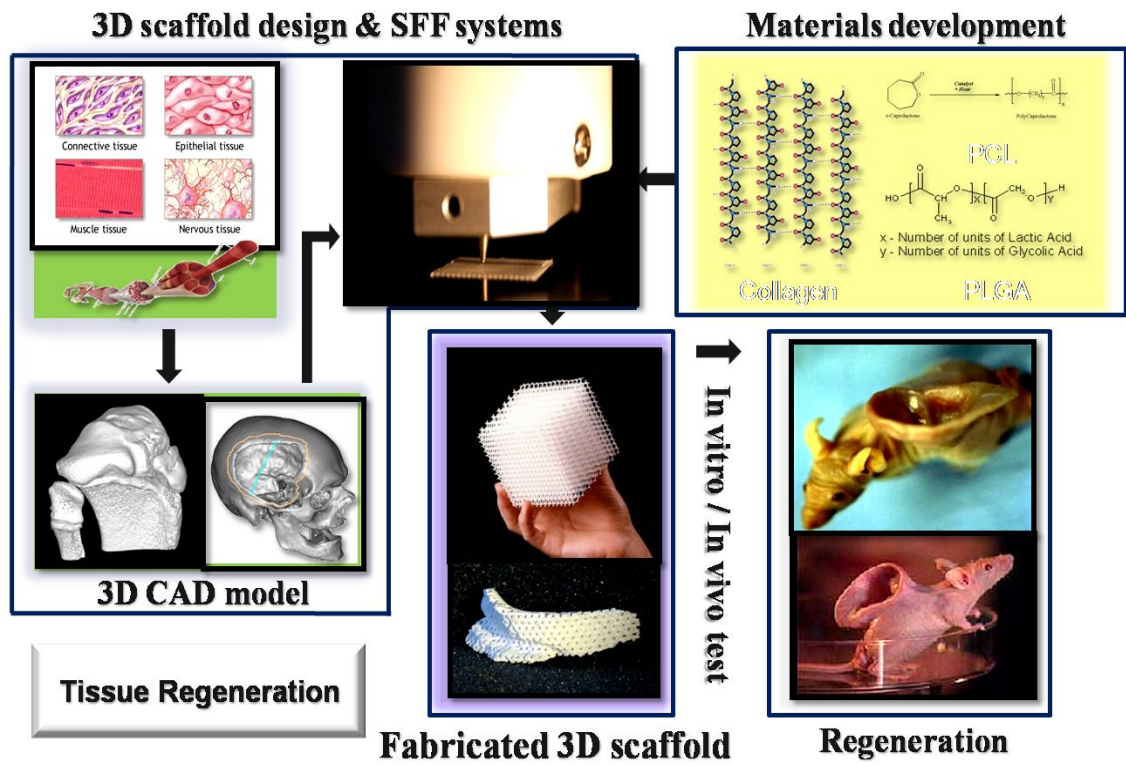


Fig. 5 Computer aided tissue engineering.⁷⁹

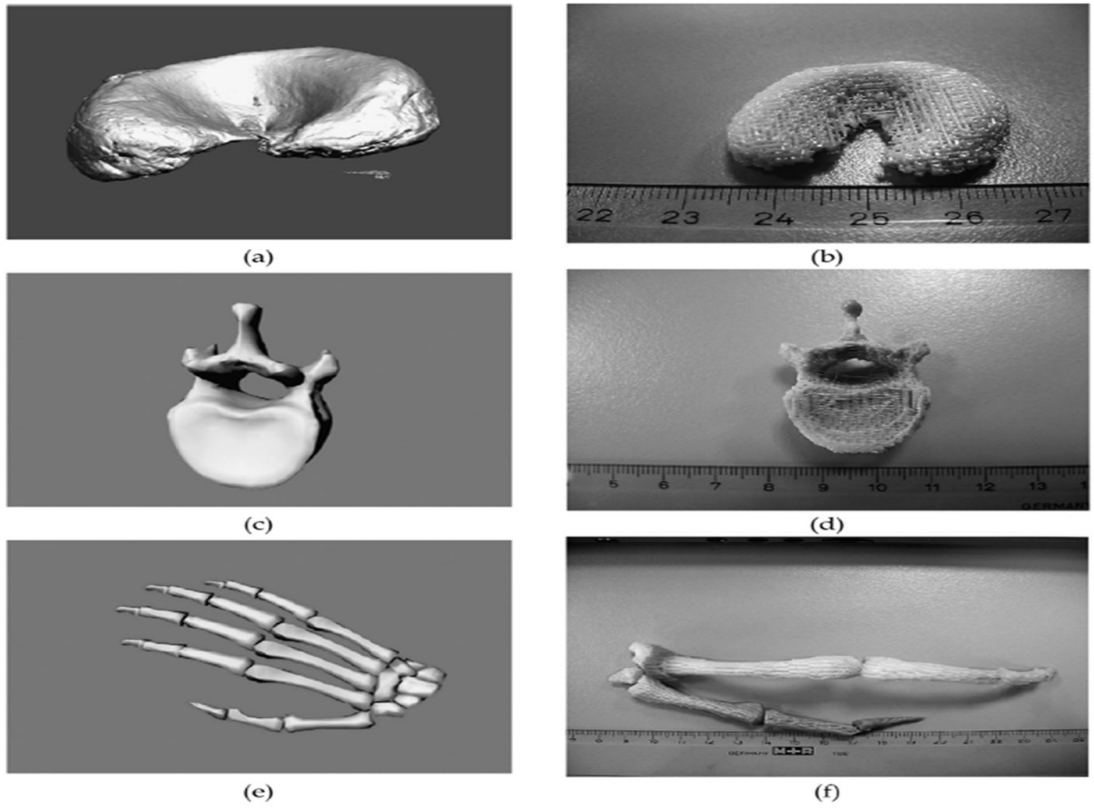


Fig. 6 CT/MRI의 해부학적 소견과 이에 따라 제조된 3D 세포담체의 형상. (a, b) 메니스커스, (c, d) 척추, (e, f) 손가락관절.⁸¹

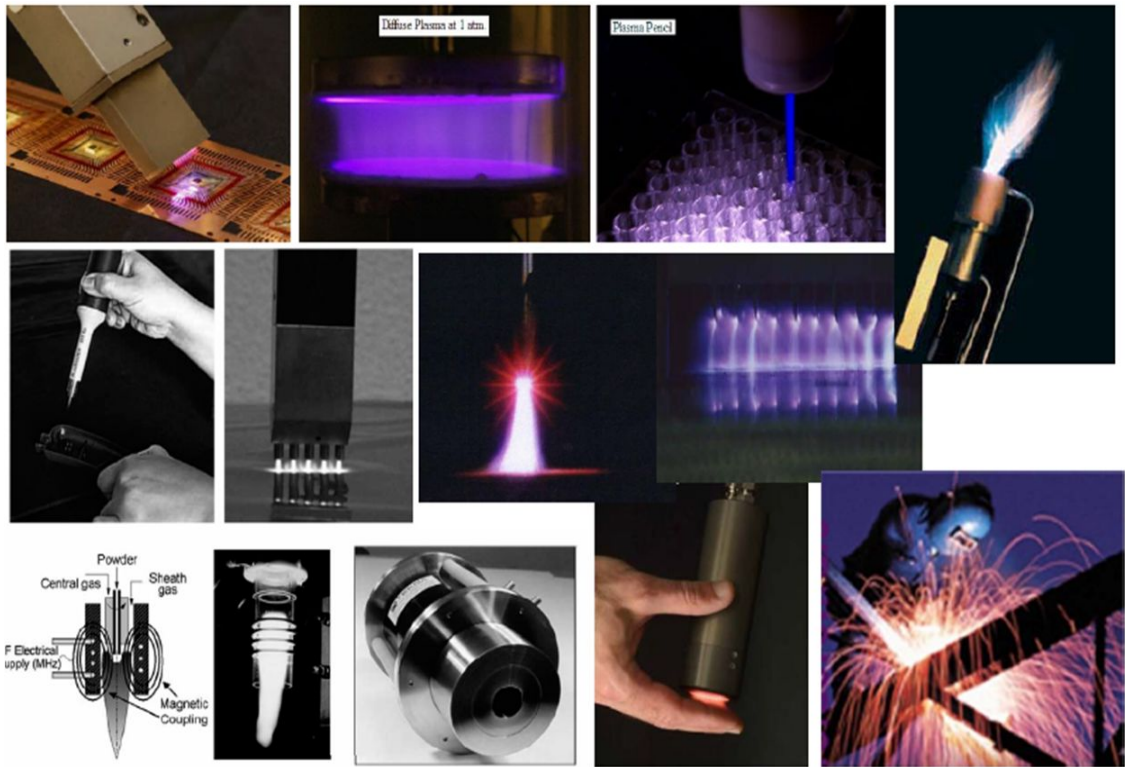


Fig. 7 다양한 대기압 플라즈마 발생 장치 시스템⁸²
 (강원대학교, 이원규 Atmospheric plasma technology & applications)

제3장 실험 및 방법

제2절 PCL/ β -TCP가 혼합된 세포담체 제작

1. 서론

손상된 조직이나 기관을 재생 및 대체하기 위한 수단으로써 세포들의 배양을 돕는 최적화된 세포담체 (scaffold)에 대한 연구가 지속적으로 진행되고 있다. 골조직 재생을 위한 세포담체는 인체 혹은 체내에 사용되는 물질이므로, 세포가 증식됨에 따라 구조물이 세포로 대체되도록 생분해 (biodegradable)가 가능해야 하며 분해된 성분들이 체내에 흡수 (bioabsorbable) 되어도 문제가 없어야 한다. 또한, 재생부위 이식 시에 유지 가능한 적절한 기계적 강도가 요구된다.¹⁻⁴

3차원 형태의 적절한 기공 (pore) 구조는 균일하게 상호 연결되어 세포들의 증식 통로로 이용될 수 있어야 한다. 또한, 세포담체 내부에서 osteons 및 골조직의 성장을 위해 기공 크기는 약 300~400 μm 가 이상적이다.^{5,6} 최근 연구에 따르면, 조직 재생을 위한 이상적인 세포담체의 조건으로써, 균질세포 (homogeneous)의 균일성 (uniformity)과 유체의 확산 효과를 높이는 친수성 (hydrophilic) 성질이 중요한 요소로 꼽히고 있다.^{7,8}

SFF (solid freeform fabrication) 시스템은 세포담체의 기공크기와 공극률 (porosity)을 컨트롤 할 수 있으며, 원하는 형상으로의 제작이 가능하다. 이 시스템은 어느 정도의 점도를 가진 재료를 미세한 노즐을 통해 압출시키는 기법으로, 종래의 제조방법과는 달리 layer-by-layer방법으로 3차원 형태의 복잡한 내부구조 제작이 용이한 장점이 있다.⁹ 이와 더불어, SFF 기법은 전기방사 (electrospinning),^{10,11} 동결건조

(freeze-drying)^{12,13} 와 같은 전통적인 제조공법과 함께 융합에 따른 공정의 응용 및 다양화가 가능하다.

특히, 전기방사 공정은 다양한 고분자를 나노 및 마이크로 크기의 섬유를 만드는 기술로서, 제작된 나노파이버는 직경이 약 20 nm~1 μ m 사이의 섬유로서 표면적이 매우 크기 때문에 필터 등으로 사용하였을 때 탁월한 여과 효과를 볼 수 있으며, 호흡성이 있어 세균 등의 침투를 막는 방어복이나, 약물 전달 시스템 등 다양한 분야에서 활용되고 있다.¹⁴⁻¹⁷

전기방사법의 원리는 초기 표면장력 (surface tension)에 의해 방사노즐 끝부분에 형성된 고분자 용액의 미세방울에 높은 kV의 고전압을 가하게되면 고분자 용액의 미세방울 표면에서 전기적 반발력에 의해 테일러 콘 (taylor cone)이 형성된다. 이때 표면장력보다 전기적 반발력이 더 강해지면 전하를 띤 고분자용액이 테일러 콘과 whipping zone을 형성하며 ground 처리되어있는 컬렉터 (collector)로 연속적으로 이동하여 나노 크기의 파이버로 만들어지게 된다.¹⁸⁻²³

S

β -TCP (β -Tricalcium phosphate)는 생체의 대용물로 이용되는 바이오세라믹으로써, 합성고분자 물질보다 비교적 높은 생체 작용 효과로 골 조직 재생에 탁월한 의료용 물질이다.^{24,25} 또한, 골 유도 및 전도 특성을 지니며 최근, HA (hydroxyapatite), α -TCP (α -Tricalcium phosphate), β -TCP와 같은 바이오세라믹스를 이용한 다양한 연구들이 진행되고 있다. 하지만, 바이오세라믹스 자체만으로는 낮은 취성 (brittleness) 등과 같은 기계적 특성의 영향에 따라 제한요소가 되고 있다.

이러한 문제를 극복하기 위해 poly(lactic acid) (PLA), poly(glycolic acid) (PGA), poly(lactic-co-glycolide) (PLGA), polycaprolactone (PCL)과 같은 합성고분자 물질을 바이오세라믹스 재료와 함께 혼합/합성하여 기계적 성질과 생체작용의 효과를 높이는

세포담체 제작에 관한 연구들이 진행되고 있다.²⁶⁻²⁸

특히, 생체 내에서 분해성을 나타내는 것으로 알려져 있는 β -TCP는 인산칼슘계 세라믹스의 종류로서, 생체와의 우수한 친화력 및 골전도성으로 인하여 다양한 인체기관 및 조직 재생에 주로 사용되는 재료이다. 또한, 생체와의 우수한 친화력 및 골전도성으로 인하여 넓은 범위의 잠재적 실용 가능성을 가진 생체 의료용 재료로서 골조직 재생을 위한 세포담체로 주로 사용되고 있다.²⁹⁻³⁰

본 연구에서는 골 조직 재생을 위한 쾌속조형 (SFF 시스템의 일종) 시스템과 전기방사 공정을 융합하였다. 이에 따라, 향상된 골세포 증식/분화, 적절한 기공 크기와 공극률, 기계적 강도가 향상된 상호연결 구조의 PCL/ β -TCP 및 콜라겐 (collagen) 나노파이버가 결합된 3차원 세포담체를 제작하였다. PCL과 β -TCP의 조성비를 다양하게 하며, 콜라겐 나노파이버의 유무에 따른 세포담체 내/외부에서의 친수성 등의 표면 특성 및 MG-63 (osteoblast-like cells) 의 생리활성 영향을 확인하였다.

2. 실험

2-1. 재료

Sigma-aldrich (U.S.A) 사의 PCL ($M_w = 80000$, density = 1.135g/cm^3), Fluka (U.S.A) 사의 β -TCP (density = 3.14 g/cm^3) 파우더 제품을 사용하였으며, β -TCP의 시료 크기는 100~200 nm 로 측정되었다. 본 연구에서의 주재료인 PCL은 합성 고분자로서 생분해성, 생체적합성 등의 특성을 나타내는 생체 의료용 소재이다. 콜라겐 (Matrixen-PSP, Bioland, Cheonan City, South Korea)은 전기방사를 위한 소재로서, 콜라겐 나노파이버의 경화 (cross-linking) 용액은 1-ethyl-(3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC; M_w 191.7; Sigma-Aldrich), N-hydroxysulfosuccinimide (NHS, $M_w = 115.09$, Fluka) 를 혼합하여 사용하였다.

2-2 방법

PCL/ β -TCP가 결합된 3차원 형태의 세포담체를 제작하기 위해, 용융압출공정을 이용한 쾌속조형 시스템을 이용하였다. PCL을 주재료로, β -TCP의 혼합량에 따른 조골 세포의 거동을 분석하기 위하여, 혼합비를 PCL 대비 β -TCP 0, 10, 20, 40 wt%로 실험하였다. PCL과 β -TCP는 동결 분쇄기 (freezer-mill) 를 이용하여, 앞서 말한 혼합비에 따라 재료를 파우더형태로 제작하였다.

이후, 쾌속조형 시스템의 용융 실린더에 주입하여 압출하였으며, 이를 다시 동결 분쇄기를 이용하여 파우더 형태로 제작하였다. 이는 PCL과 β -TCP가 고르게 혼합되어

strut에 균일하게 결합되도록 하는 공정이다.³¹ 준비된 PCL/ β -TCP 파우더를 3축 로봇의 용융 실린더에 주입하고, 노즐 내부 직경크기 350 μm , 용융 온도 (melting point) 115 $^{\circ}\text{C}$ 로 고정한 뒤 노즐의 이송 속도를 변수로 β -TCP의 혼합량에 따른 공정 조건을 제어하여 3차원 형태의 다공성 세포담체를 제작하였다.

콜라겐 나노파이버 제작을 위해 고전압 전원 공급장치(high voltage power supply, HVPS, SHV200 40kV / 5mA, Converttech), 실린지 펌프(syringe pump, model 781100, KD Science), 보조전극(auxiliary electrode), 방사노즐을 이용하였다. 전압은 0.17~0.22 kV/mm, Flow rate 0.2 ml/h, 세포담체 표면과 노즐간의 거리 약 15cm로 전기방사 하였다.

세포담체 특성. 세포담체의 strut 및 공극의 크기, 재료의 혼합비에 따른 내/외부의 표면 및 구조, 콜라겐 나노파이버의 결합도 등을 관찰하기 위해 광학현미경 (BX FM-32, Olympus, Tokyo, Japan) 과 주사전자현미경 (SEM, Sirion, Hillsboro, OR, USA)을 이용하여 관찰하였다. 또한, β -TCP가 혼합비에 따른 제작 상태와 세포담체 내/외부에 증식된 세포의 칼슘 (calcium)과 인 (phosphate) 원소에 대한 정성분석을 위해서 EDS (Energy dispersive spectroscopy) 측정이 이루어졌다.

세포담체 내부에 결합된 콜라겐 나노파이버의 상태 및 경화 공정에 따른 콜라겐의 성분 분석을 위해, FTIR (Fourier-transform infrared) (model 6700, Nicolet, West Point, PA, USA) 분석을 실시하였다. IR 스펙트라는 400~4000 cm^{-1} 영역에서 평균 30 scan, 8 cm^{-1} 변화 주기로, 동일 조건하에서 측정 비교하였다.

PCL struts 내부에 결합된 β -TCP의 정량/성 분석을 위해 WAXD (Wide-angle X-ray diffractometry) 를 이용, 단색화 (graphite monochromator) 한 봉입형 X선 튜브 (sealed-tube) 를 통해, 평행 복사 Cu K α (1.542 \AA), 40 kV, 200 mA로 회절분석기

(Model D/Max-2500, 18 kW; Rigaku, Tokyo, Japan) 를 이용하여 분석하였다.

