

2013년 8월

博士學位論文

이산화탄소가스발포와 염침출법을
이용한 골 재생용 다공성
폴리카프로락톤 고분자지지체 제조

조선대학교 대학원

치의학과

이 병 진

이산화탄소가스발포와 염침출법을
이용한 골 재생용 다공성
폴리카프로락톤 고분자지지체 제조

Preparation of polycaprolactone scaffolds for bone
regeneration using CO₂ gas foaming/salt leaching

2013年 8月 23日

조선대학교 대학원

치의학과

이 병 진

이산화탄소가스발포와 염침출법을
이용한 골 재생용 다공성
폴리카프로락톤 고분자지지체 제조

지도교수 고 영 무

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함.

2013年 4月

조선대학교 대학원

치 의 학 과

이 병 진

이병진의 박사학위 논문을 인준함

위원장 원광대학교 교수 배 지 명 印

위 원 경북대학교 교수 권 태 엽 印

위 원 조선대학교 교수 민 정 범 印

위 원 조선대학교 교수 김 병 훈 印

위 원 조선대학교 교수 고 영 무 印

2013年 6月

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT	vi
제 1 장 서 론	1
제 2 장 이론적 배경	3
제 1 절 조직공학	3
제 2 절 생분해성 고분자	3
제 3 장 실험	7
제 1 절 실험재료	7
제 2 절 지지체 제조	8
제 3 절 가스발포	9
제 4 절 플라즈마 처리	11
제 5 절 조골모 세포 배양	13
제 6 절 세포형상 관찰	14
제 7 절 생체적합성 평가	15
제 8 절 표면분석	16
제 4 장 결과 및 고찰	17
제 1 절 표면분석	17
제 2 절 조골모세포 증식	29
제 5 장 고찰	32
제 6 장 결론	37
참고문헌	38

LIST OF TABLE

Table 1. Atomic percent of (a) PCL scaffolds and (b) oxygen plasma treated PCL scaffold	26
Table 2. Area percent of elements on (a) PCL scaffolds and (b) oxygen plasma treated PCL scaffold	28

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Molecular structure of (a) polycaprolactone and (b) poly lactic-acid	6
Fig. 2. Gas foaming apparatus	10
Fig. 3. Schematic diagram of plasma equipment	12
Fig. 4. Images of 3D PCL scaffolds fabricated from gas foaming/salt leaching. (a) PCL/NaCl composite, (b) supercritical CO ₂ gas foamed PCL/NaCl composite, and (c) salt leached PCL scaffold	19
Fig. 5. SEM micrographs of PCL/NaCl composite and PCL scaffold. (a) PCL/NaCl composite, (b) supercritical CO ₂ gas foamed PCL/NaCl composite, and (c) salt leached PCL scaffold	20
Fig. 6. Pore size distribution of salt leached PCL scaffold	21
Fig. 7. Contact angle of (a) PCL scaffold and (b) oxygen plasma treated PCL scaffold	24
Fig. 8. XPS survey scan of (a) PCL scaffold and (b) oxygen plasma treated PCL scaffold	25
Fig. 9. C1s spectra of (a) PCL scaffold and (b) oxygen plasma treated PCL scaffold	27

Fig. 10. SEM micrographs of (a) PCL scaffold and (b) oxygen plasma treated PCL scaffold seeded with MC3T3-E1 cells for 1 hr incubation 30

Fig. 11. MTT activity of the MC3T3-E1 cell seeded PCL scaffolds and oxygen plasma treated PCL scaffold for 1 and 2 days. *p <0.05, **p<0.01; significant against the proliferation of MC3T3-E1 cells on PCL scaffold and plasma treated PCL scaffold corresponding day 31

ABSTRACT

Preparation of polycaprolactone scaffolds for bone regeneration
using CO₂ gas foaming/salt leaching

Byoung-Jin Lee, D.D.S., M.S.D.

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

Department of Dental Science

Graduate School of Chosun University

The polycaprolactone (PCL) has been widely adopted for biomaterials and biomedical applications due to its slow degradability and good biocompatibility, as well as its good mechanical and thermoplastic characteristics. Surface properties of scaffolds such as hydrophilicity play a key role in cell adhesion and proliferation. However, PCL has hydrophobic surface and lacks of functional groups, therefore, it is not a good condition as a substrate for cell adhesion.

In this study, porous PCL scaffolds was prepared using CO₂ gas foaming and salt leaching method, and then scaffolds surface was treated with O₂ plasma in order to improving the hydrophilicity.

The supercritical CO₂ gas foaming process was carried out at 50 bar and 25 °C for 1 hr. The depressurization rate was 2 bar/s. The salt was leached in distilled water for several days. The O₂ plasma process was carried out at plasma power of 100W, 10 mTorr for 1 min.

The wettability and surface morphology of porous PCL scaffolds were examined by contact angle and scanning electron microscopy. The chemical bonding state and content of oxygen element of oxygen

plasma treated porous PCL surfaces were examined by X-ray photoelectron spectroscopy. The untreated PCL surfaces and O₂ plasma treated with PCL surfaces were also examined for their *in vitro* pre-osteoblast (MC3T3-E1) cells proliferation using MTT assay.

The results of this study demonstrated that porous PCL scaffolds by CO₂ gas foaming and salt leaching possesses the mean pore size of 282.4 ± 90.1 μm. The O₂ plasma treated porous PCL scaffolds surface showed hydrophilic property and the proliferation of preosteoblast, MC3T3-E1 cells was enhanced comparing to untreated PCL scaffolds. The porous PCL scaffolds produced from the gas foaming and salt leaching and plasma surface treatment are suitable for potential applications in bone tissue engineering.

제 1 장 서 론

생체조직공학이란 손상된 생체조직의 복원을 위하여 생체재료를 실제의 장기가 갖는 조직과 유사한 구조와 기능을 가지도록 3차원 다공성 지지체로 제조하고 지지체내에 골조직 세포를 체외배양 함으로써 인공적으로 골세포와 조직이 형성되도록 유도하여 인공조직을 형성하고 이를 체내로 이식했을 때 새로운 실질 조직 형성이 신속하게 재생될 수 있도록 하는 일련의 기법을 의미한다.¹⁾

최근에는 생명과학, 공학 그리고 의학을 통합 응용하는 생체조직공학으로 발전하였다. 생체조직의 구조와 기능의 상관관계를 이해하고, 나아가서 생체 대용품을 만들어 이식함으로써 우리 몸의 기능을 복원, 유지, 향상시키는 것을 목적으로 한다. 이러한 이론은 먼저 환자의 몸에서 필요한 조직을 채취하여 세포를 분리한 다음 분리된 세포를 배양 증식시켜 생분해성 고분자에 심어 일정기간 체외배양한 뒤 이 세포구조물을 다시 체내로 이식하는 방법을 의미한다. 한편으로는 환자의 세포 외에 다른 사람의 세포조직 혹은 동물의 장기를 이용하려는 노력과 최근에는 줄기세포를 활용하는 다양한 방법이 추진되고 있다.²⁾

조직공학용 지지체는 분해성 또는 비분해성 물질에 조직 세포를 점착, 증식, 또는 분화시켜 손상된 조직 부위에 이식시켜 효과적인 조직 재생을 유도한다. 합성 고분자 중에서 poly(lactic acid), poly(glycolic acid), poly(ϵ -caprolactone)(PCL) 그리고 이들의 공중합체는 뛰어난 생분해성, 생체적 합성, 물리적 특성을 조절할 수 있다는 장점으로 인해 조직공학용 지지체 재료로 널리 사용되고 있다. 이들 합성고분자들로 제작된 지지체와 세포 사이의 상호작용은 matrix의 구조적, 기계적, 화학적 특성에 영향을 받는다고 알려져 있다. 그 중에서도 재료, pore size, degradation rate, geometry, compliance, elasticity 등 지지체의 물리적 특성이 세포의 성장, 이동, 점착과 같은 활동에 영향을 준다는 사실은 많은 연구자들로부터 보고된 사실이다.³⁾

PCL은 생분해가 장기간 동안 진행되기 때문에 치료에 상당한 기간이 요구

되는 상처 봉합용 스테플러 및 약물방출 소재로 유용하게 사용되며, 여타 소재와의 블렌딩을 통해 다양하게 활용할 수 있다. PCL은 결정성이 낮아 강도가 약하고 유연성이 매우 좋아, 3차원 다공성 지지체로 가공하기에 용이하고 생분해 기간이 길어서 골조직과 같이 자기조직화에 상당한 시간이 요구되는 경우에 손상된 부위에 대한 지지대로 활용하기에 적합하다.⁴⁾ 그러나 고분자의 뛰어난 생체 적합성에도 불구하고, 고유의 소수성으로 인해 세포의 점착 및 세포 활동의 상호작용이 천연 재료보다는 떨어진다고 알려져 있다.⁵⁾