콜라겐은 생체친화성 고분자인 동시에 친수성 물질로 알려져 있으며, β -TCP는 강한 친수성 특성을 갖는 천연 고분자이다. 이에 따라, 수분 흡수율 (water uptake) 은 각각의 제작된 세포담체를 증류수 1 ml가 담긴 페트리 접시 (petri dish, 25 × 25 × 10 mm) 안에 침전 (soaking) 한 뒤, 2시간 전 후의 무게 량을 측정하여 계산하였다.

$$W_{2h}(\%) = \frac{W_{2h} - W_o}{W_o} \times 100$$

수분 흡수율 측정방식은 X, Y, Li의 실험방법을 참조하였다.³² W_o 는 증류수에 넣기 전 인 초기의 세포담체 무게 량이며, W_{2h} 는 증류수에 침전 시킨 후 2시간 후의 수분 흡수 된 세포담체 무게 량이다.

제작된 세포담체는 이식 부위에 대한 회복부를 유지하기 위한 적절한 기계적강도를 지녀야 한다. 따라서 β -TCP의 혼합량 및 콜라겐 나노파이버의 유무에 따른 세포담체의 기계적강도의 변화를 측정하였다. 전자측정기 (digital caliper micrometer, model Ultracal III; sylvac, Bem, switzerland) 를 이용하여 5 mm × 15 mm × 3 mm 의 동일한 크기의 직사각형 형태로 잘라냈다. 분석에 사용된 장비는 UTM (model Top-tech 2000; Chemilab, Suwon, South Korea) 기기이며, 인장속도 (stretching speed) 2.0 mm/s의 인장하중을 가하여 세포담체의 응력-변형률 곡선 (stress-strain-curve) 을 측정하였다. 또한, 세포담체의 공극률 계산식은 다음과 같다.

$$Porosity(\%) = \left[1 - \left(\frac{\text{apparent density of scaffold}}{\text{true bulk density of scaffold}} \right) \right] \times 100$$

apparent density는 (실제 세포담체 무게) / (사각형태의 세포담체 체적) 으로 계산하였다.

세포실험 (in vitro). 본 연구에서 제작된 세포담체 내/외부에서의 세포 성장을 확인하기 위해 세포 배양 실험을 수행하였다. 6 mm × 6 mm × 1.5 mm 크기의 세포담체를 70% 알코올에 침전 후, 자외선 (ultraviolet light) 에서 멸균 처리하였다. 실험에 사용된 세포는 osteoblast-like cells (MG-63; ATCC, Manassas, VA, USA) 이다. 충분한 세포 수를 확보하기 위해 5대 계대 배양한 세포를 사용하였고, 시편당 1×10^5 cells을 접종 (seeding) 하였다.

배양액은 10 %의 소태아혈청 (fetal bovine serum, Hyclone) 과 1%의 항생제 (penicillin, Hyclone) /스트렙토마이신 (streptomycin, Hyclone) 가 포함된 DMEM-HG (Dulbecco's modified Eagle's medium; Hyclone, Logan, UT, USA) 을 사용하였으며, 37 °C, 5 % CO₂ 인큐베이터에서 7일간 배양하였다. 또한, 2일마다 배지 (medium) 를 교체해주었다. 이후, osteoblast-like cells이 배양된 세포담체는 2.5 % 글루타르알데히드 (glutaraldehyde) 를 이용하여 세포를 고정하였고 탈수과정 및 백금 코팅 처리 후, 주사전자현미경을 이용하여 관찰하였다.

생세포 (viable cells) 는 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 분석 (Cell Proliferation Kit I; Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) 을 이용하여 정량분석이 이루어졌다. MTT 분석 (yellow tetrazolium salt MTT) 은 생세포에서 물에 녹지 않는 포르마잔 결정 (formazan crystal) 으로 환원되는데, 이 포르마잔을 DMSO로 녹여서 생성된 결정의 양을 분광학적인 방법으로 측정하였다. 분석을 위해 분광학기 (microplate reader, model EL800, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, U.S.A) 를 이용하였으며, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다 (n = 5).

통계 분석. 모든 데이터는 표준편차가 나타난다. 각 실험의 통계적 분석은 분산분석 (ANOVA) 에 따라 측정되었으며, 유의수준 (significance level) 은 $p < 0.05$ 로 설정되었다.

3. 결과

세포담체 제작. 본 연구에서의 세포담체는 Fig. 1 과 같이 PCL과 β -TCP를 혼합하여 용융 실린더에 주입한 후, 3 레이어의 세포담체를 제작하였으며, 레이어간에는 콜라겐 나노파이버를 방사하였다. 이에 따라, PCL/ β -TCP (0, 20, 40 wt %) 의 재료 혼합비를 갖으며, 콜라겐 나노파이버가 결합된 세포담체를 제작하였다. β -TCP의 혼합량이 40 wt% 이상일 경우에, 용융 실린더에서 토출되어 나오는 노즐 팁(nozzle tip)에서 막힘 현상이 발생되어 세포담체를 제작의 어려움이 있었기 때문에 β -TCP 혼합량은 40 wt% 이하로 제작하였다.

EDS 분석. 일반적으로, PCL과 β -TCP를 혼합하여 압출할 경우, β -TCP의 함량이 높아질수록 swelling이 커지며 노즐의 직경이 작을수록 노즐 막힘 현상이 나타나기도 한다. 따라서, 바이오 플로터 노즐의 이동속도, 용융 온도, 재료의 혼합 상태 및 함량, 압출 압력 등 최적화된 공정 조건이 요구된다.^{32,33} 이에 따라, Fig. 2 (a) 의 분석 결과와 같이 strut과 기공의 크기를 각각 약 300 μ m로 제작하기 위해 용융온도 약 115 $^{\circ}$ C, 노즐 직경 350 μ m로 고정시키고, 노즐의 이속 속도에 따른 strut과 기공의 크기를 제어하였다. Fig. 2 (b), (c)는 β -TCP 40 wt%의 혼합량을 갖는 strut의 단면을 자른 후, 전자주사 현미경과 EDS를 측정 분석한 결과로서 PCL과 β -TCP의 함량이 strut 내부, 중간부, 외부에 균일하게 섞여 있음을 확인하였다.

마이크로 크기의 PCL / β -TCP strut 직경은 패속조형 공정을 이용한 용융-플로터 노즐의 이동속도 조절에 따라 세밀하고 다양한 두께로의 제작이 가능하였다. 합성 고분자 물질을 용융시키는 플로팅 시스템은 strut 직경 크기가 아주 주요한 공정 변수가 된다. Strut 크기에 따라 기공 크기가 정해지며, 노즐 (nozzle) 을 통해 압출된 액체 상태의 고분자물질이 노즐 팁에서 swelling 현상이 생기기 때문이다. 이 밖에도, 노즐 팁

의 직경 크기와 PCL과 β -TCP의 함량에 따라서 die-swelling 현상 차이가 발생한다.

콜라겐 나노파이버의 크기 분석. Fig. 3 (a), (b), (c)는 제작된 세포담체의 실제 모습으로서, β -TCP의 함량변화와 콜라겐 나노파이버의 결합 유무에 따라 세포담체의 내/외부의 형태 및 구조가 다르지 않았으며, 주사전자현미경 측정을 통해 콜라겐 나노파이버가 공극 내부에 균일하게 결합되었음을 관찰 할 수 있었다. Fig. (d), (e)와 같이 전기방사 공정을 통해 제작된 콜라겐 나노파이버의 직경은 평균 160 ± 80 nm, 나노파이버의 공극 크기는 평균 $3.37 \pm 1.32 \mu\text{m}$ 로 확인하였다. 조골세포의 크기가 약 $10 \mu\text{m}$ 크기를 갖기 때문에 콜라겐 나노파이버의 공극 크기가 $10 \mu\text{m}$ 이상을 갖게 되면 세포가 파이버 공극 사이로 빠져나가버리기 때문에 공극 크기를 일정 크기 이하로 제어하는 것도 매우 중요하다.

순수 PCL 및 β -TCP가 결합된 세포담체, 이에 콜라겐 나노파이버의 결합 유무에 대한 제작된 세포담체의 세밀한 관찰을 위해 주사전자현미경을 이용하였다 (Fig. 4). strut의 직경과 공극의 크기가 각각 약 $300 \mu\text{m}$ 로서 제작 계획한 치수로 잘 제작되었고, β -TCP의 혼합량이 높아질수록 세포담체의 표면의 형태가 거칠어진 것으로 관찰되었다. 이는 PCL과 β -TCP 재료가 노즐을 통해 토출되어 나올 때 다소 뭉쳐있는 β -TCP 입자에 의한 현상으로 생각된다. Fig. 4 (k, l)는 세포담체의 레이어와 레이어 사이에 콜라겐 나노파이버가 잘 결합되어 있는 모습이다.

XRD 분석. 순수 PCL과 β -TCP, P/ β -TCP 세포담체의 XRD 패턴을 관찰하였다 (Fig. 5). PCL은 2θ 의 21.4° 와 23.8° 영역에서 과장의 변화가 가장 크다. 이는 사방정계 단위포 (orthorhombic unit cell) 파라미터를 갖는 polyethylene-like 결정구조 면에서의 반사 (110, 200) 가 이루어졌음을 의미한다.^{34,35} β -TCP의 경우는 2θ 의 32.5° 영역에서 과장의 변화가 가장 큰 것으로 나타났고, Fig. 5 (b), (c) 와 같이 β -TCP의 함량이 높아질수록 β -TCP의 고유 영역의 과장이 더 높게 변화하였으며, PCL의 함량이 높

아질수록 PCL의 고유 영역의 파장이 더 높아지는 것으로 보아 PCL과 β -TCP의 함량비에 따른 제작이 잘 되었음을 확인하였다.

FT-IR 분석. 제작된 세포담체를 FT-IR을 통하여 분석하였다. S. Park 연구팀에 의하면 콜라겐의 화학적 구조는 주로 아마이드 그룹으로 이루어져 있으며, ECD 경화 후의 콜라겐의 화학적 구조는 경화 전과 비교하여 구조적인 변화는 없지만 Intensity가 다소 감소하는 것으로 알려져 있다.³⁶ 콜라겐 경화 전의 IR 측정 그래프에서는 콜라겐의 주 아마이드 그룹인 the amide I (1635 cm^{-1}), amide II ($1536, 1458\text{ cm}^{-1}$) and amide III bands ($1211, 1235, 1268\text{ cm}^{-1}$) 로 구성되어 있음을 확인하였다. ECD 경화 후 아마이드 그룹인 amide I, amide II bands의 intensity 감소가 다소 있었으나, 콜라겐의 다양한 function 의 구조적인 큰 변화는 관찰되지 않았다. 때문에 EDC에 의한 콜라겐 나노파이버의 경화가 잘 이루어졌음을 확인하였다.

Wettability. 조직공학에서 수분 흡수 (water-absorption) 는 세포담체의 세포 증식 및 영향을 주는 필수 요구조건이다.⁴ 세포담체 내부에서의 혈류 유동과 세포들에게 필요한 영양분 및 대사물질들의 원활한 공급에 영향을 미치는 주요 요소이기 때문이다. A. Yeo 연구팀에 의하면 β -TCP는 생체활성 세라믹스로서, 순수 합성 고분자에 비해 더 높은 친수성 특성을 갖는 것으로 알려져 있다.³⁷ Fig. 7은 제작된 세포담체에 대한 수분 흡수율을 관찰한 것으로서, Pure PCL로 제작된 세포담체에 비해 40 wt% 함량의 β -TCP 세포담체는 약 80 %, 이에 콜라겐 나노파이버가 결합된 세포담체는 약 160 % 더 높은 것으로 관찰되었다. 다소 소수성(hydrophobic)의 특성을 갖는 PCL과 비교하여, β -TCP 및 콜라겐은 친수성(hydrophilic) 특성을 갖기 때문에 세포담체의 흡수율이 더 증가한 것으로 보인다.

친수성 특성 분석. 친수성 특성이 조골세포의 초기 부착 및 증식에 영향을 끼친다고 연구 보고되고 있다. 따라서 표면의 화학적 개질상태³⁸ 및 물리적 패턴에³⁹ 변화를 주어

세포담체의 친수성을 증가시키기 위한 방법도 연구되고 있다. 세포 접착 단백질⁴⁰이나 poly(vinyl alcohol)⁴¹, β -TCP와 같은 물질을 혼합(blending) 및 합성 (composite)하여 세포담체의 친수성을 증가시키는 연구도 활발히 진행 중이다.³⁷ Fig. 8 (f) 와 같이 순수 PCL에 비해 40 wt%의 β -TCP와 콜라겐 나노파이버가 결합된 세포담체가 비교적 더 낮은 수분접촉각 (water contact angle)을 갖는 것으로 확인되었다. 이에 따라, PCL/ β -TCP (40 w%)/콜라겐 나노파이버 세포담체는 세포 배양 실험시 조골세포의 초기 부착률이 더 증가할 것으로 보인다.

기계적 강도. 세포담체는 조직 재생에 있어서 외부 응력에 따라, 그에 대응하는 기계적 강도를 형성할 수 있어야 한다.^{42,43} β -TCP를 비롯한 바이오세라믹스는 우수한 골 전도 특성으로 인해 골 조직 재생 분야에 활발히 사용되는 물질이다. 하지만, 실제 뼈와 비교하여 낮은 취성 등 물성의 결점이 있다. 마찬가지로, 콜라겐은 우수한 골 전도 (osteo induction) 특성을 지니지만 자체만으로는 낮은 기계적 특성의 한계가 있다. 따라서 높은 유연성 및 기계적 강도를 특성을 지닌 PCL을 혼합하여 각각의 결점을 보완한 PCL/ β -TCP/콜라겐 나노파이버 세포담체를 제작하였다.

Fig 9. 는 제작된 세포담체를 인장속도 2.0 mm/s의 인장속도로, 탄성계수 (Young's modulus) 를 나타낸 결과이다. 세포담체의 콜라겐 나노파이버의 결합 유무에 따른 기계적 강도의 차이는 아주 미미하였다. 이는 세포담체 내부에 결합된 나노파이버의 부피 량이 아주 낮기 때문에 기계적 강도에 대한 영향은 없었다. 반면에 β -TCP의 혼합량이 높아질수록 기계적 강도는 향상되었는데, 이는 복합재료인 β -TCP의 함량이 늘어날수록, 분산이 잘 일어날수록, 고분자에서 정렬 (alignment)이 향상될수록 인장강도 (tensile strength)와 인장탄성율 (tensile modulus)이 증가된다는 Haplin-Tsai 이론⁴⁴과 같이 β -TCP의 혼합량이 증가함에 따라 기계적 물성이 향상된 것으로 사료된다.

세포실험 (in vitro). 제작된 세포담체의 세포실험은 osteoblast like-cells (조골세포,

MG-63)을 접종 (seeding)하였으며, MTT-assay test를 1, 3, 7일차에 걸쳐 세포 증식률을 관찰하였다. 일반적으로 osteoblast 계열의 세포는 약 300 μm 정도의 공극 크기에서 세포의 증식률이 높은 것으로 알려져 있으며, 세포담체는 이러한 최적의 공극 크기를 만족시키는 것이 중요하다.⁴⁵

세포담체 내외부에서의 조골세포의 증식 정도를 확인하기 위해 조골세포를 7일간 배양한 세포담체를 주사전자현미경과 EDS 분석 장비로 관찰하였다 (Fig. 10). 순수 PCL로 이루어진 세포담체에 비해 40 wt%의 β -TCP와 콜라겐 나노파이버가 결합된 세포담체의 표면 및 공극에서 더 높은 세포의 증식률을 확인하였다. EDS 분석에서도 순수 PCL 세포담체의 세포는 calcium (Ca) 과 phosphate (P)의 과장이 검출되지 않는 반면에 40 wt%의 β -TCP와 콜라겐 나노파이버가 결합된 세포담체의 세포는 Ca : 1.49 %, P : 2.05 %로 관찰되었으며, 이는 조골세포의 증식뿐만 아니라 분화도가 보다 더 향상된 것으로 판단된다.

4. 결론

본 연구에서는 쾌속조형 시스템과 전기방사 공정을 이용하여 PCL에 β -TCP를 각각 0, 20, 40 wt%로 혼합하고, 콜라겐 나노파이버를 결합한 세포담체를 제작하였다. 세포담체의 β -TCP 혼합량이 증가할수록 세포담체의 친수성 및 기계적강도, 표면 특성, 골조직의 증식 및 분화의 향상되었다. 이는 β -TCP의 우수한 생체적합성 및 친수성, 골전도 (osteo conduction) 특성 등에 기인한 것으로 판단된다. 또한, 콜라겐 나노파이버를 세포담체 내부의 공극에 결합함으로써 수분 흡수율 및 더 높은 조골세포의 증식률이 향상되었음을 확인하였다. β -TCP와 콜라겐 나노파이버가 결합된 세포담체는 보다 다양한 재료와 공정을 융합함에 따라, 골 조직 재생을 위한 최적화된 세포담체로의 연구가 가능하리라 사료된다.

5. 참고문헌

- (1) Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 260, 920, 1993.
- (2) Kretlow JD, Mikos AG. From material to tissue: biomaterial development, scaffold fabrication, and tissue engineering. *AIChE J* 52, 3048, 2008.
- (3) Sachlos E, Czernuszka JT. Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur Cel Mater* 5, 29, 2003.
- (4) Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater* 4, 518, 2005.
- (5) Hing KA, Best SM, Tanner KE, Bonfield W, Revell PA. Mediation of bone ingrowth in porous hydroxyapatite bone graft substitutes. *J Biomed Mater Res A* 2004, 68, 187.
- (6) Whang K, Healy KE, Elenz DR, Nam EK, Tsai DC, Thomas CH, Nuber GW, Glorieux FH, Travers R, Sprague SM. Engineering Bone Regeneration with Bioabsorbable Scaffolds with Novel Microarchitecture. *Tissue Eng* 5, 35, 1999.
- (7) Salerno A, Guarnieri D, Iannone M, Zeppetelli S, Netti PA. Engineered μ -bimodal poly(ϵ -caprolactone) porous scaffold for enhanced hMSC colonization and proliferation. *Tissue Eng Part A*. 16, 2661, 2010.
- (8) Yao D, Smith A, Chaudhry GR, Nagarajan P, Vasquez A, Dang LJ. Fabrication of polycaprolactone scaffolds using a sacrificial compression-molding process. *Biomed Mater Res B* 77, 287, 2006.
- (9) Hutmacher DW, Sittinger M, Risbud M, Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *Trends Biotechnol* 22, 354, 2004.
- (10) Moroni L, Schotel R, Hammann D, de Wijn JR, van Blitterswijk CA. 3D fiber-deposited electrospun integrated scaffolds enhance cartilage tissue formation. *Adv Funct Mater* 18, 53, 2008.
- (11) Yoon H, Ahn SH, Kim GH. Three-dimensional polycaprolactone hierarchical

- scaffolds supplemented with natural biomaterials to enhance mesenchymal stem cell proliferation. *Macromolecular Rapid Commun* 30, 1632, 2009.
- (12) Sachlos E, Reis N, Ainsley C, Derby B, Czernuszka JT. Novel collagen scaffolds with predefined internal morphology made by solid freeform fabrication. *Biomaterials* 24, 1487, 2003.
 - (13) Jiankang H, Dichen L, Yaxiong L, Bo Y, Hanxiang Z, Qin L, Bingheng L, Yi L. Preparation of chitosan - gelatin hybrid scaffolds with well-organized microstructures for hepatic tissue engineering. *Acta Biomater* 5, 453, 2009.
 - (14) Fong H, Chun I, Reneker DH. Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer* 40, 4585, 1999.
 - (15) Jin HJ, Chen J, Karageorgiou V, Altman GH, Kaplan DL. Human bone marrow stromal cell responses on electrospun silk fibroin mats. *Biomaterials* 25, 1039, 2004.
 - (16) Huang Jiaxing, Kaner RB. Nanofiber Formation in the Chemical Polymerization of Aniline: A Mechanistic Study. 116, 5941, 2004.
 - (17) Mo XM, Xu CY, Kotaki M, Ramakrishna. Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation. *Biomaterials* 25, 1883, 2004.
 - (18) Formhals A, Process and apparatus for preparing artificial threads. US Patent, 1, 975, 504, 1934.
 - (19) Taylor GI. Disintegration of water drops in an electric field. *Proc R Soc Lond A*. 280, 383, 1964.
 - (20) Taylor GI. Electrically driven jets. *Proc R Soc Lond A*. 313, 453, 1969.
 - (21) Doshi J, Reneker DH, Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *J Electrostatics* 35, 151, 1995.
 - (22) Kim GH, Kim WD. Highly porous 3D nanofiber scaffold using an electrospinning technique. 81, 104, 2007.
 - (23) Kim GH, Park JH, Park SA. Surface-treated and multilayered poly(ϵ -caprolactone) nanofiber webs exhibiting enhanced hydrophilicity. *J Polymer*

- Sci Part B: Polymer Physics 45, 2038, 2007.
- (24) Klein CP, Driessen AA, de Groot K, van den Hooff A. Biodegradation behavior of various calciumphosphate materials in bone tissue. *J Biomed Mater Res* 17, 769. 1983.
- (25) Ravaglioli A, Krajewski A. *Bioceramics: Materials, Properties and Applications*. Chapman and Hall: London (Book), 1992.
- (26) Pang L, Hu Y, Liu L, Xiong Z, Wei Y, Bai J. Surface modification of PLGA/ β -TCP scaffold for bone tissue engineering: Hybridization with collagen and apatite. *Surface and Coatings Technology* 201, 9549, 2007.
- (27) Miao X, Tan DM, Li J, Xiao Y, Crawford R. Mechanical and biological properties of hydroxyapatite/tricalcium phosphate scaffolds coated with poly(lactic-co-glycolic acid). *Acta Biomater* 4, 638, 2008.
- (28) Yeo A, Sju E, Rai B, Teoh, SH. Customizing the degradation and load-bearing profile of 3D polycaprolactone-tricalcium phosphate scaffolds under enzymatic and hydrolytic conditions. *J Biomed Mat Res Part B*. 84, 208, 2008.
- (29) 이종식, 최석규, 류경호, 박광범, 장제희, 이재목, 서조영, 박진우, 삼차원적으로 연결된 미세다공성 구조를 가진 이상인산칼슘 골이식재의 골치유에 관한 조직계측학적 평가. *대한치주과학회지* 38, 117, 2008.
- (30) Bucholz RW, Carlton A, Holmes RE. Hydroxyapatite and tri-calcium phosphate bone graft substitutes. *Orthop Clin North Am* 18, 323, 1987.
- (31) Yeo MG, Lee H, Kim GH. 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, 502, 2011.
- (32) Yoon H, Ahn SH, Kim GH. Three-Dimensional Polycaprolactone Hierarchical Scaffolds Supplemented with Natural Biomaterials to Enhance Mesenchymal Stem Cell Proliferation. *Macromol Rapid Commun* 30, 1632, 2009.
- (33) Lee H, Kim GH. Three-dimensional plotted PCL/ β -TCP scaffolds coated with a collagen layer: preparation, physical properties and in vitro evaluation for bone

- tissue regeneration. *J Mater Chem* 21, 6305, 2011.
- (34) Bittiger H, Marchessault RH, Niegisch WD. Crystal structure of poly- ϵ -caprolactone. *Acta Crystallogr Sect B: Struct Sci* 26, 1923, 1970
 - (35) Kim GH, Yoon H. A direct-electrospinning process by combined electric field and air-blowing system for nanofibrous wound-dressings. *Appl Phys Lett* 93, 23127, 2008.
 - (36) Park SN, Park JC, Kim HO, Song MJ, Suh H. Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide cross-linking. *Biomaterials* 23, 1205, 2002.
 - (37) Yeo A, Wong WJ, Teoh SH Surface modification of PCL TCP scaffolds in rabbit calvaria defects: Evaluation of scaffold degradation profile, biomechanical properties and bone healing patterns. *J Biomed Mater Res* 93, 1358, 2010.
 - (38) Schneider GB, English A, Abraham M, Zaharias R, Stanford C, Keller J. The effect of hydrogel charge density on cell attachment. *Biomaterials* 2004, 25, 3023.
 - (39) Kalbacova M, Michalikova L, Baresova V, Kromka A, Rezek B, Kmoch S. Adhesion of osteoblasts on chemically patterned nanocrystalline diamonds. *Phys Status Solidi B* 245, 2124, 2008.
 - (40) Mooney DJ, Park S, Kaufmann PM, Sano K, McNamara K, Vacanti JP, Langer R. *J Biomed Mater Res* 29, 959, 1995.
 - (41) Kim CH, Khil MS, Kim HY, Lee HU, Jahng KY. An improved hydrophilicity via electrospinning for enhanced cell attachment and proliferation. *J Biomed Mater Res Part B* 78 283 2006.
 - (42) Wang XH, Li DP, Wang WJ, Feng QL, Cui FZ, Xu YX, Song XH, Werf MVD, Crosslinked collagen/chitosan matrix for artificial livers. *Biomaterials* 24, 3213, 2003.
 - (43) Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21, 2529, 2000.
 - (44) Halpin JC, Kardos JL. The Halpin-Tsai equations: A review *Polym Eng Sci* 16,

344, 1976.

- (45) Lee JW, Ahn G, Kim JY, Cho DW. Evaluating cell proliferation based on internal pore size and 3D scaffold architecture fabricated using solid freeform fabrication technology. *J Mat Sci: Mater Med*, 21, 3195, 2010.

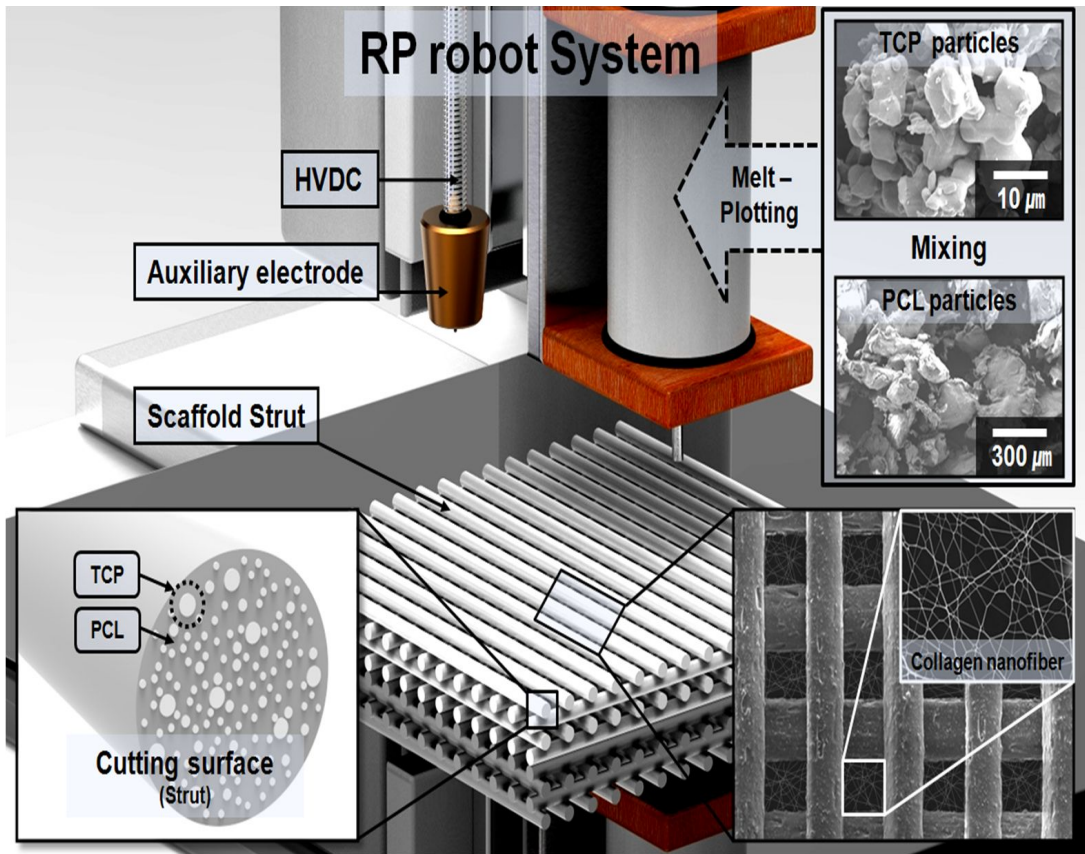


Fig. 1 Schematic of fabrication processes for producing composite scaffolds and hierarchical scaffolds that consist of PCL, β -TCP particles, and electrospun collagen nanofibers.

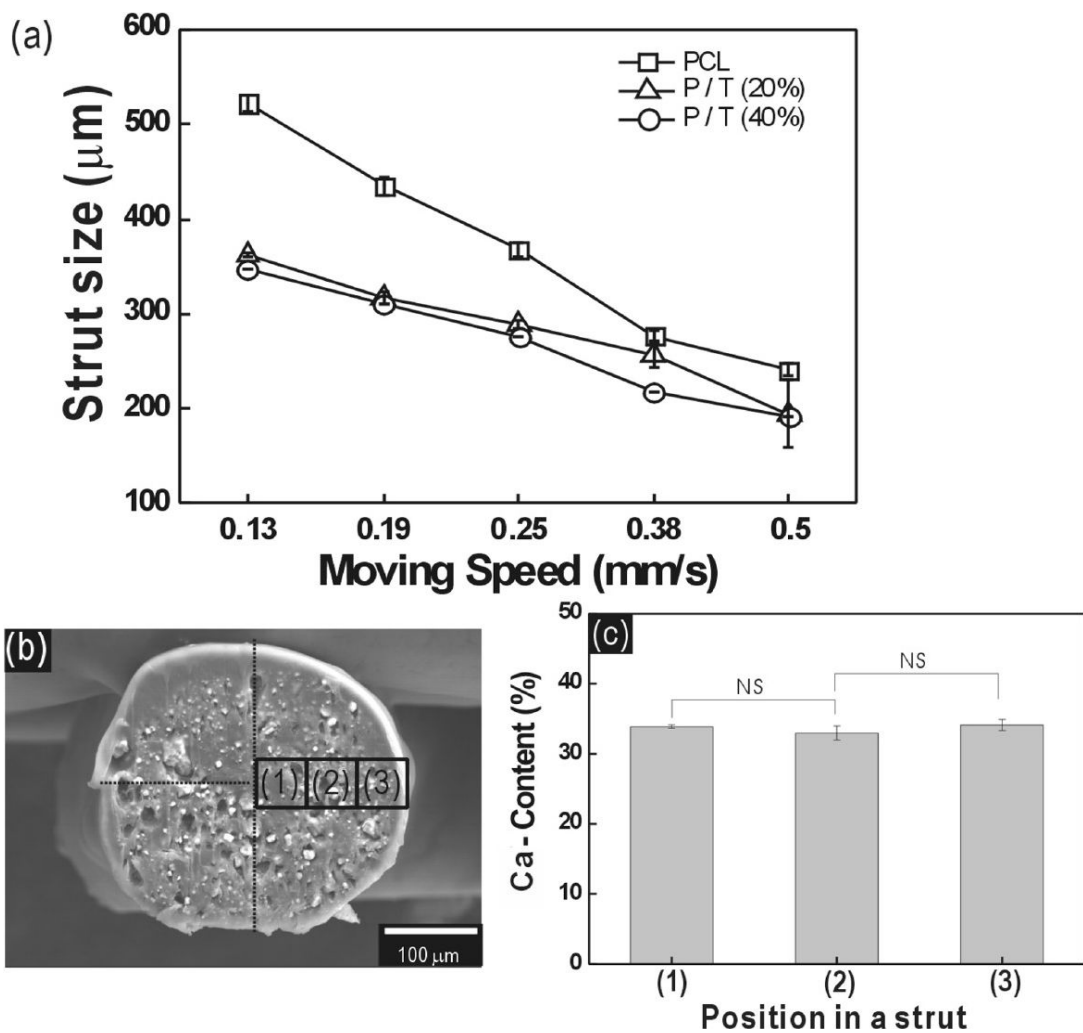


Fig. 2 (a) Diameter differences of struts for various weight percents of β -TCP and nozzle speeds. (b) Typical SEM image of a cross section of PCL/ β -TCP (40 wt %). (c) Ca^{2+} content (%) at various positions in a strut (PCL/ β -TCP 40 wt %). NS indicates nonsignificance.

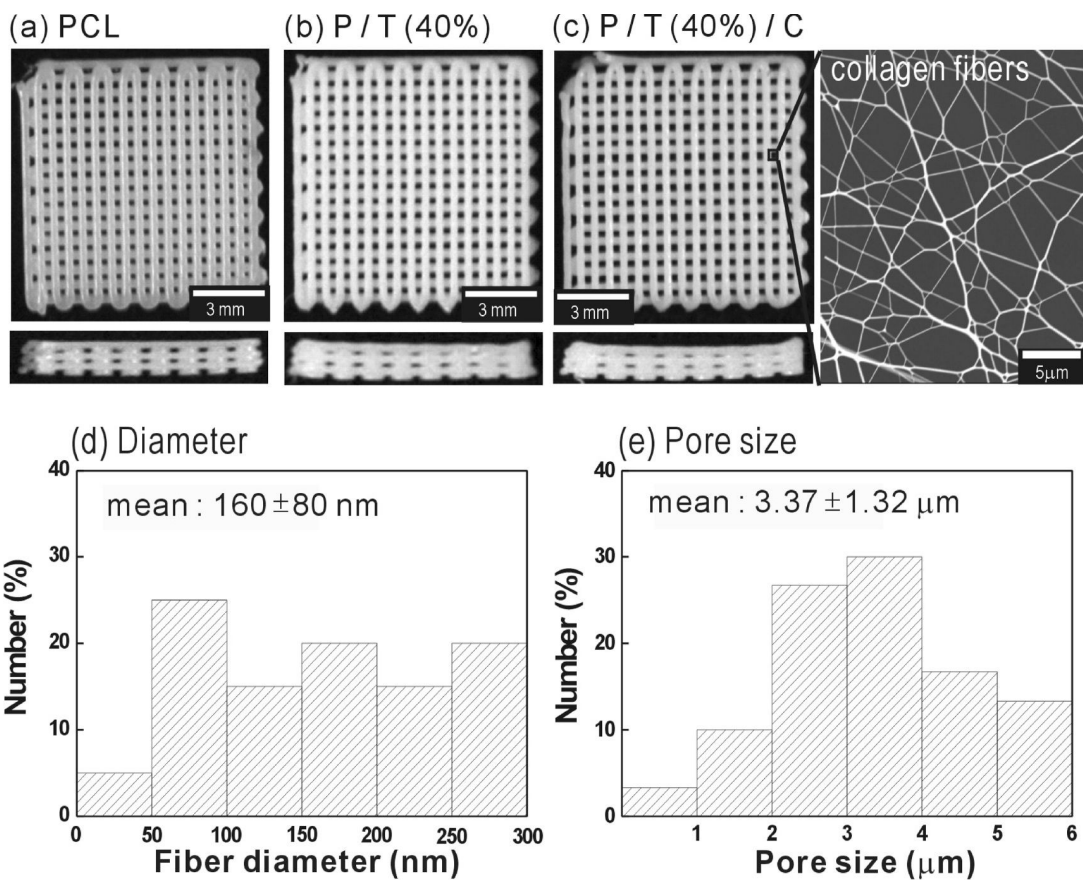


Fig. 3 Optical and scanning electron microscope images of (a) a PCL scaffold fabricated using a normal plotting system (the lower picture shows the side of the scaffold), (b) the composite scaffold (P/T-40%) consisting of PCL and 40 wt % β -TCP, and (c) the hierarchical composite scaffold (P/T-40%/C; the magnified pictures show collagen fibers between the PCL/TCP composite struts). (d) Size distribution of electrospun collagen fibers in the hierarchical scaffold. (e) The pore-size distribution consisted of collagen fibers within the pores of the scaffold.