고분자 재료의 표면 기능성 향상을 위하여 열 표면 처리, 화학적 표면처리, 전기화학적 표면처리, 플라즈마 표면처리, 표면 박막코팅 및 커플링제 처리, UV 처리 등과 같은 여러 가지 표면처리 방법에 대한 연구가 이루어지고 있다. 이러한 고분자 소재 표면 물성을 개선하는 방법들 중 고분자 소재의 기본 물성에는 영향을 주지 않고 표면 특성을 변화시키는 방법으로 플라즈마 표면처리 기술을 들 수 있는데, 이 방법은 기저물질의 물성에는 영향 없이 특성 변화가 표면층에 국한되어 균일하게 일어나므로 처리된 표면을 안정하게 다룰 수 있음과 동시에 저온에서 안정한 모든 물질을 처리 할 수 있어 표면처리의 폭 넓은 장점을 지니고 있다. 플라즈마 처리는 친수성을 높이고 고분자 표면에 극성을 띄게 하여 표면 에너지를 높이는 효과를 이용하여 고분자의 표면 에너지 및 거칠기를 증가시켜 세포 부착에 유리한 구조로 변화시킨다고 알려져 있다.⁶⁻⁸⁾

본 연구에서는 플라즈마 처리를 이용하여 가스발포와 염침출법을 통해 제조된 미세기공 구조를 갖는 골형성 PCL 지지체 표면에 친수성과 생체적합성을 향상하기 위하여 산소 플라즈마 처리를 하여 그 표면의 특성과 골아 세포를 이용한 세포분화특성을 평가하고자 하였다.

제 2 장 이론적 배경

제 1 절 조직 공학

조직공학(tissue engineering)은 생물 및 분자생물학, 화학, 재료과학, 공학, 의학의 개념과 기술을 통합 응용하여 생체 조직의 구조와 기능의 상관 관계를 이해하고, 나아가 조직 및 장기의 재생을 통해, 우리 몸의 기능을 유지, 향상 또는 복원하는 것을 목적으로 하는 학문이다. 초기 연구는 해부학적 또는 조직 공학적으로 인체의 조직과 유사한 조직 또는 장기를 생성시키는 것으로부터 시작 되었으나, 현재의 연구에서는 조직화되고 생리적 기능까지 담당하는 거의 모든 장기에 응용되고 있다. 주로 뼈, 연골, 인대, 혈관, 심장 등의 다양한 인체 조직이 조직 공학적 방법을 이용하여 연구 개발되고 있다. 또한, 조직공학은 장기 이식술과 관련된 장기 거부 반응, 장기적 면역억제제 사용에 의한 부작용, 기증 장기의 절대 부족 등의 장기 이식술의 문제점들을 피할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 이러한 장점으로 인해 조직공학은 조직 재생의 기대와 새로운 의학 치료에 적합한 과학기술로 인식되고 있다.^{9,10)}

조직공학의 중요 인자는 새로운 조직 성장 요구를 충족하는 적합한 분해율을 지닌 3D 지지체를 제작하는 것이다. 세포-세포, 세포-매트릭스 사이에 서로 소통을 가능하게 하는 상호 연결된 기공(pore)의 공급, 조직 형성을 위한 세포들의 집단, 세포 표현형의 발현과 정상 조직의 구조 및 기능의 획득 등이 이루어져야 한다.¹¹⁾

제 2 절 생분해성 고분자

ASTM(American Society for Testing and Materials)에서 규정한 분해성 고분자와 생분해성 고분자에 관한 용어의 정의를 보면, 분해성 고분자는 ‘임의의 환경 조건하에서 화학구조가 현저하게 변화하고 표준적인 시험 방법에 의해서 물질의 변화가 측정되는 고분자’이며, 생분해성 고분자는 ‘자연계에 존재하는 미생물의 활동에 의해 분해되는 분해성 고분자’로 되어 있다. 이 정의에서 보면 생분해성에 대한 정의가 다소 모호할 수도 있으나 실제로 ASTM에서 제시하는 표준시험방법은 이산화탄소, 메탄가스의 발생량을 측정하여 생분해 정도를 측정하게 되어 있으므로 결국은 위의 전 과정을 반영하는 것으로 볼 수 있다. 또한 국제표준기구인 ISO(International Standard Organization)에서는 최종 생분해(ultimate biodegradation)를 미생물의 작용으로 유기물의 분해가 발생하고 최종적으로 이산화탄소, 물과 무기염/생체 물질을 생성하는 과정을 생분해로 규정하고 있다. ISO 472에 의한 분해성 고분자에 대한 정의는 분해성 플라스틱을 생분해성 고분자와 분해성 고분자로 분류하고 있다.¹²⁻¹³⁾

1. 천연 고분자

곡물에서 추출되는 전분, 게나 새우의 껍질에서 얻을 수 있는 키틴, 셀룰로오스 등이 생분해성을 갖는 천연 고분자계라 할 수 있다. 이는 합성하거나 미생물에 의해 생산된 분해성 고분자들에 비해 가공성이 떨어지나, 가격이 저렴한 편으로 공급이 원활하고 인체독성을 유발시키지 않는다. 이들 천연고분자의 가공성을 향상시키기 위한 다양한 변성 기술이 연구되고 있다.¹⁴⁾

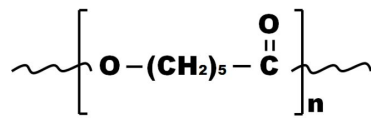
2. 합성 고분자

가. 폴리카프로락톤(polycaprolactone)

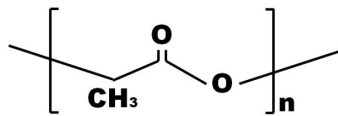
본 연구에서 활용한 폴리카프로락톤(polycaprolactone, PCL)은 Fig. 1(a)과 같이 ϵ -caprolactone을 개환 중합반응 시켜 만든 고분자로서, 생분해성이고 구조상 탄소수가 많이 있기 때문에 소수성이며 분해속도가 느려 인체 내에서 생분해되는 기간은 2년 이상이며, 미생물에 의해 분해되는 합성 고분자이다. 또한 비교적 가격이 저렴하며, 기계적 물성이 우수하며, 유연성이 매우 좋으며 융점이 60 °C로 상당히 낮은 편이다.¹⁵⁾

나. 폴리락트산(poly(lactic acid, PLA))

폴리락트산(poly(lactic acid, PLA) (Fig. 1(b))은 현재 범용적으로 널리 쓰이며 PLA는 poly(α -hydroxy acid)의 일종인 지방족 폴리에스터이다. 지방족 폴리에스터는 대체로 열 및 수분에 약하므로, 가수분해 될 수 있으며 단위구조가 간단할수록 기계적 물성이 높고, 극성이 (=산소/탄소의 비) 클수록 분해가 빠르다. PLA는 체내에 존재하는 L-젖산의 중합체로서 메틸치환기의 배열에 따라 L형, D형과 meso 형의 광학 이성질체가 있으며 L형과 D형이 고결정성 물질로서 meso 형에 비해 융점이 높고 물성이 우수하다. PLA는 분자량 및 결정성에 따라 체내 강도유지기간은 약 6개월이고 체내물질 잔류 기간은 18-24개월이다. PLA는 적용기간이 긴 정형외과용 의료제품, 흡수성 봉합사, 약물 방출 조절성 재료 등으로 활용되고 있다.¹⁶⁾



(a) polycaprolactone



(b) poly lactic-acid

Fig. 1. Molecular structure of (a) polycaprolactone and (b) poly lactic-acid.

제 3 장 실험

제 1 절 실험재료

Polycaprolactone (PCL)은 Sigma-Aldrich ($M_n = 70,000 - 90,000$, Density = 1.145 g/ml) pellet을 사용하였다. chloroform (99.9%)과 NaCl (size 50-300 μm)은 sigma-aldrich (USA)에서 구입하여 사용하였다. NaCl은 규격체를 이용하여 200-250 μm 크기의 사이즈를 분리하여 실험에 사용하였다.

제 2 절 지지체 제조

Chloroform 15 ml에 PCL 2 g을 교반기를 이용하여 완전히 용해시키고, NaCl 37.5 g을 첨가하여 완전히 혼합될 수 있도록 충분히 교반하였다. 교반 후 PCL과 NaCl 혼합액을 테프론 몰드(지름 2 cm, 높이 0.5 cm)에 부어 원기둥 형태의 PCL/NaCl 지지체를 제작하고, 상온에서 24 시간 동안 건조한 후 몰드에서 분리하였다. 분리된 지지체는 상온에서 24 시간 이상 건조하여 용매로 사용된 chloroform을 완전히 제거하였고 진공오븐에 보관하여 사용하였다.

제 3 절 가스발포

지지체를 항온조에서 일정한 온도에 있는 스테인리스 스틸 반응기(Fig. 2)에 넣고 CO₂가스 bomb를 이용하여 50 bar 까지 가압한 후 지지체에 초임계 CO₂가 충분히 용해되어 평형에 도달할 수 있도록 일정온도와 압력에서 1 시간 동안 유지한 후 상압으로 감압하였다. 가스 방출 시간은 니들밸브를 이용하여 2 bar/sec으로 조절하였다. 가스발포 지지체는 증류수에 수 일 동안 침적시켜 염을 침출하였으며, 증류수는 매일 교체하였다. 염이 제거된 지지체는 진공오븐에서 24 시간 이상 건조하였다.