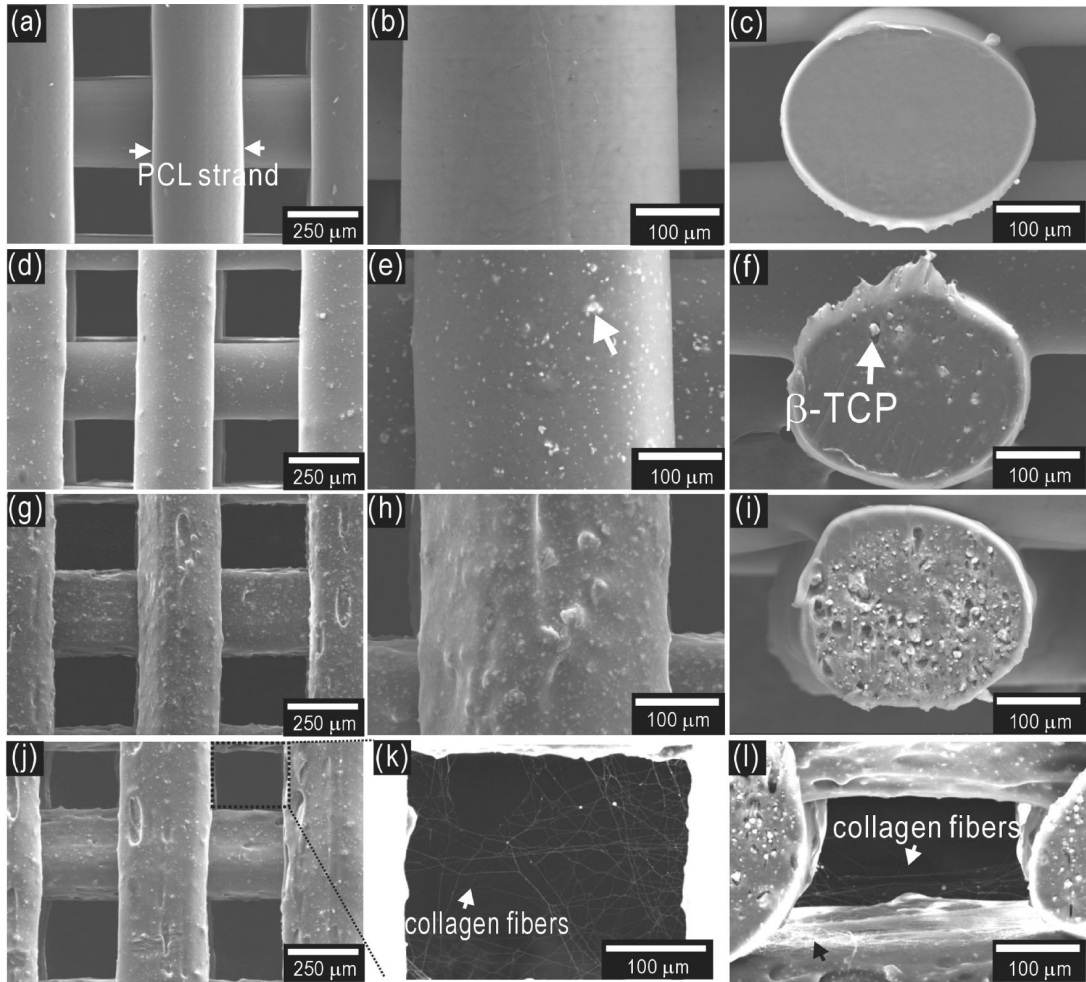


Fig. 4 SEM images of (a) a PCL scaffold fabricated using the melt-plotting system and (b) surface and (c) cross section of a strut; (d-f) a composite scaffold (PCL and 20 wt % β -TCP); (g-i) a composite scaffold consisting of PCL and 40 wt % β -TCP; (j-l) a hierarchical composite scaffold with collagen nanofibers (the magnified pore shows the collagen nanofibers set between struts).

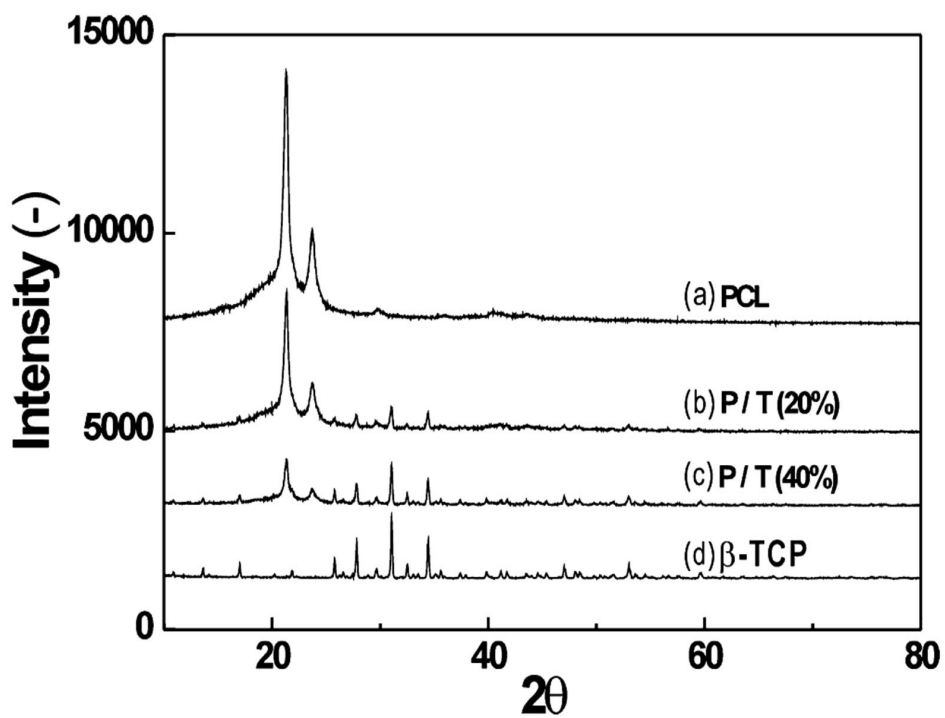


Fig. 5 X-ray diffraction (XRD) patterns of the pure PCL and PCL composites for various weight percents of β -TCP: (a) pure PCL, (b) PCL/TCP (20 wt %), (c) PCL/TCP (40 wt %), and (d) pure TCP.

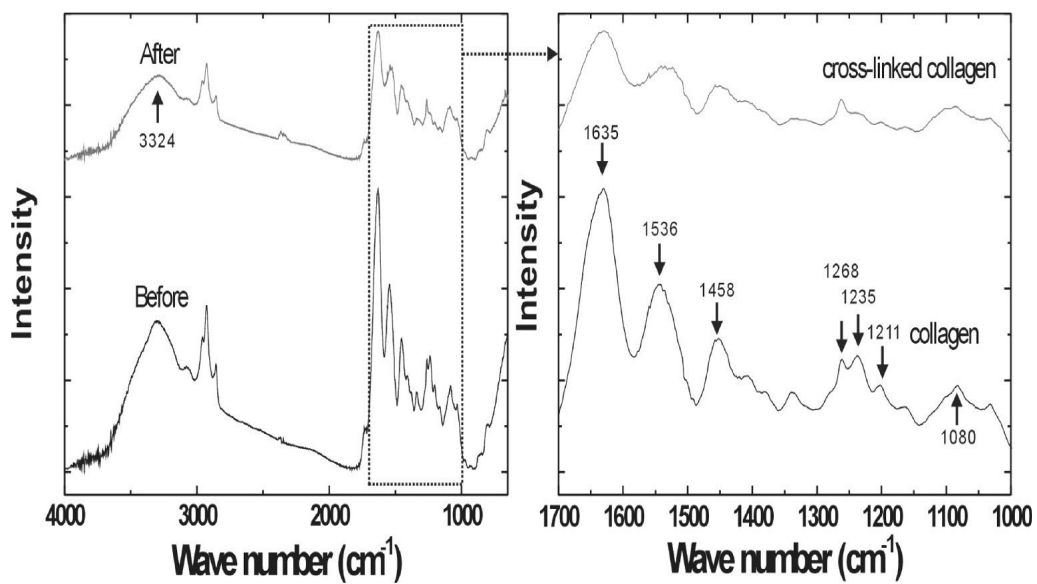


Fig. 6 FT-IR spectra of collagen nanofibers of the hierarchical composite scaffold before and after cross-linking with EDC solution.

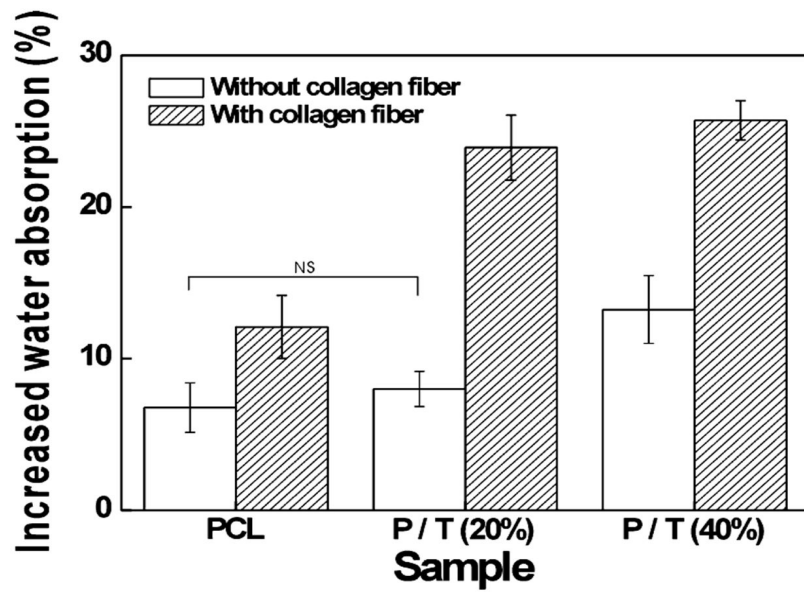


Fig. 7 Water absorption of pure PCL and PCL/ β -TCP (P/T) composite scaffolds with and without collagen nanofibers. NS indicates nonsignificance.

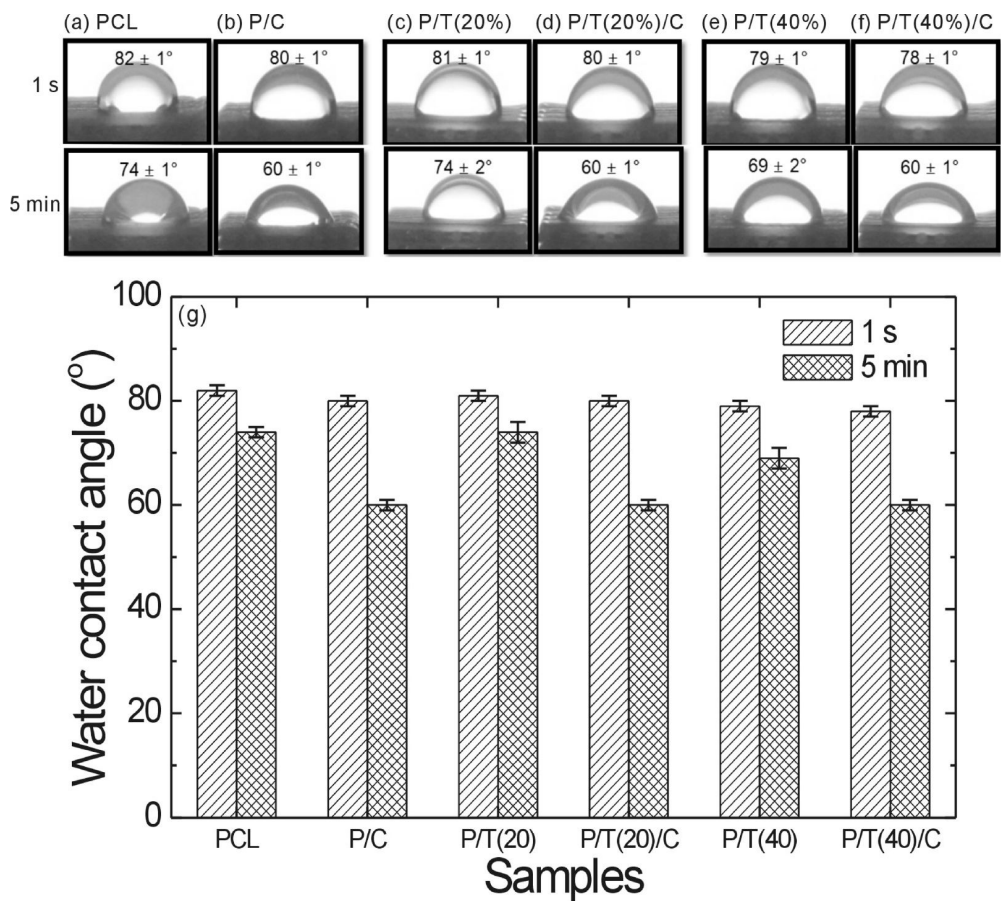


Fig. 8 WCA of the PCL, composites (P/T), and hierarchical composite scaffolds (P/T/C). (a-f) Water droplets at two time points (1 s and 5 min) for various scaffolds. (g) Comparisons of the WCAs of the various scaffolds.

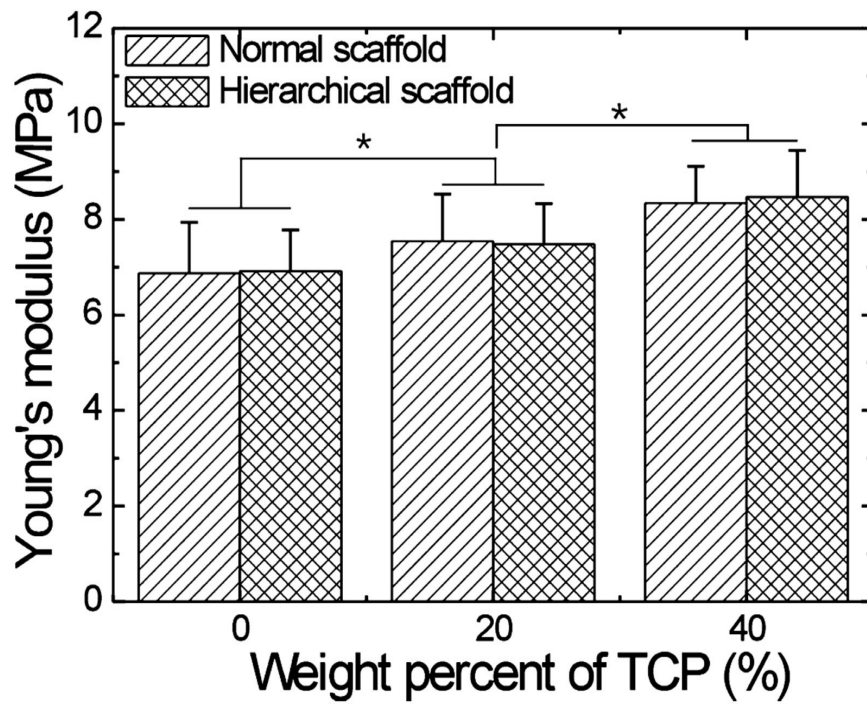


Fig. 9 Comparison of Young's modulus between PCL and composite scaffolds (n = 5).

scaffold	porosity (%)	Young's modulus (MPa)
PCL	55.8	6.87 ± 1.07
PCL/collagen	55.2	6.92 ± 0.86
PCL/TCP (20 wt %)	55.1	7.54 ± 0.99
PCL/TCP (20 wt %)/collagen	54.7	7.48 ± 0.85
PCL/TCP (40 wt %)	55.4	8.34 ± 0.77
PCL/TCP (40 wt %)/collagen	54.1	8.47 ± 0.97

Table 1 Comparison of Young's modulus between PCL and composite scaffolds (n = 5).

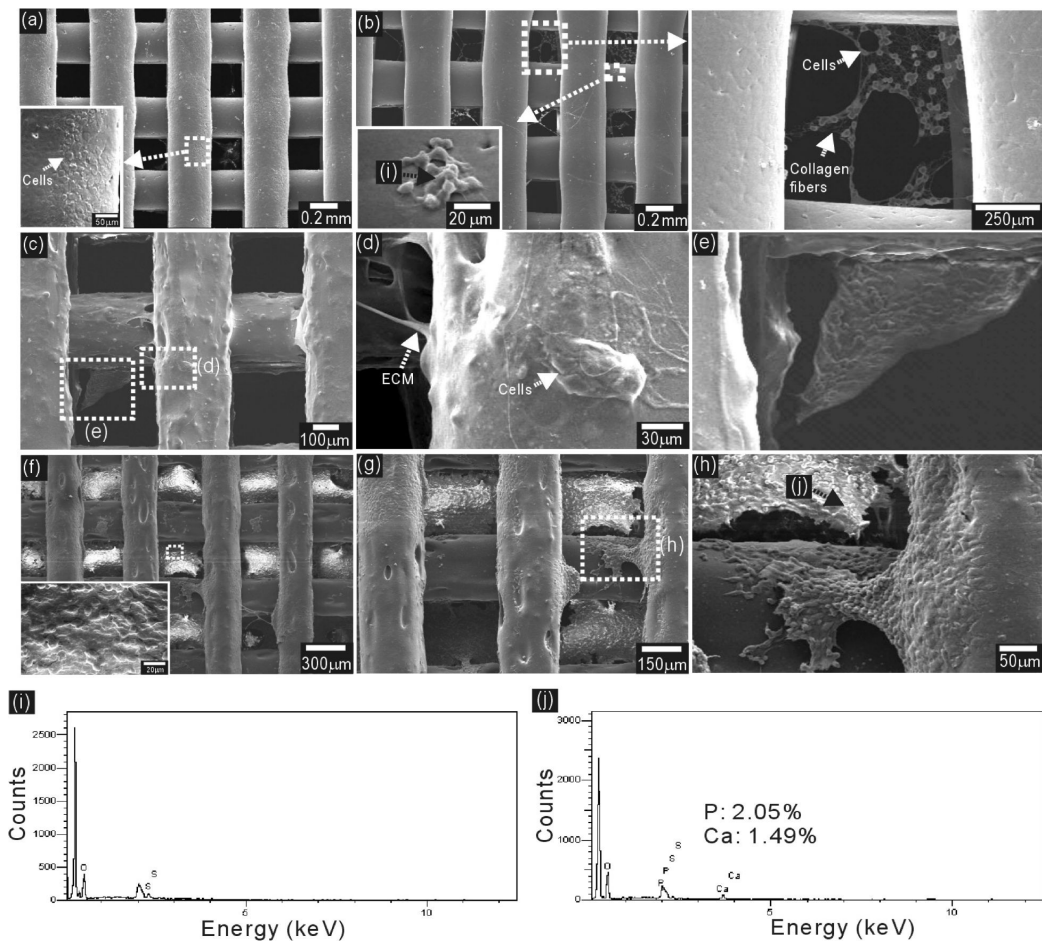


Fig. 10 SEM micrographs of MG-63 cells cultured on (a) a pure PCL scaffold, (b) hierarchical PCL scaffold with collagen fibers, (c-e) PCL/ β -TCP (40 wt %), and (f-h) a hierarchical composite scaffold consisting of PCL/ β -TCP (40 wt %) and collagen nanofibers after 7 days of cell culture. (i, j) EDX images for the hierarchical scaffolds without and with TCP.