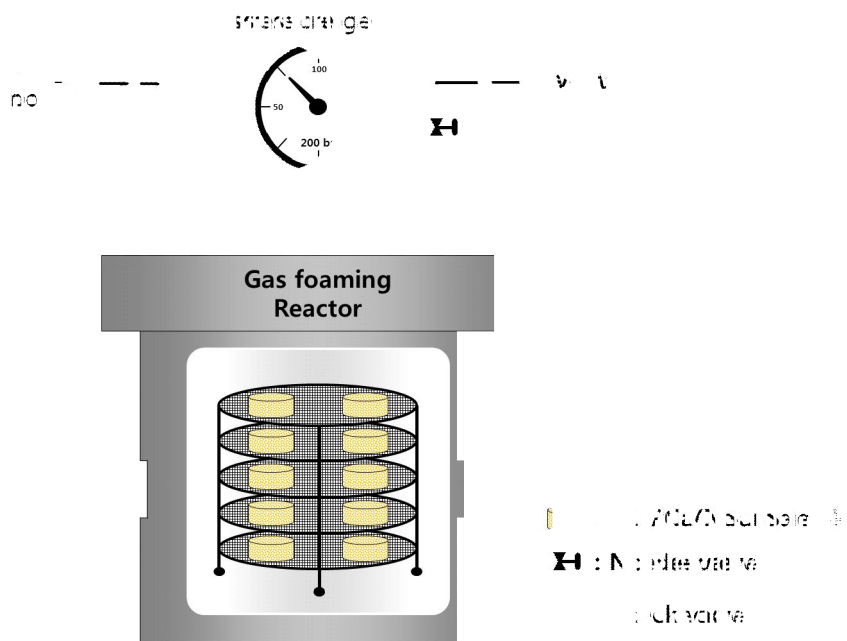


Fig. 2. Gas foaming apparatus.

제 4 절 플라즈마 처리

플라즈마 반응장치의 구성도는 Fig. 3에 나타내었다. 플라즈마 중합에 RF (radio frequency) 13.56 MHz의 축전 결합형 플라즈마(CCP : capacitively coupled plasma) 타입의 장비(Plasmart Inc. Korea)를 사용하였다. 325 mm 직경과 175 mm 높이의 진공 챔버는 로터리 펌프로 최대 10^{-3} Torr 진공도를 유지한다. 시료대는 상부 전극으로부터 30 mm 떨어진 곳에 위치한다. 플라즈마 중합반응은 입력파워 100 W를 인가하여 60초 동안 10 ± 2 mTorr의 조건에서 산소 (O_2) 처리하였다.

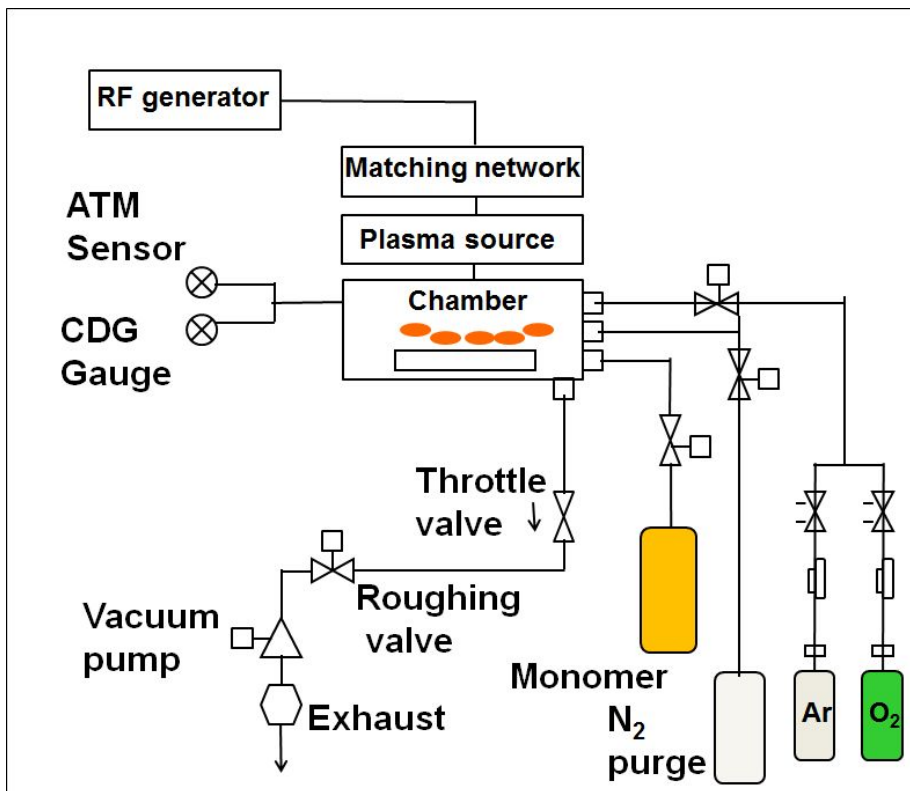


Fig. 3. Schematic diagram of plasma equipment.

제 5 절 조골모 세포 배양

세포 배양은 α -MEM (alpha minimum essential medium with ribonucleosides, deoxyribonucleosides, 2 mM L-glutamine and 1 mM sodium pyruvate, but without ascorbic acid, GIBCO, Custom Product, Catalog No. A1049001) 배지에 growth factor를 제공하는 10% (w/v) fetal bovine serum (PAA Laboratoris.inc A15-751)과 항생제인 amphotericin (Lonza walkersville MD USA 0719)을 혼합하여 5% CO₂가 공급되는 37°C, CO₂ incubator (MCO-15AC, Sanyo Electric Co., Ltd.)에서 48시간 배양하였다.

세포성장 배지는 2 일 간격으로 교체하였으며, Tryp LE (GIBCO 1640)을 이용하여 세포를 plate에서 분리시킨 후 4 °C 1000 rpm에서 3 분 동안 원심 분리하여 세포를 추출하였다. 그리고 계대배양을 통해서 얻어진 3세대 세포를 incubator에서 1일 동안 배양하여 실험에 사용하였다.

제 6 절 세포형상 관찰

플라즈마 처리된 지지체가 담겨진 12 well plate를 준비하여 1×10^5 cells/mL 의 세포를 파종하였다. 3 시간 후 2.5 % paraformaldehyde와 2.5 % glutaraldehyde 혼합용액으로 2 시간 전 고정을 진행하였다. PBS (phosphate buffered saline)로 세척을 하고 O_3O_4 (osmium tetroxide, Sigma-aldrich, 419494)를 이용하여 후 고정을 진행한 후 70 %, 90 %, 95 %, 100 % 알코올로 탈수 하였다. HMDSO (hexa-methyl-di-silazane, Fluka, 52630)를 이용하여 잔여 알코올을 제거 후 건조하였다.

제 7 절 생체적합성 평가

배양된 세포는 배지를 모두 제거한 후 PBS를 이용하여 세척하였으며 trypsin/EDTA를 소량 첨가하여 배양접시로부터 분리시켰다. 분리된 세포에 FBS가 포함된 배지를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 원심분리기를 이용하여 세포를 수집하였다. 세포에 배지를 첨가하여 다시 부유 시킨 후 준비된 샘플이 첨가된 12-well plate에 각각 1×10^5 cells/well을 파종하였다. 24 시간, 48 시간이 지나면 MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide, Sigma-aldrich, M2128)를 각 well 당 $100 \mu\text{l}$ 첨가하여 청자색의 결정이 생성되는 것을 확인하였다. 4 시간 후 DMSO (dimethyl sulfoxide, Junsei, 35535-0350)를 $1,000 \mu\text{l}/\text{well}$ 을 넣은 후 실온에서 30 분간 배양하였다.

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

모든 실험 데이터는 T-test를 통하여 신뢰도 95% ($\alpha=0.05$) 내에서 변수의 비교를 통하여 각각의 유의성 차이를 비교하였다.

제 8 절 표면분석

표면의 미세구조를 관찰하기 위하여 전계방출주사전자현미경 (FE-SEM: field emission scanning electron microscopy, S-4800, Hitachi, Japan)을 이용하여 플라즈마 처리된 가스 발포/염 침출 후 PCL 지지체를 관찰하였다. 표면의 결정구조를 관찰하기 위하여 X-선 회절분석장치 (X-ray diffractometer, X'pert, Philips, Netherlands)를 이용하였다. 친수성을 확인하기 위하여 PCL 필름과 플라즈마 처리된 PCL 필름의 접촉각을 측정하였다. 각 필름의 접촉각 변화를 관찰하기 위하여 증류수 약 5 μ l를 필름에 떨어뜨린 후, 접촉각 측정기 (GSA, surfacetect, Korea)로 5 초 후에 접촉각을 측정하였다.