제3장 실험 및 방법

제2절 PCL/ β -TCP/phlorotannin 세포담체 제작

1. 서론

해조류는 풍부한 다당류를 함유하며, 다양한 미네랄과 비타민이 풍부하게 함유되어 있다. 어떤 특정 성분에서는 항균, 항산화, 항바이러스, 항암활성을 비롯하여 동맥경화, 심근경색, 고혈압, 현심증, 뇌졸중 등의 성인병 예방에 효과적이라는 연구가 보고된바 있다.¹⁻⁴ 이중, 감태 (*ecklonia cava*)의 polyphenol인 phlorotannin은 식품으로서 뿐만 아니라 항산화성, 항암성, 항고혈압성 등 여러가지 기능성들이 밝혀짐으로써 새로운 바이오소재로 충분한 가치가 있다.⁵⁻⁹

감태 추출물인 Phlorotannin은 phloroglucinol을 기본 구성단위로 하는 폴리페놀화합물로서, 생리활성에 관한 연구로는 혈전생성 저해활성, 항산화활성, 심혈관 보호효과, 및 항 바이러스활성 등이 향상되었으며,¹⁰⁻¹² ALP (Alkaline phosphatase), 콜라겐, mineralization을 증가시킴으로써 osteoblast의 분화를 촉진시킨다고 보고되고 있다.^{13,14} 따라서, 본 연구에서는 골 조직 재생을 위한 쾌속조형 (SFF 시스템의 일종) 시스템과 코팅 공정을 융합하였다.

이에 따라, 향상된 골세포 증식/분화, 적절한 기공 크기와 공극률, 기계적 강도가 향상된 상호연결 구조의 PCL/ β -TCP 및 phlorotannin이 코팅된 3차원 세포담체를 제작하였다. 각각의 PCL/ β -TCP혼합비는 80 : 20 (wt %) 으로 동일하고, phlorotannin의 다양한 조성비 (1, 3, 5 wt %) 에 따른, 세포담체 내/외부에서의 친수성 등의 표면 특성 및 MG-63 (osteoblast-like cells) 의 생리활성 영향을 확인하였다.

2. 실험

2-1 재료

Phlorotannin (감태 추출물, Ecklonia cava Kjellman, 제주도) 과 Sigma-aldrich (U.S.A) 사의 PCL ($M_w = 60000$, density = 1.135g/cm^3), Fluka (U.S.A) 사의 β -TCP (density = 3.14 g/cm^3) 파우더 제품을 사용하였으며, β -TCP의 시료 크기는 100 nm~200 nm 로 측정되었다.

2-2 방법

세포담체 제작. 3차원 세포담체를 제작하기 위해, 용융 플로팅 시스템이 결합된 3축 로봇 시스템과 코팅 공정을 위한 침전법 (soaking method) 을 융합하였다. PCL과 β -TCP를 동결 분쇄기 (freezer-mill) 를 이용하여, 혼합비 (β -TCP = 20 wt %) 에 따라 재료를 파우더형태로 제작하였다. 이후, 3축 로봇 시스템의 용융 실린더에 주입하였고, 노즐 직경 크기 350 μm , 용융 온도 115 $^{\circ}\text{C}$, 압력 (pneumatic pressure) 600 kPa 로 압출하며, 다시 한 번 동결 분쇄기를 이용하여 파우더 형태로 제작하였다.

이는 PCL과 β -TCP가 고르게 혼합되어 strut에 균일하게 결합되도록 하는 공정이다.¹⁴ 준비된 PCL/ β -TCP 파우더를 3축 쾌속조형 시스템의 용융 실린더에 주입하고, 최적화된 공정 조건에 따른 3차원 형태의 다공성 세포담체를 제작하였다. 제작된 세포담체는 EtOH과 phlorotannin 용액 (solution) 에 침전법을 통한 phlorotannin 코팅 공정을 이용하였다.

세포담체 특성. 제작된 세포담체는 광학현미경 (Model BX FM-32; Olympus, Tokyo, Japan) 과 주사전자현미경 (SEM, Sirion, Hillsboro, OR, USA) 을 이용하여 관찰하였다. 또한, 세포담체 내/외부에 증식된 세포의 칼슘 (calcium) 과 인 (phosphate) 원소에 대한 정성분석을 위해서 EDS (Energy dispersive spectroscopy) 측정이 이루어졌다.

PCL struts 내부에 결합된 β -TCP의 정량/성 분석을 위해 WAXD (Wide-angle X-ray diffractometry) 를 이용, 단색화 (graphite monochromator) 한 봉입형 X선 튜브 (sealed-tube) 를 통해, 평행 복사Cu K α (1.542 Å), 40 kV, 200 mA로 회절분석기 (Model D/Max-2500, 18 kW; Rigaku, Tokyo, Japan) 를 사용하여 측정이 이루어졌다. 이와 더불어, 열천칭 (thermobalance) 에 의한 열중량 분석으로, 제작된 세포담체를 승온에 따른 중량변화를 측정하여 실질적인 정량분석을 실시하였다. 분석을 위해 TGA (model TGA2050, TA-Instrument, USA) 장치를 사용하였고, 샘플 질량 10 m, 가열 온도범위 50~800 °C , 20 °C/min 승온 속도로 측정하였다.

Strut에 코팅된 Phlorotannin의 화학적 분자구조 변화를 확인하기 위하여, FTIR (Fourier-transform infrared) (model 6700; Nicolet, West Point, PA, USA) 분석이 행해졌다. IR 스펙트라는 400~4000 cm⁻¹영역에서 평균 30 scan, 8 cm⁻¹변화 주기로, 동일 조건하에서 측정 비교하였다. Phlorotannin 코팅에 의한 3차원 형태의 strut 표면 거칠기 (roughness) 변화를 확인하기 위해서, 광위상 간섭법 (phase shifting interferometry)을 이용한 표면의 외곽과 거침을 측정하는 비접촉식 (noncontact) 광학 기술인 거칠기 측정기기 (model Nonoview-m4151p, South Korea) 로 분석이 이루어졌다.

수분 흡수율 (water uptake) 은 각각의 제작된 세포담체를 증류수 1 ml가 담긴 페트리 접시 (petri dish, 25 × 25 × 10 mm) 안에 침전 (soaking) 한 후, 2시간 전 후의 무

계 량을 측정하여 계산하였다.

$$W_{2h}(\%) = \frac{W_{2h} - W_o}{W_o} \times 100$$

수분 흡수율 측정방식은 X, Y, Li의 실험방법을 참조하였다.³² W_o 는 증류수에 넣기 전 인 초기의 세포담체 무게 량이며, W_{2h} 는 증류수에 침전 시키고 2시간 뒤의 수분 흡수 된 세포담체 무게 량이다. Phlorotannin 코팅 함량에 따른 세포담체의 기계적 강도 (mechanical properties) 를 측정하기 위해 건조된 세포담체를 인장모드 (tensile mode) 를 이용하여 측정하였다.

각각의 제작된 세포담체는 전자측경기 (digital caliper micrometer, model Ultracal III; sylvac, Bem, switzerland) 를 이용하여 5 mm × 15 mm × 3 mm 의 동일한 크기의 직사각형 형태로 잘라냈다. 분석에 사용된 장비는 UTM (model Top-tech 2000; Chemilab, Suwon, South Korea) 기기이며, 인장속도 (stretching speed) 2.0 mm/s의 인장하중을 가하여 세포담체의 응력-변형률 곡선 (stress-strain-curve) 을 측정하였다. 또한, 세포담체의 공극률 계산식은 다음과 같다.

$$Porosity(\%) = \left[1 - \left(\frac{\text{apparent density of scaffold}}{\text{true bulk density of scaffold}} \right) \right] \times 100$$

apparent density는 (실제 세포담체 무게) / (사각형태의 세포담체 체적) 으로 계산하였다.

세포담체의 세포 배양 실험. 본 연구에서 제작된 세포담체 내/외부에서의 세포 성장을 확인하기 위해 세포 배양 실험을 수행하였다. 6 mm × 6 mm × 1.5 mm 크기의 세

포담체를 70% 알코올에 침전 후, 자외선 (ultraviolet light) 에서 멸균 처리하였다. 실험에 사용된 세포는 osteoblast-like cells (MG-63; ATCC, Manassas, VA, USA) 이다. 충분한 세포 수를 확보하기 위해 5대 계대배양한 세포를 사용하였고, 시편당 1×10^5 cells을 접종 (seeding) 하였다.

배양액은 10 % 의 소태아혈청 (fetal bovine serum, Hyclone) 과 1%의 항생제 (penicillin, Hyclone) /스트렙토마이신 (streptomycin, Hyclone) 가 포함된 DMEM-HG (Dulbecco's modified Eagle's medium; Hyclone, Logan, UT, USA) 을 사용하였으며, 37 °C, 5 % CO₂인큐베이터에서 7일간 배양하였다. 또한, 2일마다 배지 (medium) 를 교체해주었다. 이후, osteoblast-like cells이 배양된 세포담체는 2.5 % 글루타르알데히드 (glutaraldehyde) 를 이용하여 세포를 고정하였고 탈수과정 및 백금 코팅 처리 후, 주사전자현미경을 이용하여 관찰하였다.

생세포 (viable cells) 는 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 분석 (Cell Proliferation Kit I; Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) 을 이용하여 정량분석이 이루어졌다. MTT 분석 (yellow tetrazolium salt MTT) 은 생세포에서 물에 녹지 않는 포르마잔 결정 (formazan crystal) 으로 환원되는데, 이 포르마잔을 DMSO로 녹여서 생성된 결정의 양을 분광학적인 방법으로 측정하게 된다. 분석을 위해 분광학기 (microplate reader, model EL800, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, U.S.A) 를 이용하였으며, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. (n=5)

통계 분석. 모든 데이터는 표준편차 (가 나타난다. 각 실험의 통계적 분석은 분산분석 (ANOVA) 에 따라 측정되었으며, 유의수준 (significance level) 은 $p < 0.05$ 로 설정되었다.

3. 결과

세포담체 제작. 마이크로 크기의 PCL / β -TCP strut 직경은, 이전 연구에서 용융-플로터 노즐의 이동속도 조절에 따라 세밀하고 다양한 두께로의 제작이 가능하였다. 합성 고분자 물질을 용융시키는 바이오플로팅 시스템은 strut 직경 크기가 아주 주요한 공정 변수가 된다. Strut 크기에 따라 기공 크기가 정해지며, 노즐 (nozzle) 을 통해 압출된 액체 상태의 고분자물질이 노즐 팁 (nozzle tip) 에서 swelling 현상이 생기기 때문이다. 이 밖에도, 노즐 팁의 직경 크기와 PCL과 β -TCP의 함량에 따라서 die-swelling 현상 차이가 발생한다.

일반적으로, PCL과 β -TCP를 혼합하여 압출할 경우, β -TCP의 함량이 높아질수록 swelling이 커지며 노즐의 직경이 작을수록 노즐 막힘 현상이 나타나기도 한다. 따라서, 바이오 플로터 노즐의 이동속도, 용융 온도, 재료의 혼합 상태 및 함량, 압출 압력 등 최적화된 공정 조건이 요구된다.¹⁵⁻¹⁸ 이에 따라, strut과 기공의 크기를 각각 약 300 μ m로 제작하기 위해 용융온도 115 ± 4 °C, 노즐 직경 350 μ m, 압출 압력 550 ± 25 kPa, 노즐 속도 0.23 mm/s의 공정조건을 확립하였다.

본 연구에서의 세포담체는 Fig. 1 (a)와 같이 PCL/ β -TCP (20 wt %) 의 재료 혼합비를 갖는다. 제작된 세포담체는 각각 phlorotannin (1, 3, 5 wt %) 과 EtOH이 혼합된 솔루션에 1시간 침전 코팅한 후, clean bench 내에서 24시간 자연건조 하였다. Fig. 2 (a)는 제작된 세포담체의 실제 모습이며, phlorotannin의 함량이 증가함에 따라 점차 검갈색으로 색이 짙어졌음을 확인하였다. phlorotannin 함량에 따라 약간의 차이가 있었지만, 비교적 일정한 약 54 %의 공극률과 300 μ m의 strut 및 기공 크기를 보였다 (Table 1). phlorotannin이 균일하게 코팅되어 있음을 확인하기 위해 SEM 통해 관찰하였다. Fig. 3 (b)와 같이 세포담체 표면에 phlorotannin이 균일하게 코팅되어 있음을 확인할 수 있었다.

Fig 4. 는 PCL, β -TCP, phlorotannin, PT/Phlorotannin 세포담체의 XRD 패턴을 나타낸다. PCL은 2θ 의 21.4° 와 23.8° 영역에서 파장의 변화가 가장 크다. 이는 사방정계 단위포 (orthorhombic unit cell) 파라미터를 갖는 polyethylene-like 결정구조 면에서의 반사 (110, 200) 가 이루어졌음을 의미한다.¹⁹ 제작된 세포담체의 경우, 2θ 의 32.5° 영역에서 큰 파장 변화를 갖는 β -TCP와 PCL의 peak가 모두 나타남에 따라, PCL과 β -TCP가 서로 잘 결합되어 있음을 확인할 수 있었다. 하지만, 순수 phlorotannin의 경우 결정성 물질이 아닌 무정형 물질이기 때문에 intensity의 변화는 나타나지 않았다.

TGA 분석 (Thermogravimetric analysis). Phlorotannin 함량 변화에 따라 제작된 세포담체의 실질적인 정량 분석을 위해 TGA가 이루어졌다. 앞서 분석되었던 XRD의 결과처럼, phlorotannin의 intensity의 변화가 나타나지 않아 세포담체의 구성 물질에 대한 혼합량 분석의 한계가 있었다. 이에 따라, 승온에 따른 시료의 질량변화 (changes in mass) 를 온도의 함수로써 측정이 가능한 TGA를 이용하였으며, Fig. 5는 각각의 시료 및 구성 물질들을 측정한 그래프이다.

그래프의 X-축은 가열온도를, Y-축은 무게율을 나타내는데, 50에서부터 800°C 범위로 측정하였다. Figs 5. (c)~(f)는 phlorotannin 함량 변화에 따라 제작된 세포담체를 나타내며, phlorotannin의 코팅 함량이 증가되면 무게율도 비례하여 증가하였다. 이는 세포담체가 동일 함량의 PCL과 β -TCP로 구성되었지만, 각각의 strut 표면에 코팅된 phlorotannin이 기인한 것으로 보인다.

표면 거칠기 분석. 일반적으로, 세포담체의 표면 거칠기는 세포의 초기부착 (initial cell attachment) 과 증식 (proliferation) 에 큰 영향을 미친다. Schmidt. 연구팀은 포토 리소그래피 (photolithography) 공정을 이용한 나노 구조의 표면 (높이 = 380 ± 460 nm) 을 제작하여 표면 거칠기 변화에 대한 세포 거동을 관찰한바 있다.²⁰ Wan.연구팀에 의하면 매끄러운 poly (L-lactic acid (PLLA) 와 polystyrene (PS) 에 비해 PLLA

/ PS 의 표면에 나노 (0.45 μm) 와 마이크로 크기 (2.2 μm) 의 표면 패턴 거칠기가 있는 시료에서 osteoblast like-cells 접착 (adhesion) 이 향상되었다고 보고하였다.²¹

Fig. 6 는 제작된 세포담체 strut에 대한 3차원 표면 거칠기를 나타내며, 그래프 f(y) 는 y-축에 대한 z-축의 표면 거칠기를 보여준다. Table 2.는 strut 표면의 거칠기를 R_a (평균 거칠기)와 R_t (최대 거칠기) 로 나타낸 결과로써,

$$R_a = \frac{1}{L} \int |f(y)| d_y \text{ and } R_t = R_H + R_L$$

L은 y-축의 길이를, f(y)는 곡선의 거칠기, R_H 와 R_L 는 각각 거칠기 곡선의 zero 점에서부터 가장 높은 peak와 가장 낮은 peak간의 거리를 나타낸다. Fig 6. 와 같이 비교적 높은 함량으로 phlorotannin이 코팅된 세포담체 일수록, 표면 거칠기가 미소하게 낮아지는 경향을 보였지만, phlorotannin 코팅 함량이 표면 거칠기에 미치는 영향이 크게 나타나진 않음을 확인하였다.

FT-IR 분석. phlorotannin의 함량을 알아보기 위해 FT-IR 분석을 이용해 각각의 시료들을 동일 조건하에서 측정 비교하였다. Phlorotannin은 주로 방향족 구조 (1700 cm^{-1} ~1500 cm^{-1})로 이루어져 있다고 알려져 있다. 물질들의 작용기에 따른 고유 진동 파장은 다양한 영역에서 나타나지만, Fig 7.과 같이, (a) phlorotannin은 방향족 이중결합 파장인 1612 cm^{-1} 에서, (e) PCL은 1722 cm^{-1} 파장을 비교하였다. Phlorotannin과 PCL이 결합된 Fig. 7 (b)~(d) 세포담체 파장처럼, phlorotannin함유량이 증가함에 따라, phlorotannin 고유 진동 파장의 증가가 관찰되었다. 이에 따라, phlorotannin을 코팅한 각각의 세포담체는, 코팅 함량에 따라 intensity의 일정한 감소/증가 결과가 측정되었으므로 phlorotannin 함량 변화에 따른 제작이 잘 이루어진 것으로 판단하였다.

Wettability 분석. 조직공학에서 수분 흡수 (water-absorption) 는 세포담체의 필수 요구조건이다. 세포담체 내부에서의 혈류 유동과 세포들에게 필요한 영양분 및 대사물질들의 원활한 공급에 영향을 미치는 주요 요소이기 때문이다.⁴ Fig. 8은 phlorotannin 코팅 함량 변화에 따라 제작된 세포담체 위에 5 μ l량의 물을 떨어트린 후, 물이 흡수되는 순간적인 확산 모습을 보여준다. PT 세포담체에 비해 phlorotannin이 코팅된 세포담체에서 높은 수분 흡수력을 확인할 수 있었다. 이는 세포담체 표면에 강한 친수성 특성을 지닌 phlorotannin이 코팅이 되어 수분흡수성이 증가된 것으로 보인다. phlorotannin이 코팅된 세포담체가 PT에 비해 수분흡수율이 20~22 % 더 증가되었다. phlorotannin 코팅 함량에 따라서는 비슷한 양상을 보였으며, 이와 같은 분석 결과로, PT/Phlorotannin 세포담체는 세포 배양 실험시 세포의 초기 부착이 더 향상될 것으로 예상된다.

기계적 강도 분석. 세포담체는 조직 재생에 있어서 외부 응력에 따라, 그에 대응하는 기계적 강도를 형성할 수 있어야 한다.^{22,23} β -TCP를 비롯한 바이오세라믹스는 우수한 골 전도 특성으로 인해 골 조직 재생 분야에 활발히 사용되는 물질이다. 하지만, 실제 뼈와 비교하여 낮은 취성 등 물성의 결점이 있다. 마찬가지로, phlorotannin은 우수한 골 분화 특성을 지니지만 자체만으로는 낮은 기계적 특성의 한계가 있다.

이에 따라, 본 연구에서는 높은 기계적 강도를 특성을 지닌 PCL을 혼합하여 각각의 결점을 보완한 PCL/ β -TCP/phlorotannin 세포담체를 제작하였다. Fig. 9 (a)는 phlorotannin의 코팅 량에 따라 제작된 세포담체에 인장속도 2.0 mm/s의 인장하중을 가하여, 탄성계수 (Young's modulus) 로 나타낸 그래프이다. Fig. 9 (b)는 각각의 세포담체에 대한 응력-변형률 곡선 (Stress-strain Curves) 그래프를 나타낸다. 세포담체의 기계적 강도는 phlorotannin의 코팅 함량에 따라 변화의 차이를 확인할 수 없었다. 이는 각각의 strut 내부에 결합 되어있는 PCL과 β -TCP의 함량이 일정하고 (β -TCP : 20 wt %), strut 표면에 코팅된 phlorotannin의 함량이 미량이기 때문에 거의 비슷한

값으로 나타난 것으로 보인다.

세포실험(in vitro). Fig. 10은 MTT-assay 분석을 통해, phlorotannin 함량 변화에 따라 제작된 세포담체 (n=5) 내/외부에서 생존 (viability) 한 osteoblast-like cells (MG-63) 을 관찰하였다. Phlorotannin의 함량이 더 높게 코팅된 세포담체일수록 세포의 초기접착률이 증가함을 확인하였고, 1, 3, 7일간 세포 배양한 결과와 같이 phlorotannin의 함량이 높아졌다. 초기 세포부착률 증가됨에 따라 세포담체 내/외부로 세포의 증식도 향상되었음을 확인하였다.

세포지지체 상에서 인공지지체 상에서 세포의 부착여부를 확인하기 위한 전자주사 현미경과 EDS 측정 결과를 Fig. 11에 나타내었다. 조골세포를 7일간 배양한 결과 phlorotannin의 함량이 증가될수록 세포담체 내외부로 세포의 증식이 향상되었고, EDS 측정결과 Phlorotannin이 더 높게 코팅되어 있는 세포담체에서 칼슘 (calcium)과 인 (phosphate) 이온의 파장이 더 높은 것으로 관찰되었으며, 조골세포의 분화도가 보다 향상된 것으로 사료된다.

4. 결론

본 연구에서는 쾌속조형 시스템과 코팅 공정을 이용하여 54 %의 공극률과 약 300 μ m의 균일한 공극 구조를 갖는 PCL/ β -TCP/phlorotannin 세포담체를 제작하였다. 제작된 세포담체는 phlorotannin이 코팅됨에 따라, 친수성 성질이 향상되었고, 조골세포의 초기 세포부착과 증식이 증가되었다. β -TCP와 phlorotannin이 결합된 세포담체는 보다 다양한 재료와 공정을 융합함에 따라, 골 조직 재생을 위한 최적화된 세포담체로의 연구가 가능하리라 사료된다.

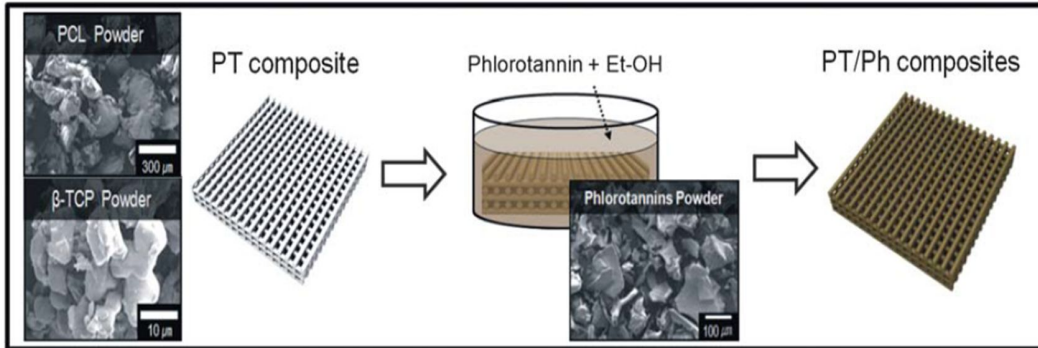
5. 참고문헌

1. Nagayama K, Iwamura Y, Shibata T, Hirayama I, Nakamura T. Bactericidal activity of phlorotannin from the brown alga *Ecklonia kurome*. *J Antimicrob Chemoth* 50, 889, 2002.
2. Okai Y, Higashi-Okai K, Ishizaka S, Ohtani K, Matsui-Yuasa I, Yamashita U. Possible immunomodulating activities in an extract of edible brown alga, *Hijikia fusiforme* (Hijiki). *J Sci Food Agric* 76, 56, 1998.
3. Chen CY, Chou HN. Screening of red algae filaments as a potential alternative source of eicosapentaenoic acid. *Mar Biotechnol* 4, 189, 2002.
4. Frlich I, Riederer P. Free radical mechanisms in dementia of Alzheimer type and the potential for antioxidant treatment. *Drug Res* 45, 443, 1995.
5. Heo SJ, Jeon YJ. Antioxidant effect and protecting effect against cell damage by enzymatic hydrolysates from marine algae. *Food Ind Nutr* 10, 31, 2005.
6. Heo SJ, Jeon YJ, Lee J, Kim HT, Lee KW. Antioxidant effect of enzymatic hydrolyzate from a kelp, *Ecklonia cava*. *Algae* 18, 341, 2003.
7. Kim KN, Lee KW, Song CB, Jeon YJ. Cytotoxic activities of green and brown seaweeds collected from Jeju island against four tumor cell lines. *J Food Sci Nutr* 11, 17, 2006.
8. Yasantha A, Jeon YJ. Screening for angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of *Ecklonia cava*. *J Food Sci Nutr* 10, 134, 2005.
9. Cha SH, Ahn GN, Heo SJ, Kim KN, Lee KW, Song CB, Cho SM, Jeon YJ. Screening of extracts from marine green and brown algae in Jeju for potential marine angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35, 307, 2006.
10. Ahn MJ, Yoon KD, Min SY, Lee JS, Kim JH, Kim TG, Kim SH, Kim NG, Huh

- H, Kim JW. Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and protease by phlorotannins from the brown alga *Ecklonia cava*. *Biol Pharm Bull* 27, 544, 2004.
11. Kang HS, Chung HY, Kim JY, Son BW, Jung HA, Choi JS. Inhibitory phlorotannins from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* on total reactive oxygen species (ROS) generation. *Arch Pharm Res* 27, 194, 2004.
 12. Kang K, Park YJ, Hwang HJ, Kim SH, Lee JG, Shin HC. Antioxidative properties of brown algae polyphenolics and their perspectives as chemopreventive agents against vascular risk factors. *Arch Pharm Res* 26, 286, 2003.
 13. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JNM. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone Miner* 14, 27, 1991.
 14. Ryu BM, Li Y, Qian ZJ, Kim MM, Kim SK. Differentiation of human osteosarcoma cells by isolated Phlorotannin is subtly linked to COX-2, iNOS, MMPs, and MAPK signaling: Implication for chronic articular disease. *Chemico-Biological Interactions* 179, 192, 2009.
 15. Yeo, MG, Lee H, Kim GH. 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, 502, 2011.
 16. Li XY, Kong XY, Shi S, Gu YC, Yang L, Guo G. *Carbohydr Polym* 79, 429, 2010.
 17. Lee H, Kim GH. Three-dimensional plotted PCL/ β -TCP scaffolds coated with a collagen layer: preparation, physical properties and in vitro evaluation for bone tissue regeneration. *J Mater Chem* 21, 6305, 2011.
 18. Ahn SH, Koh YH, Kim GH. A three-dimensional hierarchical collagen scaffold

- fabricated by a combined solid freeform fabrication (SFF) and electrospinning process to enhance mesenchymal stem cell (MSC) proliferation. *J Micromech Microeng* 20, 65015, 2010.
19. Kim GH, Yoon H. A direct-electrospinning process by combined electric field and air-blowing system for nanofibrous wound-dressings. *Appl Phys Lett* 93, 23127, 2008.
 20. Schmidt JA, Von Recum AF. Texturing of polymer surfaces at the cellular level. *Biomaterials* 12, 385, 1991.
 21. Wan Y, Wang Y, Liu Z, Qu X, Han B, Bei J, Wang S. Adhesion and proliferation of OCT-1 osteoblast-like cells on micro- and nano-scale topography structured poly(l-lactide). *Biomaterials* 26, 4453, 2005.
 22. Wang XH, Li DP, Wang WJ, Feng QL, Cui FZ, Xu YX, Song XH, Werf MVD. Crosslinked collagen/chitosan matrix for artificial livers. *Biomaterials* 24, 3213, 2003.
 23. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21, 2529, 2000.

(a) Coating process



(b) Biological effect of Ca²⁺ on phlorotannin

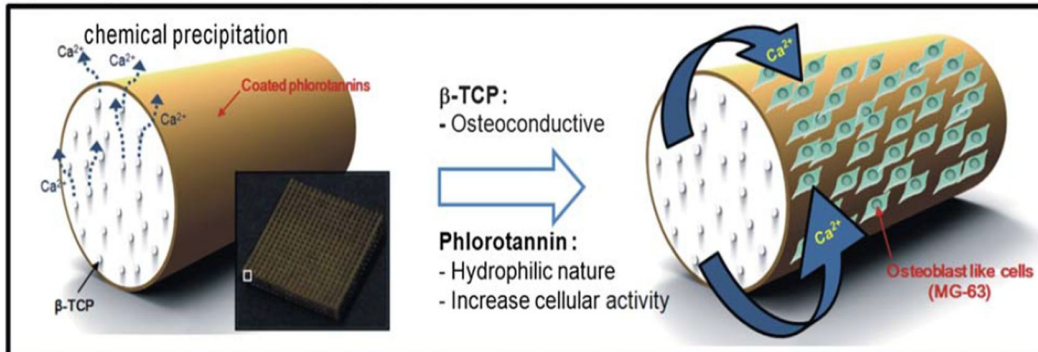


Fig. 1 (a) Schematic representation of the fabrication processes for producing composites and (b) hypothetical biological effect of Ca²⁺ on phlorotannin (Ph) coated on a composite strut.

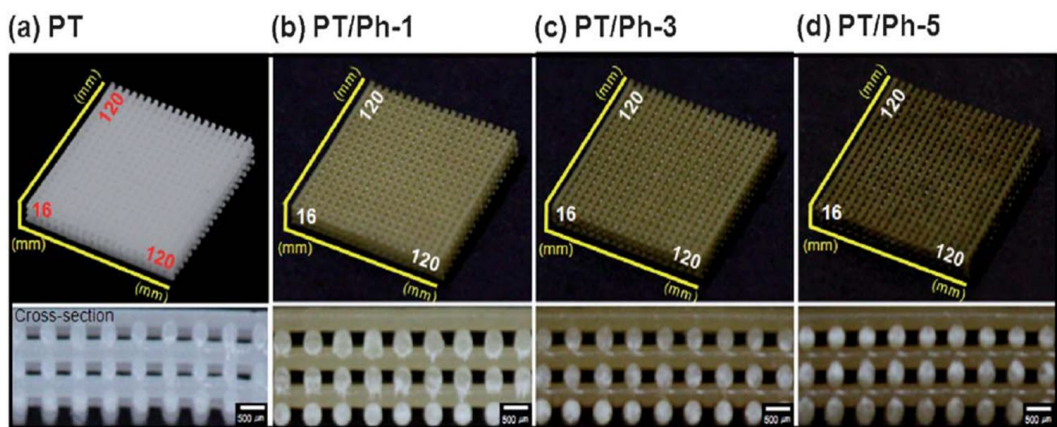


Fig. 2 Optical microscope images of (a) PCL/ β -TCP (PT), (b) PCL/ β -TCP/phlorotannin (1 wt%) (PT/Ph-1), (c) PCL/ β -TCP/phlorotannin (3 wt%) (PT/Ph-3) and (d) PCL/ β -TCP/phlorotannin (5 wt%) (PT/Ph-5) composites fabricated using a normal plotting system and coating process. The brown colour indicates phlorotannin.

Composites	PT	PT/Ph-1	PT/Ph-3	PT/Ph-5
Porosity (%)	55.1	54.5	54.3	54.1
Strut diameter/ μm	304 ± 6	305 ± 7	305 ± 8	304 ± 10
Pore size/ μm	296 ± 7	296 ± 5	294 ± 6	295 ± 8

Table 1 Porosity and tensile modulus of various composites and hierarchical scaffolds at a constant stretching speed of 2 mm/s.

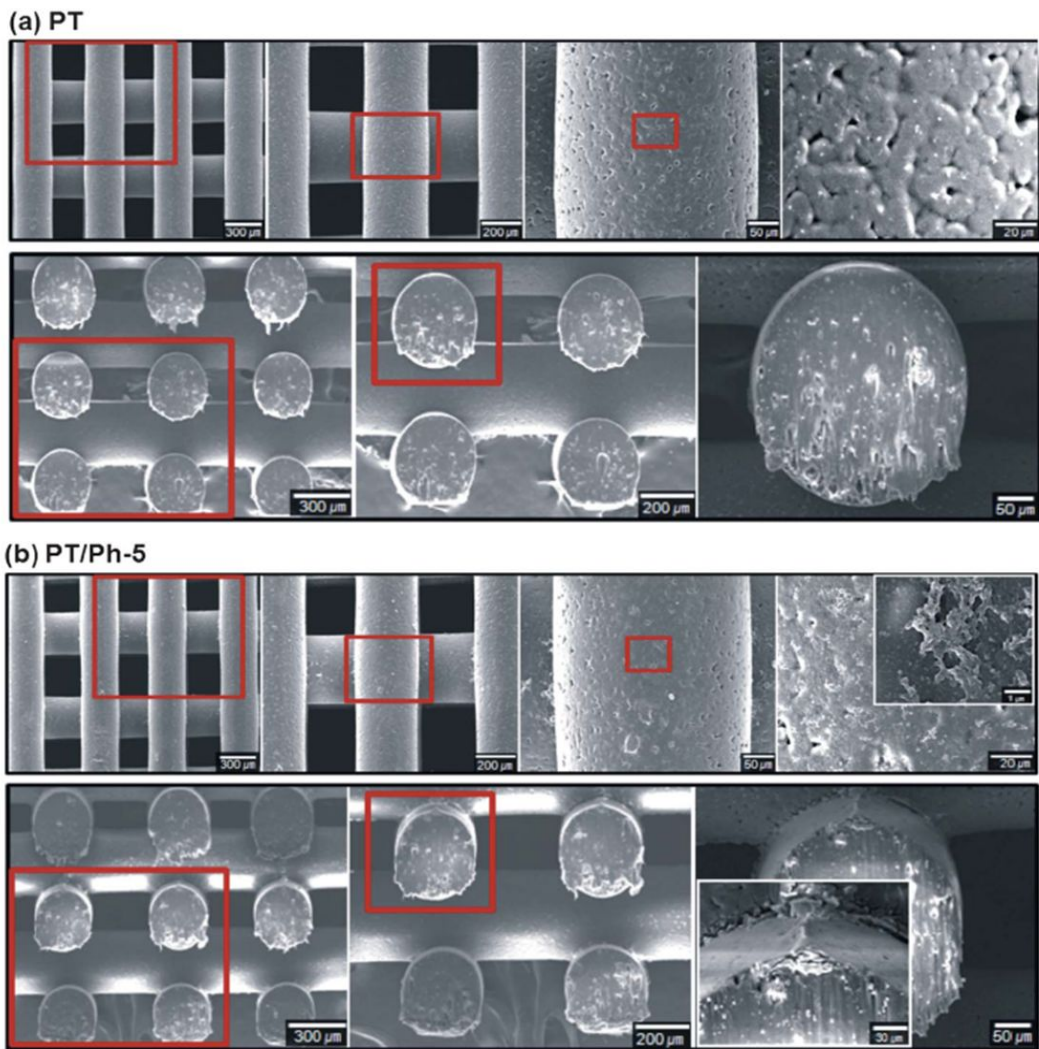


Fig. 3 SEM images of (a) a PT composite and (b) PT/Ph-5 composite coated with phlorotannin solution.

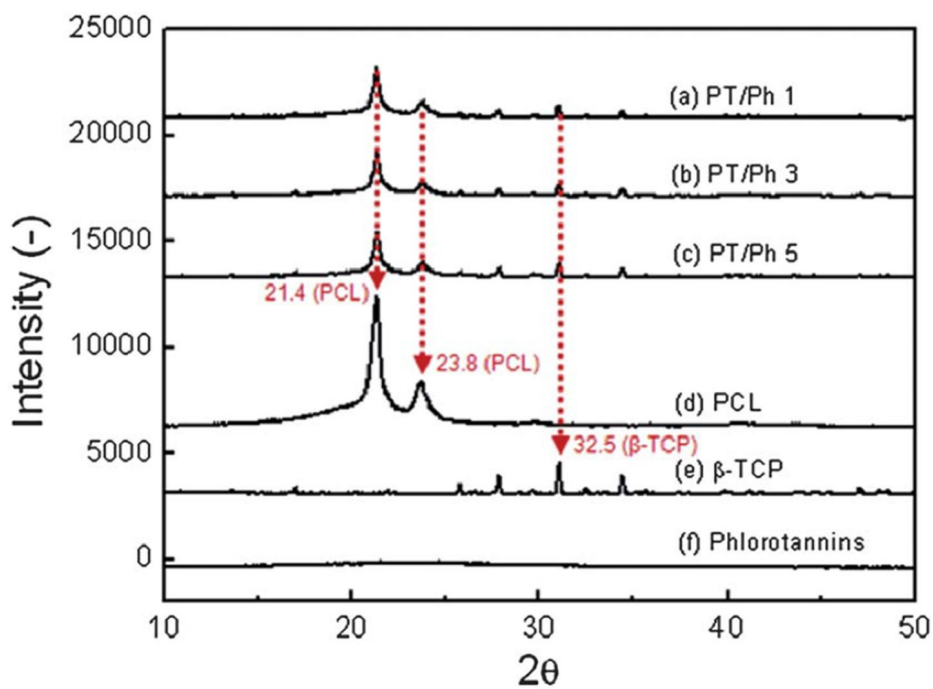


Fig. 4 X-Ray diffraction (XRD) patterns for (a) PT/Ph-1, (b) PT/Ph-3, (c) PT/Ph-5, (d) pure PCL, (e) β -TCP and (f) phlorotannin.