제 4 장 결과 및 고찰

제 1 절 표면분석

Fig. 4는 가스 발포와 염 침출법으로 제조한 PCL 지지체의 사진이다. Fig 4(a)는 PCL에 NaCl을 혼합한 후 몰드에 부어 원기둥 형태를 만들고 건조한 상태의 PCL 지지체이다. NaCl 결정들이 PCL로 덮여 서로 연결된 모습을 확인할 수 있고, 딱딱하게 굳어진 상태이다. Fig 4(b)는 Fig 4(a)의 샘플을 초임계 이산화탄소로 가스 발포한 PCL 지지체이며, Fig 4(c)는 Fig 4(b)의 샘플을 염 침출한 후 PCL 지지체의 모습이다. NaCl이 빠져 나간 표면에 기공들을 볼 수 있고, 다공성을 갖는 부드러운 스펀지 상태의 지지체가 제작되었음을 확인하였다. 다공성 구조를 갖는 지지체의 기계적 성질과 공극율은 세포의 증식과 이동 그리고 분화 같은 생명 현상에 필수적인 산소나 영양분의 전달을 원활하게 해 주는 중요한 역할을 한다.¹⁷⁾

Fig. 5는 주사현미경 사진을 보여준다. Fig 5(a)는 PCL과 NaCl을 섞어 놓은 후 건조한 상태의 PCL 지지체의 표면 주사현미경 사진이다. NaCl 입자들의 표면이 PCL로 완전하게 덮여있음을 확인하였다. Fig 5(b)는 Fig 5(a)의 샘플을 초임계 이산화탄소로 가스 발포한 PCL 지지체의 주사현미경 사진이다. Fig 5(c)는 Fig 5(b)의 샘플을 염 침출한 PCL 지지체의 주사현미경 사진이고, Fig 5(d)는 Fig 5(c)를 확대한 주사현미경 사진이다. NaCl이 빠져나간 자리에 기공들이 생긴 모습을 확인할 수 있다. 플라즈마 처리 전후 평균 기공 크기는 $282.4 \pm 90.1 \mu\text{m}$, $342.0 \pm 64.6 \mu\text{m}$ 로 측정되었으며 그 분포곡선은 Fig 6과 같다.

가스 발포의 단계는 세 단계로 이루어진다. 고압 탱크로부터 고압 반응기로 이산화탄소의 가압 단계, 고압 반응기의 온도를 높이는 단계, 이산화탄소를 배출하는 감압 단계이다. 세 번째는 감압하는 속도에 따라 기공 크기 분포나 형태가 달라진다. 감압 속도는 2 bar/sec로 밸브 조절로 이산화탄소를 반응기로부터 배출하였다. 느린 감압 속도는 넓은 기공 크기 분포를 가지면, 소금 결정 모양을 그대로 유지할 수 있다. 빠른 감압 속도는 핵형성이 빠르

고, 핵형성 사이트가 많아진다. 확산 효과는 무시할 정도로 작은 달린 기공을 포함하는 균일한 기공 크기 분포를 이룬다. 이에 반해 느린 감압 속도는 초기에 핵형성으로 된 기공은 확산이 더 되면서 커지고, 더 넓은 기공 크기 분포를 만들어 낸다.^{18,19)} 90 % NaCl 농도의 PCL 혼합물에서는 감압 속도에 따른 기공 크기의 변화는 관찰되지 않았다.

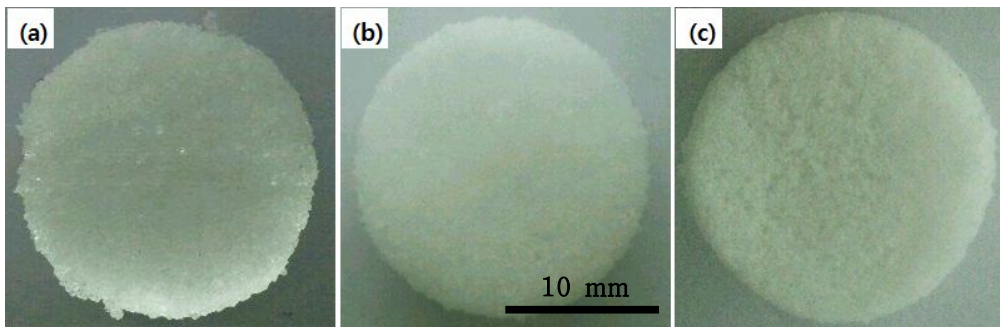


Fig. 4. Images of 3D PCL scaffolds fabricated from gas foaming/salt leaching. (a) PCL/NaCl composite, (b) supercritical CO₂ gas foamed PCL/NaCl composite, and (c) salt leached PCL scaffold.

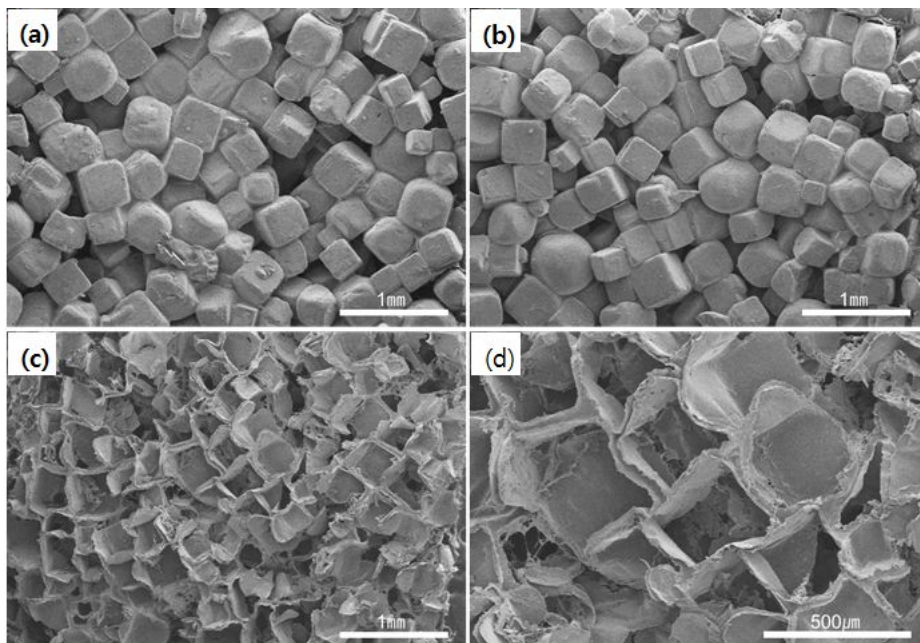


Fig. 5. SEM micrographs of PCL/NaCl composite and PCL scaffold. (a) PCL/NaCl composite, (b) supercritical CO₂ gas foamed PCL/NaCl composite, and (c) salt leached PCL scaffold.

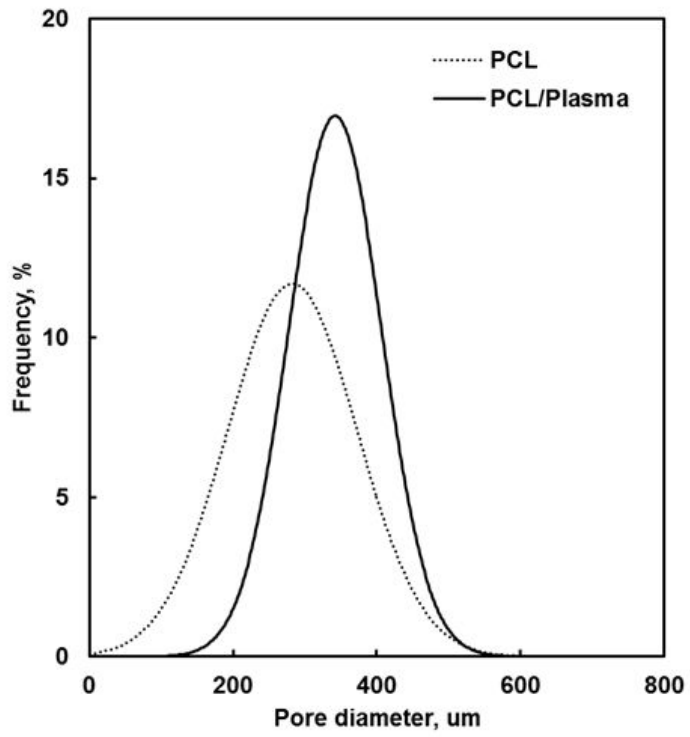


Fig. 6. Pore size distribution of salt leached PCL scaffold.

플라즈마 처리 후 표면의 친수성 확인을 위하여 접촉각을 측정한 결과는 Fig 7과 같다. Fig 7(a)는 초임계 이산화탄소 가스 발포와 염 침출법으로 제조한 PCL 지지체, Fig 7(b)는 산소 플라즈마 처리한 PCL 지지체의 접촉각 측정결과이다. PCL 지지체의 접촉각 측정결과는 93.3° 로 소수성을 나타내었으나, 산소 플라즈마 표면 처리된 지지체는 물방울이 표면에 떨어지는 순간 흡수되어 측정이 불가능하였다. 이러한 결과는 산소 플라즈마 처리 후 지지체의 표면이 친수성으로 변화하였음을 나타낸다. 소수성의 고분자는 배양액의 흡수력이 나쁘기 때문에 세포 활성을 제한한다. 그래서 poly-DL-lactide 같은 소수성 고분자에 polyethylene glycol의 친수성 고분자를 혼합하여 제조하고²⁰⁾, 세포외기질과 같은 역할을 하도록 천연 collagen 고분자를 섞어서 제조한다.²¹⁾ 하이드록시아파타이트(Hydroxyapatite, HA)를 충전하여 골 연골 이식재에 대한 연구도 보고되고 있다.²²⁾ 본 연구에서는 간단한 산소 플라즈마 표면 처리를 이용하여 소수성의 PCL 지지체의 표면을 친수성으로 변화시킴으로써 세포 수용기와 표면 관능기와의 상호 작용을 증가시켜 세포 부착을 증가시키고자 하였다. 지지체의 표면은 플라즈마 내의 이온과 라디칼과 충돌하고 표면 화학종이나 관능기와 반응하여 다른 관능기를 도입시킨다. 산소 플라즈마 처리는 극성의 하이드록실기(-C-OH), 카르보닐기(-C=O), 카르복실기(-OH-C=O)를 도입하고, 고분자 중심 구조의 -C-C-나 -C-H 결합을 끊는 작용을 한다. 이로부터 젖음성이나 표면 에너지를 증가시켜 생체적합성을 향상시킨다.²³⁾ 이와 같은 표면 산화 반응으로 친수성 그룹 도입은 세포의 분포와 성장을 증가시킨다.²⁴⁾

Fig 8은 PCL 지지체와 이를 산소 플라즈마 처리한 PCL 지지체의 XPS스펙트럼이다. 플라즈마 처리 전 지지체는 19.84%의 산소를 포함하였으나, 플라즈마 처리 후 27.30%로 산소 함량은 약 37.6% 증가하였으며, O/C비율(Table 1) 또한 산소 플라즈마 처리 후 증가되었다. 이는 산소 플라즈마 내의 활성 산소가 PCL 지지체 표면의 구성 성분들과 화학적으로 반응하여 결합을 했기 때문에 산소 원소 함량이 증가한 것으로 판단된다. Fig 9는 탄소와 산소 피크를 결합 에너지별로 분리한 그래프이다. 각 결합 에너지에서 284.5 eV는 C-C 결합, 286.6 eV는 C=O 그룹, 288.5 eV는 O=C-O 그룹을 나타낸

다.²⁵⁾ 각각의 결합에너지 분포의 비교결과는 Table 2와 같다. 산소 플라즈마 처리 후 PCL 지지체의 표면은 C=O과 O=C-O 그룹이 증가됨을 확인할 수 있었다.

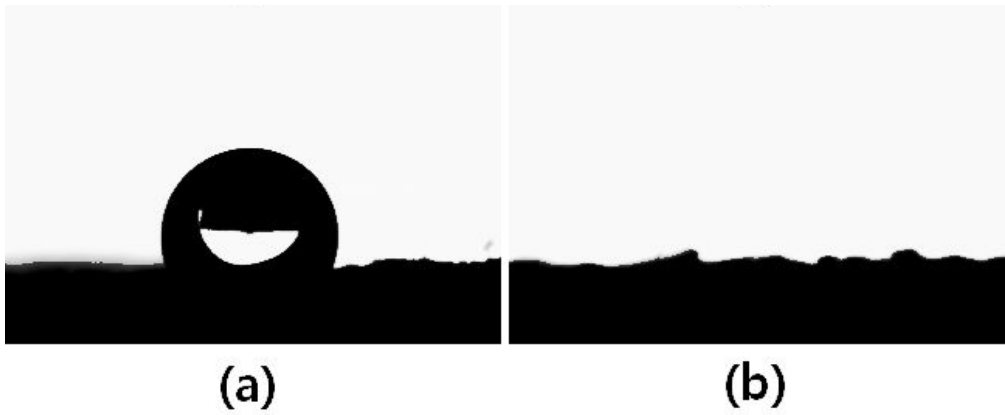


Fig. 7. Contact angle of (a) PCL scaffold and (b) oxygen plasma treated PCL scaffold.

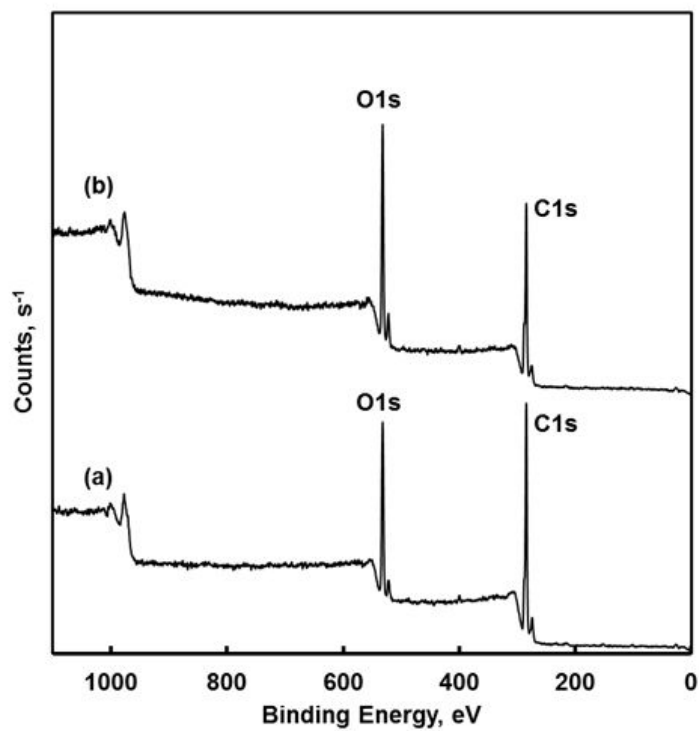


Fig. 8. XPS survey scan of (a) PCL scaffold and (b) oxygen plasma treated PCL scaffold.

Table 1. Atomic percent of (a) PCL scaffolds and (b) oxygen plasma treated PCL scaffold.

Samples	Atomic percent (%)			
	%C1s	%O1s	etc	O/C ratio
PCL scaffold	78.24	19.84	1.92	25.35
O ₂ plasma treated PCL scaffold	69.94	27.30	2.76	39.03

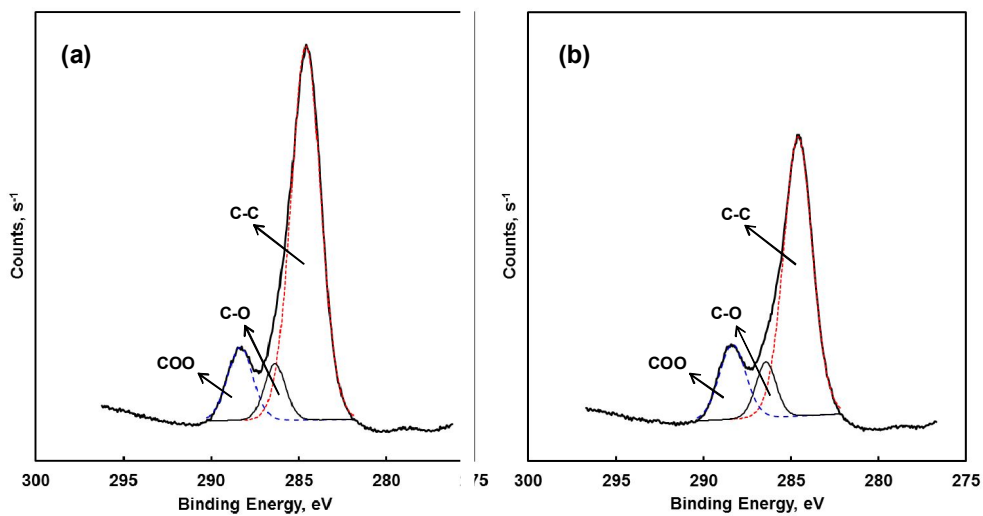


Fig. 9. C1s spectra of (a) PCL scaffold and (b) oxygen plasma treated PCL scaffold.

Table 2. Area percent of elements on (a) PCL scaffolds and (b) oxygen plasma treated PCL scaffold.