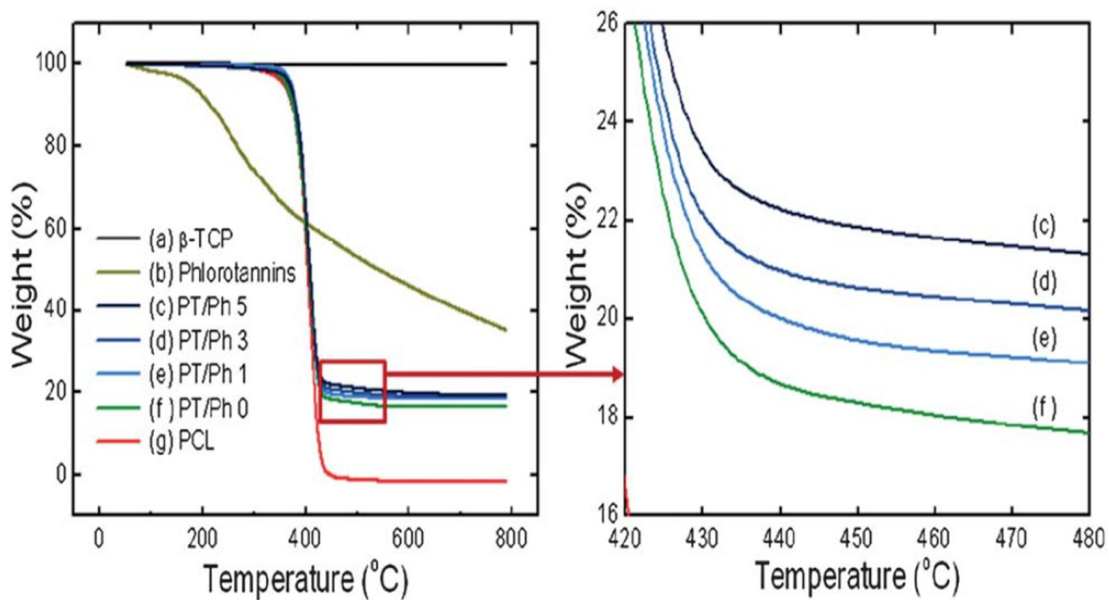


Fig. 5 Thermogravimetric analysis of (a) β -TCP, (b) phlorotannin, (c) PT/Ph-5, (d) PT/Ph-3, (e) PT/Ph-1, (f) PT, and (g) pure PCL. The plot on the right shows a magnified region of the left plot.

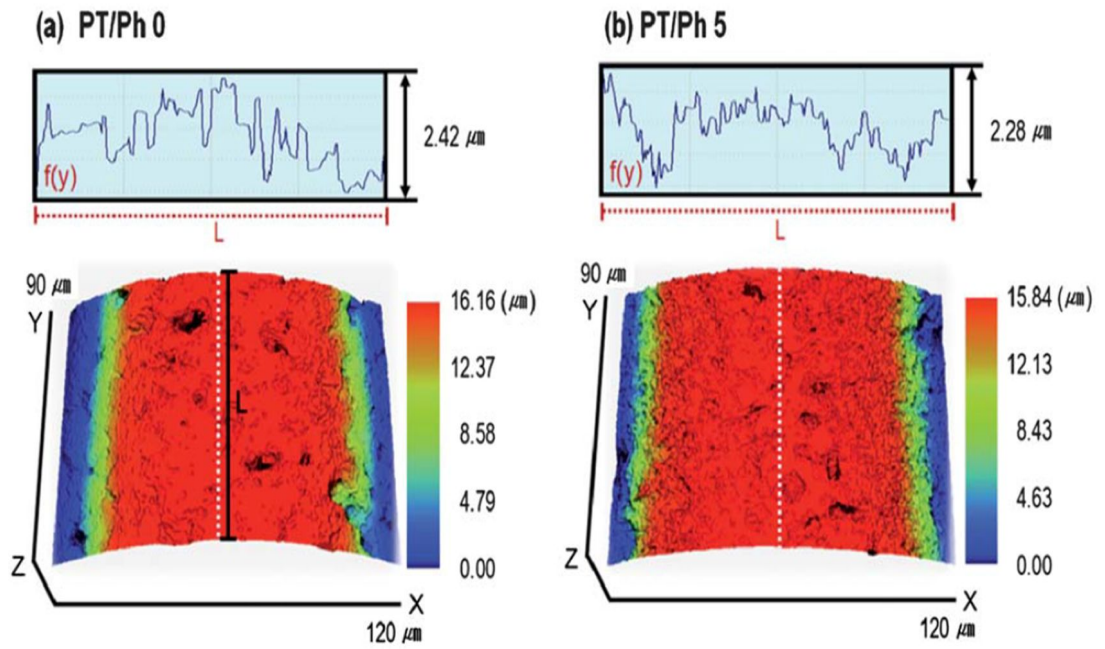


Fig. 6 Three-dimensional topography of the strut surfaces of (a) PT and (b) PT/Ph-5 composites.

Type	PT/Ph0	PT/Ph1	PT/Ph3	PT/Ph5
R_a (nm)	185.79 ± 74.14	178.98 ± 85.82	179.35 ± 92.18	172.61 ± 71.73
R_t (μm)	1.68 ± 0.78	1.49 ± 0.68	1.43 ± 0.66	1.41 ± 0.76

Table 2 Roughness data (R_a and R_t) for the scaffolds. (n=6)

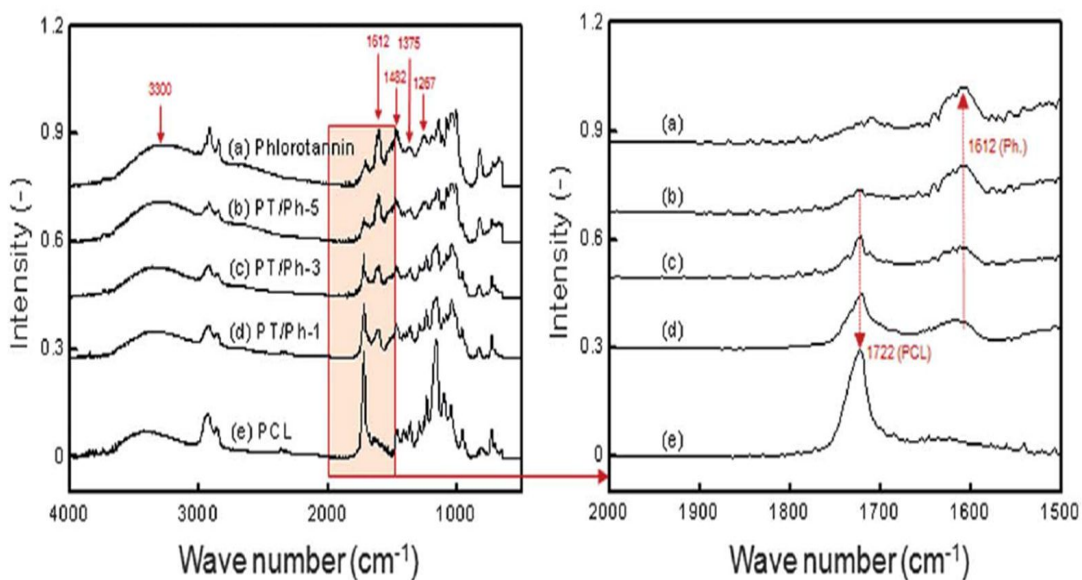


Fig. 7 FT-IR spectra of (a) phlorotannin, (b) PT/Ph-5 composite, (c) PT/Ph-3 composite, (d) PT/Ph-1 composite, and (e) pure PCL. The spectra displayed on the right side show a magnified area of the IR spectra on the left.

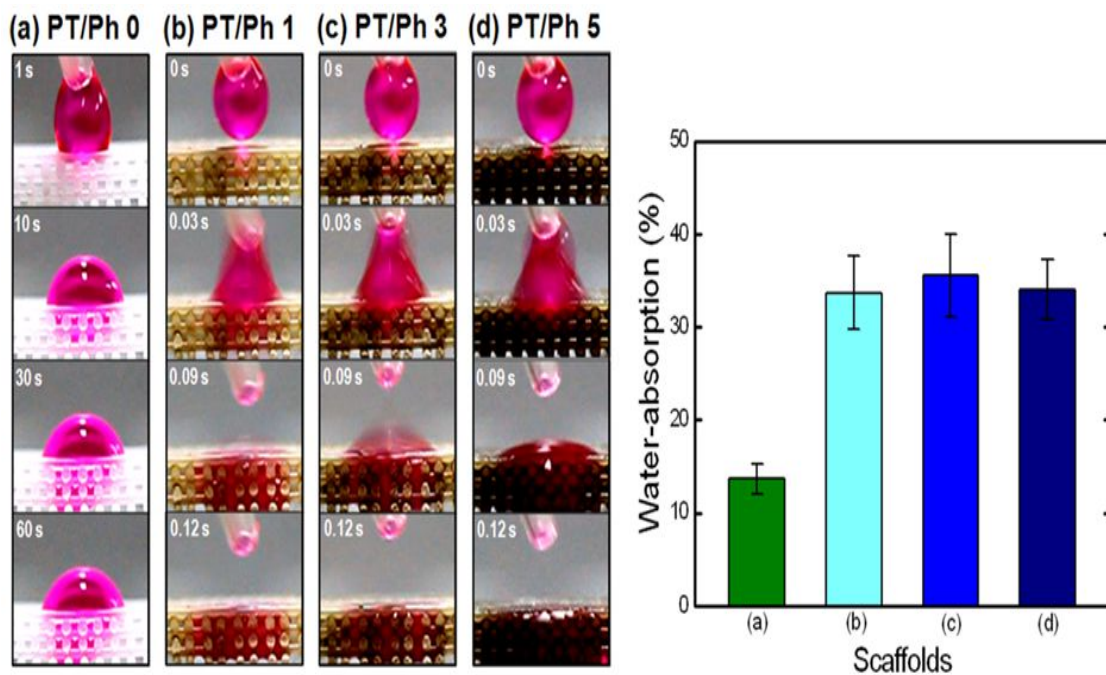


Fig. 8 Transient absorption images of one droplet ($5 \mu\text{l}$) of water through the cross-section for (a) PT and (β -TCP) PT/Ph composites. The graph on the right shows a comparison of water absorption after 2 h for the various composites ($n = 5$).

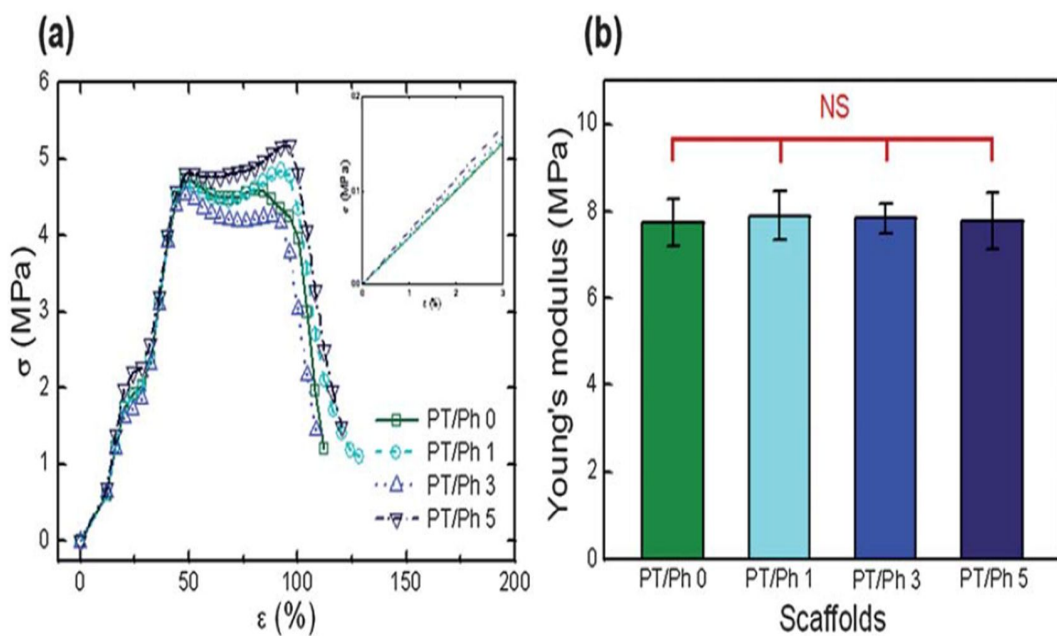


Fig. 9 (a) Stress (σ) - strain (ϵ) curves for the composites. (b) Comparison of elastic moduli for PT and PT/Ph composites ($n = 5$). NS indicates nonsignificant.

Sample type	PT/Ph 0	PT/Ph 1	PT/Ph 3	PT/Ph 5
Stretching velocity (mm / s)	Young's Modulus (MPa)	Young's Modulus (MPa)	Young's Modulus (MPa)	Young's Modulus (MPa)
2.0	7.75 ± 0.56	7.90 ± 0.55	7.71 ± 0.53	7.92 ± 0.48

Table 3 Tensile Modulus for the scaffolds at a Constant Stretching Speed of 2 mm/s.

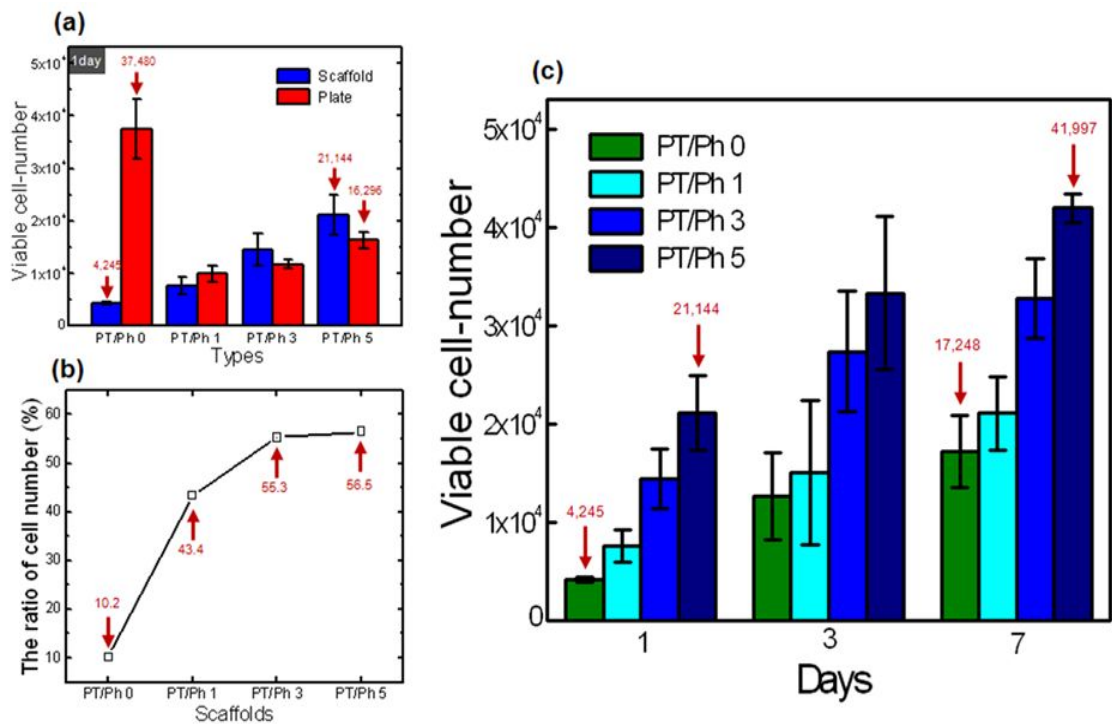


Fig. 10 (a) After 1 day of cell culture, initial cell viability by MTT assay of MG-63 cells seeded on various composites. (b) The percent of attached cells on the composite scaffolds after 1 day. (c) Cell viability (1, 3 and 7 days) by MTT assay (n = 5).