Samples	Area percent (%)		
	C-C (284.6 eV)	C-O (286.35 eV)	C=O (288.35 eV)
PCL scaffold	60.79	6.48	10.12
O ₂ plasma treated PCL scaffold	51.25	7.20	12.74

제 2 절 조골모 세포(MC3T3-E1) 증식

Fig 10은 제조한 PCL 지지체와 이를 산소 플라즈마로 처리한 PCL 지지체에 MC3T3-E1 세포를 접종하고 1일 동안 배양한 후 촬영한 주사현미경 사진이다. PCL 지지체 기공 안에 세포가 부착되어 있는 모습을 볼 수 있다. 산소 플라즈마 처리된 PCL 지지체의 기공 안의 세포 부착과 스프레딩이 우수하였다. 세포의 초기부착 및 스프레딩은 세포 사멸과 밀접한 관계가 있고, 세포 증식에 필요한 초기단계이다. 증가는 산소 플라즈마 처리된 PCL 지지체 표면에서 세포 스프레딩이 우수한 것은 지지체 표면의 친수성 증가와 산소 그룹 관능기가 도입되었기 때문이라고 사료된다.

Fig 11은 MC3T3-E1 세포의 MTT 평가 결과를 보여준다. MTT는 세포의 미토콘드리아 내의 효소 활성을 평가하는 것으로 세포의 수가 많으면 효소 활성이 증가한다. 산소 플라즈마 처리된 PCL 지지체에서 세포 활성이 1일차와 2일차 모두 증가되었다. 산소 플라즈마 처리된 PCL 지지체에 세포의 부착이 늘어나고, 이에 따른 세포 증식이 증가하였기 때문으로 유추할 수 있다.

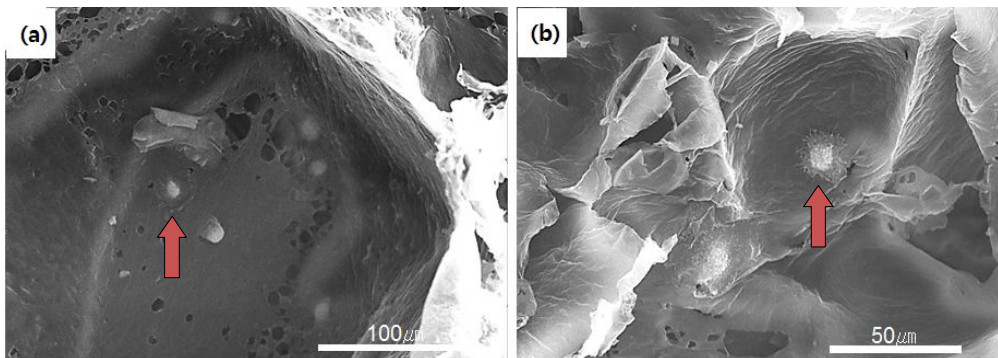


Fig. 10. SEM micrographs of (a) PCL scaffold and (b) oxygen plasma treated PCL scaffold seeded with MC3T3-E1 cells for 1 hr incubation.

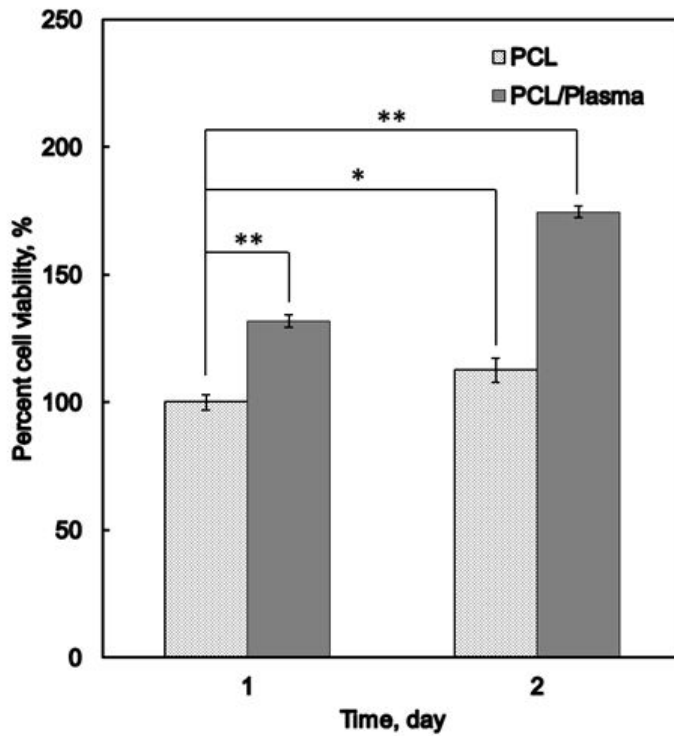


Fig. 11. MTT activity of the MC3T3-E1 cell seeded PCL scaffolds and oxygen plasma treated PCL scaffold for 1 and 2 days. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$; significant against the proliferation of MC3T3-E1 cells on PCL scaffold and plasma treated PCL scaffold corresponding day.

제 5 장 고 찰

가스발포 지지체란 이산화탄소나 질소, 헬륨 같은 불활성 기체를 고분자 재료 내부로 용해시켜 하나의 상을 이룬 후에 열역학적 불안정을 유발하여 재료 내에서 발포를 시킨 고분자 재료를 말한다.

가스발포는 고분자 재료/가스 용액 형성, 미세 기포의 핵형성, 기포의 확산 성장의 과정으로 이루어지며, 높은 온도에서뿐만 아니라 상온에서도 이루어질 수 있다. 지금까지의 연구에 의하면 폴리머 속으로 많은 양의 가스가 용해되면 고분자 재료의 유리전이 온도(glass transition temperature)와 결정화 속도(crystallization rate) 같은 물리적 특성이 변화되는 것으로 알려져 있다. 이때 높은 압력의 초임계유체(supercritical fluid)를 이용하면 더 많은 양의 가스를 고분자 재료에 용해시킬 수 있다. 이렇게 만들어진 고분자 재료/가스 용액은 압력의 급격한 저하나 온도의 증가로 인한 불안정을 거쳐 기포의 밀도(cell density)가 약 $10^9 \sim 10^{15}(\text{cells}/\text{cm}^3)$ 가 되며, 재료 내부에 생기는 기포의 크기는 마이크로미터 단위를 갖는다.^{26,27)}

초임계 유체는 임계 온도와 임계 압력 이상의 조건에 있는 물질로, 액체와 기체의 중간 성질을 나타낸다. 초임계 유체는 액체와 같은 밀도를 갖기 때문에 기체에 비하여 몇 자릿수 이상의 용매력(solubility power)을 가지며, 기체와 같은 점도를 갖기 때문에 확산 속도가 매우 크다.²⁸⁾ 따라서 초임계 유체는 액체 용매 수준으로 빠르게 고분자를 팽윤하여 평형에 도달한다. 그 중에서도 초임계 CO₂는 상대적으로 낮은 임계점을 가지고 있어서 초임계 조건에 쉽게 도달할 수 있으며, 무독성, 불연성이고 값이 싸다는 장점을 가지고 있다. 이러한 장점들 때문에 1990년대 들어서부터 미세기포 고분자 발포체를 제조하는데 초임계 CO₂가 본격적으로 사용되어 왔다. 초임계 CO₂를 이용한 발포 공정의 일반적인 메커니즘은 다음과 같다. 우선, 일정 온도와 압력에서 고분자 시료를 초임계 CO₂에 포화시킨다. 평형상태에서 압력을 급격히 강하시키면 과포화에 따른 열역학적 불안정성에 의해 핵이 생성된다. 생성된 핵은 과포화된 기질로부터 확산된 CO₂에 의해 cell로 성장한다. 이후, 기질 내의 CO₂ 농도가 감소하면 기질의 유리전이온도(T_g)가 상승하거나 결정화가 일

어나면서 기질의 변형성(deformability)이 감소하여 cell 성장이 정지된다. 이러한 압력 강하(depressurization) 방법에 의하여 제조된 발포체는 미세한 닫힌 기포(closed cell) 구조를 가진다.²⁹⁾

대부분의 고분자는 분자량의 증가에 따라 초임계 유체로의 용해도가 감소되어 실질적으로 용해되지는 않으나 고분자에 용해된 CO₂는 고분자의 유리전이온도(T_g)와 용점(T_m)을 저하시킨다. Handa는 PS(polystyrene)의 T_g를 여러 CO₂ 압력 하에서 측정하였으며, PP(poly propylene)나 PET(poly ethylene terephthalate)의 T_m이 CO₂의 압력상승에 의해 직선적으로 저하됨을 밝혀냈다.³⁰⁾ Condo는 고압 CO₂ 하에서 전이온도를 계측하여 압력 증가에 대하여 고분자 물질의 전이온도가 단순한 직선적 변화를 나타내지 아니하고 비선형적인 변화 거동을 취한다는 것을 보고하였다.³¹⁾ Nawaby는 Condo가 예측한 비선형 거동이 ABS/CO₂계에서 일어남을 보여주었다.³²⁾ 초임계 상태에서 T_g와 T_m의 저하 현상은 조성물의 유변학적 성질과 더불어 블렌드 발포 시스템의 성공 유무를 판단할 수 있는 기준을 제시하는 중요한 요인 중 하나이다. 따라서 블렌드 조성물 발포 시에는 포화 압력 수준에 따라서 저하되는 T_m 범위를 감안한 발포 기술이 요구된다. 또한 초임계 CO₂가 고분자에 침투해 완전히 용해되는데 까지 걸리는 시간(용해도)을 파악하는 것은 발포공정에 있어 중요하다. 초임계 CO₂가 고분자에 충분히 용해되지 않으면 발포율이 떨어지고 cell 구조가 균일하지 못한 문제점이 있기 때문에 충분한 용해시간을 확보해주는 것이 중요하다. 고분자에 CO₂가 얼마까지 용해되는 지(용해도) 또는 얼마만큼 빠르게 침투되는지(확산속도)의 기초 데이터는 막 분리 분야연구에서 많이 볼 수 있다.