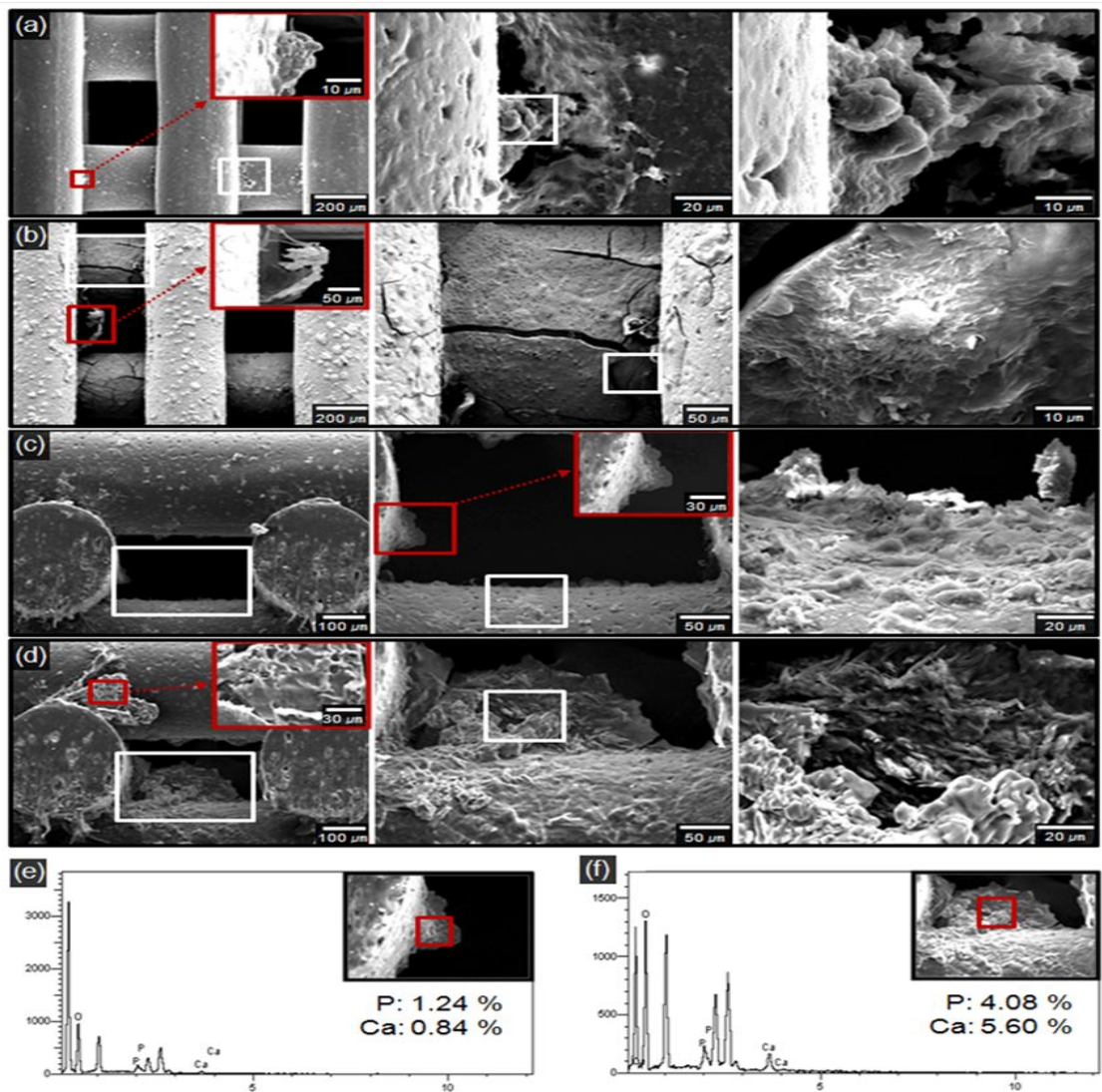


Fig. 11 SEM micrographs of MG-63 cells cultured on (a and c) PT and (b and d) PT/Ph-5 composite for 7 days; (a and b) surface view and (c and d) cross-sectional view of the composites. (e and f) EDS results of PT and PT/Ph-5 composites from the cell surfaces, respectively.

제3장 실험 및 방법

제3절 세포담체의 플라즈마 처리

1. 서론

조직공학에서의 생체재료는 친수성 및 생체적합성, 생분해성, 내부연결구조가 잘 이루어져 기공성이 좋아야 한다.^{1,2} 합성 고분자를 이용해 만들어진 3차원 세포담체의 경우 우수한 기계적 강도와 분해속도 제어의 장점이 있지만 세포담체의 친수성이 낮고 초기의 세포 접착 및 증식이 천연 고분자 세포담체에 비해 낮다는 단점이 있다. 따라서 최근에는 이러한 문제점을 해결하기 위해 화학적으로 표면을 개질 시키거나 플라즈마를 처리하여 친수성을 높이는 방법이 연구되고 있다.³⁻⁵

플라즈마 처리는 고분자 표면에 극성을 띠게 하여 표면 에너지를 높이는 효과가 있으며, 그 결과 고분자의 표면 에너지를 증가시킬 뿐만 아니라 표면의 거칠기를 다소 증가시켜 세포 부착에 유리한 구조로 개질시킨다.⁶⁻⁸ 조직공학 기법을 이용하여 골 조직을 재생시키는 목적은 손실 부위에 대한 골 조직을 대체 또는 회복시키기 위해 본래의 뼈조직과 같은 상태로 만드는 것이다. 즉, 뼈 조직을 재생시키기 위해서는 세포담체 내/외부에 조골세포가 잘 부착하여 증식하고 분열 할 수 있도록 도와주어야 하는데, 이때 표면을 친수성의 특성 등을 갖도록 플라즈마를 이용해 개질화하여 뼈 조직 생성을 촉진 시키고자 한다.

2. 실험

2-1 재료

세포담체 제작용 소재는 Sigma-Aldrich (U.S.A) 사의 PCL ($M_w = 60000$, density = 1.135g/cm^3) 이며, 플라즈마 시스템은 플라즈마 헤드 (Line type, 220~240 V), 고전압 발생장치 (ATMO-02, Femtosience, Korea)로 구성되어 있으며, N_2 초순수 (99.999%) 를 사용하였다. 가스의 유량을 조절 및 측정하기 위해 gas flow controller (RMA-25-SSV & RMB-53D-SSV, Dwyer)를 이용하였다 (Fig. 1).

2-2 방법

플라즈마 처리. 대기압 플라즈마 표면 방전처리는 플라즈마 헤드와 세포담체의 표면과의 거리를 10~20 mm의 간격으로 배치하였다. 방전 처리를 위하여 DC pulse 파형을 고전압 발생장치를 사용하여 인가하였고, 전압과 주파수, 듀티는 각각 5.5 kV, 20 kHz, 20%였다. 플라즈마 방전가스로 질소가스를 사용하였으며, 가스의 유량은 40 LPM이었다. 세포담체의 플라즈마 처리 시간은 30초로 하였다.

친수성 분석 (Water absorption). 표면 친수성 증가 확인을 위하여 세포담체의 상방에서 증류수 10 μL 를 떨어뜨렸다. 시편의 측방에서 부착된 마크로 렌즈 (EF 100mm 1:2.8 USM, Canon, Japan)를 디지털 카메라 (500D, Canon, Japan)로 촬영하여 시편의 표면에 떨어진 수분의 침투 모습을 확인하였다.

3. 결과

쾌속조형 공정을 통해 제작된 세포담체는 친수성 향상을 통한 세포친화성을 높이기 위해 플라즈마 처리를 하였다. 플라즈마 헤드와 세포담체의 표면과의 거리가 10 mm 이상일 경우에는, 플라즈마 방전시 세포담체의 표면과의 거리가 너무 멀었기 때문에 접촉각의 정도가 차이가 없었다. 따라서 Fig. 2와 같이 플라즈마 헤드와 세포담체 표면과의 거리를 10 mm로 고정하여 방전 처리 하였으며, 플라즈마 처리로 인한 세포담체의 표면 친수성 증가 확인을 위하여 수분 접촉각 (water contact angle) 을 측정하였다 (Fig. 3).

플라즈마 처리를 하지 않은 세포담체는 물방울이 세포담체 표면에 둥근 형태로 맺혀 있는 반면, 플라즈마 방전 처리한 세포담체의 경우는 표면에 물방울을 떨어뜨림과 동시에 표면으로 스며들어 가는 것을 확인할 수 있다. 접촉각 사진을 통한 플라즈마 처리 효과는 소수성 특성의 PCL 세포담체의 표면을 친수성을 갖도록 하여 세포의 초기 부착에 유리한 표면 구조로 개질되었음을 확인하였다.

4. 결론

골조직의 재생을 위한 세포담체 제작기법 및 제작 분야는 다양한 연구가 진행되고 있으며, 질병이나 기타 상처가 발생하였을 때 어떠한 방식으로 손상된 조직의 기능, 형태적 치료, 재생시킬 것인지에 대한 연구가 진행되고 있으며 또한 많은 발전을 하고 있다. 이러한 세포담체는 세포 배양 상태에서 성장한 세포를 이식하여 조직을 재생시키고 기관의 기능을 회복시키는 목적이기 때문에 어떠한 형태로든 인체와 접촉이 이루어져 인체 주변 조직과의 반응형태에 따라 이식후 면역반응을 일으키지 않으면서 이식부의 골조직 세포가 세포담체에 정착되고 증식되는 생물학적 특성이 요구된다.

본 연구는 기존의 3차원 세포담체의 문제점중 하나로서, 매끄러운 표면으로 인한 낮은 수분 흡수율 및 침투율을 극복하여 생물학적 특성을 향상시키기 위함으로써 플라즈마 공정을 응용하여 세포담체의 초기 조골세포 부착률을 향상 시키고자 하였다. 따라서 플라즈마 처리에 따른 세포담체의 표면 개질화를 통해 일반적으로 세포가 더욱 빨리 증식할 수 있도록 초기 조골세포 부착률을 높일 수 있을 것으로 생각한다. 쾌속조형 공정 및 플라즈마 공법을 통한 다양한 검증 및 분석 연구로, 골조직 재생을 위한 더욱 최적화된 세포담체를 제작할 수 있도록 연구를 진행할 예정이다.

5. 참고문헌

- (1) Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21, 2529, 2000.
- (2) Hollister SJ, Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature materials* 4, 518, 2005.
- (3) Marray MM, Spindler KP, Ballard P, Welch TP, Zurakowski D, Nanney LB. Enhanced histologic repair in a central wound in the anterior cruciate ligament with a collagen - platelet-rich plasma scaffold. *J Orthopaedic Res* 25, 1007, 2007.
- (4) Schuckert KH, Jopp S, Teoh SH. 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 Eng* 15, 493, 2009
- (5) Jung YJ, Lee KH, Park CW, Suh TS, Hong CM, Hong SH, Ahn WS, Chun HJ. Characterization of surface-modified poly(DL-lactide-co-glycolide) scaffolds from hydrophilic monomers using plasma-enhanced CVD. *J Ind Eng Chem* 11, 165, 2005.
- (6) Duan Y, Wang Z, Yan W, Wang S, Zhang S, Jia J. Preparation of collagen-coated electrospun nanofibers by remote plasma treatment and their biological properties. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition* 18, 1153, 2007.
- (7) Yang F, Wolke JGC, Jansen JA. Biomimetic calcium phosphate coating on electrospun poly (epsilon-caprolactone) scaffolds for bone tissue engineering. *Chemical Engineering Journal* 137, 154, 2008.
- (8) Li X, Xie J, Lipner J, Yuan X, Thomopoulos S, Xia Y. Nanofiber scaffolds with gradations in mineral content for mimicking the tendon-to-bone insertion site. *Nano Letters* 9, 2763, 2009.

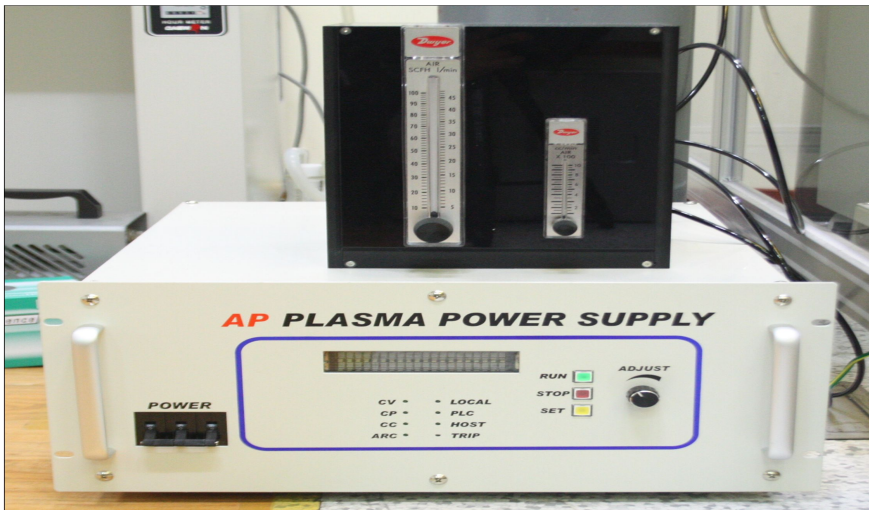
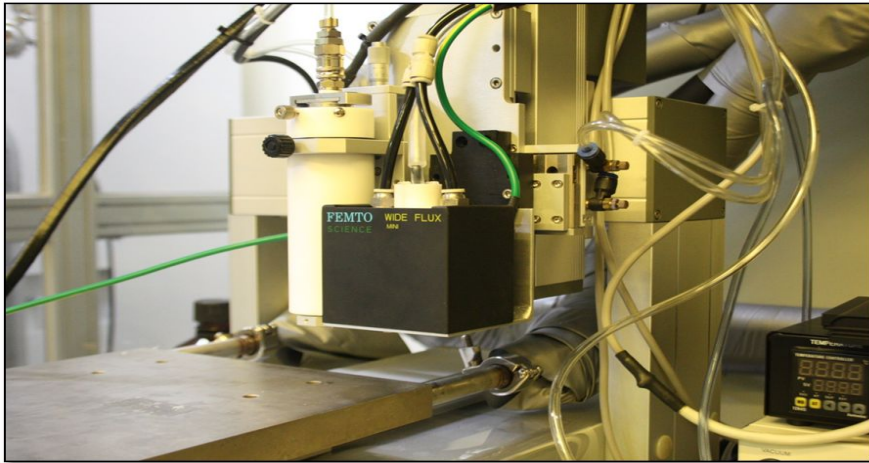


Fig. 1 Plasma treatment & RP (rapid prototype) system

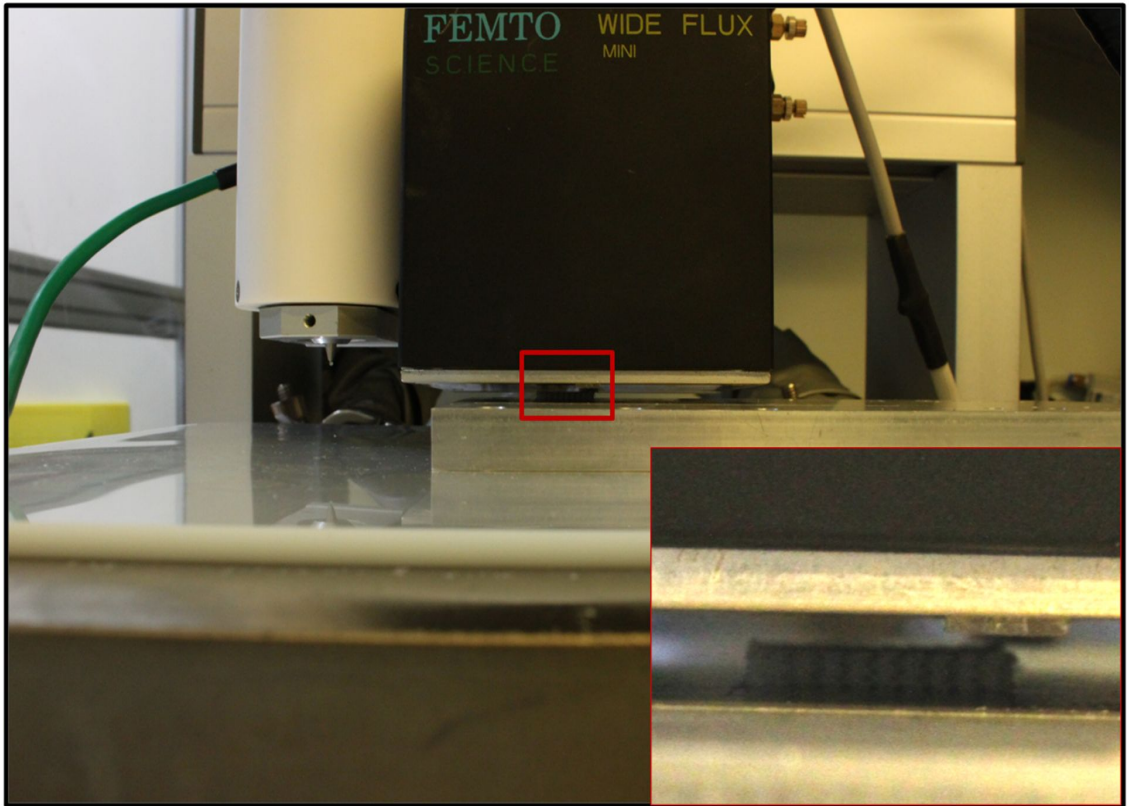
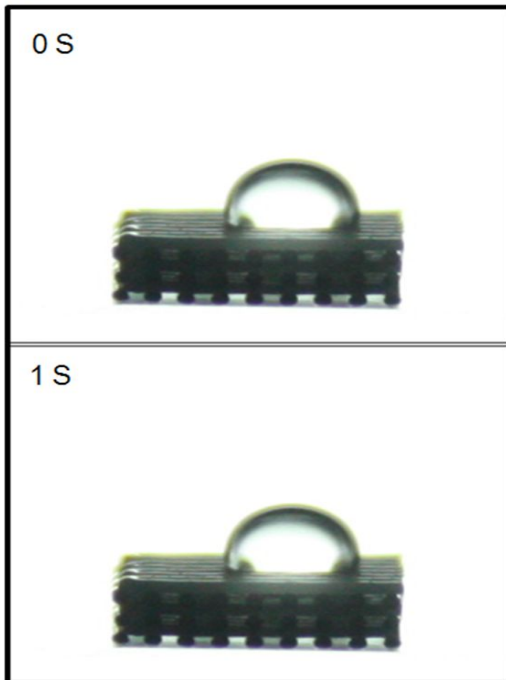


Fig. 2 Plasma treatment on fabricated scaffolds

(a) PCL



(b) PCL/Plasma

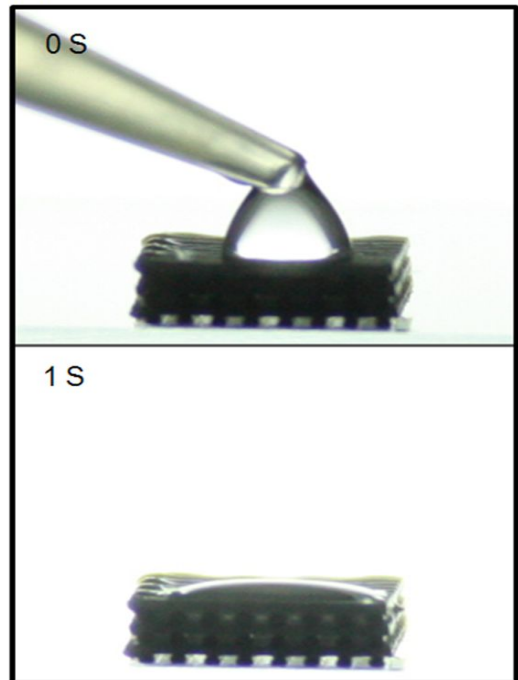


Fig. 3 Transient absorption images of one droplet ($5 \mu\text{l}$) of water through the cross-section for (a) PCL and (b) PCL/Plasma scaffolds