고분자 재료/가스 용액은 고압가스 상태에 놓인 고분자 재료에 가스가 용해되면서 이루어진다. 이 용액 형성은 고분자 모체(polymer matrix)에서 기체의 확산(diffusion)에 의해 지배된다. 고분자 재료 속에서의 기체 확산은 매우 느리게 이루어진다. 이 용해 과정을 촉진하기 위하여 기체 압력을 크게 하여 확산도(diffusivity)를 증가시켜 용액 형성 시간을 줄일 수 있다. 여기에서 고분자 재료가 용질(solute), 가스가 용매(solvent)인데 이러한 역할이 뒤바뀌는 것은 가스 발포 공정에서 매우 중요한 요소이다.

다음 단계로 형성된 용액의 열역학적 불안정성 유도이다. 이것은 용액의 온도와 압력 조절에 의해 용액의 용해도(solubility)가 낮아지면서 이루어진다. 시스템은 자유 에너지(free energy)가 낮은 상태로 되려는 경향이 있는데 이 자유 에너지는 기포핵(cell nuclei)의 형태로, 기체분자의 덩어리고 귀착된다. 기포 핵형성은 용액에서 기체 분자들이 확산하는 평균자유거리(mean free distance)를 작게 한다. 기체가 셀(cell)로 확산됨에 따라 시스템의 자유에너지는 작아진다. 기포 핵형성 절차는 물질을 통해서 균일하게 일어날 수 있고 상 경계면(phase separation boundary)에서와 같이 높은 에너지 구간에서는 비균일하게 일어날 수 있다. 기포핵 형성 절차는 물질의 셀 형태를 더 넓은 범위에서 물질의 속성들을 결정짓는다는 점에서 미세 발포 고분자 제조에 중요한 의미를 갖는다.

일단 셀이 형성되면, 별다른 장애가 가해지지 않으면 셀은 성장한다. 고분자 재료에 녹아 있던 가스 분자는 핵이 생성된 셀 속으로 확산된다. 셀 성장은 확산율과 점탄성의 가스/고분자 재료 용액의 경도(stiffness)에 의해 제한 받는다. 경도가 너무 크다면, 셀은 성장할 수 없다. 이러한 경우 모체의 경도를 작게하기 위해 온도를 높여서 경도가 낮아지도록 할 수 있다. 기포의 성장과정은 성장시간, 시스템의 온도, 폴리머 모체에 적용된 정수압이나 응력, 과포화 상태 정도, 폴리머/가스 용액의 점탄성적 속성에 의해 조절된다.

가스발포 지지체는 가스가 들어가서 발포가 된 만큼 재료가 절감되는 장점뿐만 아니라 기존 발포의 단점으로 지적되던 불균일하고 큰 발포 기포에서 기인된 충격 강도와 인장 강도 등 기계적 성질이 개선된다는 장점도 지닌다.³³⁻³⁶⁾

다수의 핵형성이 일어나더라도, 발포체의 최종 셀 밀도가 높아진다고 보장할 수는 없다 셀 성장 중에 셀들이 붕괴한다면, 최종 셀 밀도는 초기 셀 밀도에 비해 저하하게 된다.

발포가 시작될 때 셀들은 닫혀져 있으며, 발포 가스는 셀 붕괴를 일으키지 않고 빠져나간다. 핵형성 후 셀들이 성장함에 따라, 주위의 셀들이 붕괴하는 경향을 갖는데, 이는 셀 붕괴에 의한 셀들의 표면적이 감소하게 되어 전

체 자유 에너지가 낮아지기 때문이다.³⁷⁾ 셀들이 팽창하여 셀 벽이 극도로 얇아지면, 셀 내부 압력을 극복하지 못하여, 붕괴하게 된다. 셀 형성 과정에서 발생하는 전단 장(shear field)은 형성된 셀들을 신장(stretching)하는 경향을 나타내고, 이로 인해 셀 붕괴는 가속된다. 닫혀진 셀들은 하나 이상의 셀막이 붕괴할 때 오픈되기 시작하는데, 일단 붕괴하면 셀 붕괴는 매우 빠르게 진행된다.

셀 벽은 중력에 의해 얇아질 수도 있고 캐필러리 작용에 의한 흘러내림(drainage)에 의해 얇아질 수도 있다. Place와 Young은 셀 내에서 두 개 이상의 골격의 접합점에서의 캐필러리 압력이 막에서의 캐필러리 압력에 비해 낮다고 제안하였다.³⁸⁾ 따라서, 막에서 골격으로의 유체 흐름이 향상되어 셀 벽은 극도로 얇게 되고 붕괴가 일어나게 된다. 캐필러리 배수 현상은 골격 교차점 사이 거리의 제공에 비례한다.

닫힌 셀의 안정된 발포체를 생산하기 위해서는 셀이 최대 팽창되었을 때, 셀 벽이 붕괴를 극복할 수 있을 정도로 충분한 침(탄성)을 가져야 한다. 그리고 고분자의 모듈러스가 충분히 높아, 셀들이 내부 압력에 관계없이 치수적으로 안정하도록 해야 한다.

Behravesh와 그의 연구진³⁹⁾은, 다이 온도 제어에 의해 melt strength를 증가시켜 셀 붕괴를 저지하는 방법을 제안하였다. 발포 온도가 증가하면 점도와 표면장력이 감소되고, 셀 벽이 보다 쉽게 얇아지게 되어 셀 붕괴가 쉽게 일어난다. 그러나 온도 감소에 따른 melt strength의 증가는 부피 팽창이 일어날 때 셀 벽의 연신 흐름에 대한 저항을 증가시킨다. 셀 붕괴를 방지하기 위해, 압출 다이 출구의 온도를 낮추는 방법은 잘 알려져 있고, 기존 발포 공정에서, 특히, 저밀도 발포 생산에서 응용되고 있다. 고분자의 melt strength를 향상시키는 방법으로는 가교, 온도 감소, 분자량과 분자량 분포의 조절, 고분자 블렌딩과 블렌딩의 상용화 등이 있다.

일반적으로 물질의 상태는 고체, 액체, 기체, 플라스마 상태의 4가지 영역으로 나눌 수가 있다. 기체입자, 즉 기체분자나 원자에 에너지를 가하면 최외각 전자가 궤도를 이탈하게 되는데, 이때 기체 입자는 양전하의 이온과 음전하인 전자로 분리되어 전하를 띤 하전 입자로 변하게 된다. 이러한 양전하

의 이온과 음전하의 전자들이 다수 모여 군집 활동을 하며, 이온들의 수와 전자들의 수가 거의 같아 전체적으로는 전기적 중성 상태를 유지하게 되는데, 이 상태를 플라즈마라 한다.

일반적으로 공간 내에 발생하는 인위적인 플라즈마 현상은 전기적인 에너지에 의해 발생된 전자나 공간 내의 자유 전자들이 전기장에 의해 가속되고 공간내의 Gas 입자와 충돌하여 이온화 반응에 의해서 플라즈마가 형성된다. 플라즈마 내의 하전 입자들은 전자의 경우 가스 입자와 충돌하여 이차전자를 방출하거나, 양극 극판으로 이동, 벽을 구성하는 입자와 충돌 및 양이온과 재결합 과정을 겪으면서 소멸하게 된다. 이러한 반응은 플라즈마를 형성할 수 있는 에너지가 주어지는 동안 계속 반복되어진다.⁴⁰⁾

여기(activated)되는 방법과 작동 에너지에 따라 낮거나 혹은 높은 온도의 환경을 만들어낼 수 있으며, 각각 저온 플라즈마 또는 열 플라즈마로 구분할 수 있다. 저온 플라즈마 발생기술은 저압인 상태에서 이루어지는데 플라즈마를 방전 시킬 때 대기압인 760 Torr 정도의 압력에서 발생시키는 것보다 대기압보다 낮은 1 mTorr ~ 100 mTorr 정도의 압력에서 발생시키는 것이 더 쉽기 때문에 대부분의 플라즈마는 대기압 보다 낮은 압력 하에서 방전되어 왔다. 또한 플라즈마 공정은 온도에 따라 수만도 정도의 온도와 $10^9 \sim 10^{10}/\text{cm}^3$ 의 밀도를 갖는 저온 글로우 방전 플라즈마와 수천만도 이상의 온도와 $10^{13} \sim 10^{14}/\text{cm}^3$ 의 밀도를 갖는 초고온 핵융합 플라즈마로 구분하기도 한다. 반도체 공정에서 플라즈마 식각 및 증착, 금속이나 고분자의 표면처리, 신물질의 합성 등에서 공정의 미세화, 저온화의 필요성 때문에 저온 글로우 플라즈마 공정이 종래의 공정을 대체하고 있다. 고분자 재료의 경우 소수성, 친수성, 염색성, 접착성 등을 개선하여 이들에 의해 만들어지는 섬유나 재료의 기능을 향상시킬 수 있다.

제 6 장 결 론

초임계 이산화탄소 가스발포와 염 침출법을 이용하여 다공성 폴리카프로락톤 지지체를 제조하였으며, 산소 플라즈마 표면 처리를 통하여 MC3T3-E1 세포의 증식을 조사하였다.

(1) 초임계 이산화탄소 가스발포와 염 침출법을 이용하여 제작한 PCL 다공성 지지체는 적당한 크기의 기공이 발달하였고 기공 간 상호연결이 잘 되었다.

(2) 산소 플라즈마 처리를 한 폴리카프로락톤 다공성 지지체의 경우 처리하지 않은 폴리카프로락톤 다공성 지지체에 비해 친수성이 향상되었다.

(3) 산소 플라즈마 처리를 한 폴리카프로락톤 다공성 지지체의 경우 처리하지 않은 폴리카프로락톤 다공성 지지체에 비해 세포 증식이 향상 되었다.

이상과 같은 결과들로 미루어 볼 때 초임계 이산화탄소 가스발포와 염 침출법으로 제작된 다공성 폴리카프로락톤 지지체의 표면을 산소 플라즈마로 표면개질하면 골 재생이 우수한 조직 공학적 생체재료로 사용가능 할 것으로 사료된다. 향후 동물실험을 통하여 실제 신생골의 재생능을 평가해야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

- [1] Fox SP, Tissue Engineering. Alan R. Liss Inc., New York, (1998).
- [2] 한국과학기술정보연구원, 생체조직공학기술 동향분석, (2005).
- [3] 신승우, The effect of Poisson's ratio of scaffolds on chondrocytes proliferation under compressive stimulus, (2010).
- [4] Kim Hy, Yoo MK, Park IK, A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. Biomaterials 24, 801-808, (2003).
- [5] 유성미, Effect of nanofibrous PLGA/gelatin scaffolds on adhesion and proliferation of human endothelial/smooth muscle cells for vascular tissue engineering application, (2010).
- [6] D Yuanyuan, W Zhongyi, Y Wei, et al, Preparation of collagen coated electrospun nanofibers by remote plasma treatment and their biological properties, Journal of Biomaterials Science Polymer Edition, 18, 1153 (2007).
- [7] F Yang, JGC Wolke and JA Jansen, Biomimetic calcium phosphate coating on electrospun poly (epsilon-caprolactone) scaffolds for bone tissue engineering, Chemical Engineering Journal, 137, 1, 154 (2008).
- [8] X Li, J Xie, J Lipner, et al., Nanofiber scaffolds with gradations in mineral content for mimicking the tendon-to-bone insertion site, Nano Letters, 9, 2763 (2009).
- [9] James J. Yoo. Korea medical book publisher co. Tissue engineering: concepts and applications, 21-58 (1998).
- [10] James J. Yoo, Il Woo Lee et al. Koonja publishing inc. Tissue engineering and Regenerative Medicine chapter 1
- [11] X. M. Mo et al. Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation. Biomaterials 25, 1883-1890 (2004).

- [12] 환경부 한국환경기술진흥원 (2007). 분해성 플라스틱 최근 동향 및 플라스틱 대체품 기술 현황, (주) 포텍, 서울.
- [13] 이기영, 조중수 (1998). 생분해성 고분자, 전남대학교 출판부.
- [14] Reis RI, Cunha Am, Allan PS, Bevis MJ, Mechanical behavior of injection molded starch-based polymers, *Polym Adv Technol.*, 7, 784 (1996).
- [15] Gough Je, Christian P, Scotchford CA Jones IA, Craniofacial osteoblast response to polycaprolactone produced using a novel boron polymerisation technique and potassium fluoride post-treatment, *Biomaterials*, 24, 4905 (2003)
- [16] Wikimedia Commons, <http://commons.wikimedia.org/>
- [17] Dehghani F, Annabi N (2011). Engineering porous scaffolds using gas-based techniques. *Curr Opin Biotech* 22:661-666.
- [18] White LJ, Hutter V, Tai H, Howdle SM, Shakesheff KM (2012). The effect of processing variable on morphological and mechanical properties of supercritical CO₂ foamed scaffolds for tissue engineering. *Acta Biomater* 8:61-71.
- [19] Ji C, Annabi N, Hosseinkhani M, Sivaloganathan S, Dehghani F (2011). Fabrication of poly-DL-lactide/polyethylene glycol scaffolds using the gas foaming technique. *Acta Biomater* 8:570-578.
- [20] Karimi M, Heuchel M, Weigel T, Schossig M, Hofmann D, Lendlein A (2012). Formation and size distribution of pores in poly(ϵ -caprolactone) foams prepared by pressure quenching using supercritical CO₂ 61:175-190.
- [21] Annabi N, Fathi A, Mithieux SM, Weiss AS, Dehghani F (2011). Fabrication of porous PCL/elastin composite scaffolds for tissue engineering applications. *J Supercrit Fluid* 59:157-167.
- [22] Salerno A, Iannace S, Netti PA (2012). Graded biomimetic osteochondral scaffold prepared via CO₂ foaming and micronized

NaCl leaching. Mater Lett 82:137–140.

- [23] Yildirim ED, Gandhi M, Fridman A, Gucer S, Sun. W (2008). Plasma surface modification of three dimensional poly(ϵ -caprolactone) scaffolds for tissue engineering application. NATO science for peace and security series series A: chemistry and biology 191–201.
- [24] Lee HU, Jeong YS, Koh KN, Jeong SY, Kim HG, Bae JS, Cho CR (2009). Contribution of power on cell adhesion using atmospheric dielectric barrier discharge (DBD) plasma system. Curr Appl Physi, 9:219–223.
- [25] Lee HU, Jeong YS, Jeong SY, Park SY, Bae JS, Kim HG, Cho CR (2008). Role of reactive gas in atmospheric plasma for cell attachment and proliferation on biocompatible poly ϵ - caprolactone film. Appl Surf Sci, 254:5700–5705.
- [26] S. W. Cha, A Microcellular foaming/forming process performed at ambient temperature and p auper microcellular foaming process, M.I.T., 12–15 (1994).
- [27] 윤재동, 가스의 용해량에 따른 고분자의 유리전이 온도 및 점도, 석사 학위 논문, 연세대학교, 9–21 (1998).
- [28] K. N. Lee, Y. J. Suh, H. J. Lee, and J. H. Kim Polymer(korea), 23, 181 (1999).
- [29] S. K. Goel and E. J. Beckman, Polym. Eng. Sci., 34, 1137 (1994).
- [30] Z. Zhang and Y. P. HANDA, Macromolecules, 30, 8505, (1997).
- [31] P. D. Condo, I. C. Sanchez, C. G. Panayitou and K. P. Johnston, Macromolecules 25, 6199, (1992).
- [32] S. Lu, Z. Zhang, A. V. Nawaby M. Day, J. Appl. Polym. Sci., 93, 1236, (2004).
- [33] Chul Bum Park, The role of polymer gas solutions in continuous processing of microcellular polymers, M.I.T., 15–20 (1993).

- [34] Baldwin, F. D., Microcellular polymer processing and the design of a continuous sheet processing system, M,I,T., 14–18 (1994).
- [35] Waldman, F.A., The processing of Microcellular foam, S.M. Thesis in Mechanical Engineering, Massachusetts institute of technology, 15–18 (1982).
- [36] Colton, J.S. and Suh, N.P., The nucleation of microcellular thermoplastic foam, Ph. D. Thesis in mechanical engineering, Massachusetts institute of technology, 12–16 (1985).
- [37] C.B. Park, A. H. Behraves, and R. D. Vender, “Low Density Microcellular Foam Processing in Extrusion Using CO₂”, Polymer Eng. and Sci., Vol. 38, No. 11, pp.1812–1823 (1998).
- [38] J.J. Saunders, “Handbook of Polymeric Foams and Foam Technology”, ed. by D. Klemperer and K.C. Frisch, Chap. 2, pp. 5, Hanser Publishers, New York (1991).
- [39] A.H. Behraves, C.B. Park, M. Pan, and R.D. Venter, 212th National ACS Meeting, Polymer Preprints, 37, 767 (1996).
- [40] Laurent M. Matuana, Chul B. Park, John J. Balatinecz, Effect of cell morphology in the properties of microcellular foamed PVC/WOODFIBER composites, ASME, 76 (1996).