

역전사 증합효소 연쇄반응을 이용한 표면 적십성에 따른 골수유래 줄기세포의 생물학적 평가

김은정 · 박종수* · 김문석* · 조선행* · 이종문 · 이해방* · 강길선†

전북대학교 유기신물질공학과, *한국화학연구원 나노생체의료고분자팀

(2004년 1월 20일 접수, 2004년 4월 20일 채택)

Biological Evaluation of Bone Marrow-Derived Stem Cells onto Different Wettability by RT-PCR

Eun Jeong Kim, Chong Soo Park, Moon Suk Kim*, Sun Hang Cho*,
John M. Rhee, Hai Bang Lee*, and Gilson Khang†

Department of Advanced Organic Materials Engineering, Chonbuk National University,
664-14, Duckjin Dong 1 Ga, Duckjin Gu, Jeonju, 561-756, Korea

*Nanobiomaterials Laboratory, Korea Research Institute of Chemical Technology,
P. O. Box 107, Yuseong Gu, Daejeon 305-600, Korea

†e-mail : gskhang@chonbuk.ac.kr

(Received January 20, 2004; accepted April 20, 2004)

초록 : 고분자 생체재료에서 세포부착과 성장은 재료의 적십성, 화학구조, 표면전하 및 거칠기 등의 표면 성질에 의존한다. 본 연구에서는 저밀도 폴리에틸렌 필름 (LDPE)의 표면 적십성과 골수유래 줄기세포의 증식 및 성장성을 측정하기 위하여 플라즈마 처리를 실시하였으며 개질된 필름 표면의 특성을 조사하였다. 또한 LDPE 필름에서의 세포부착과 증식률은 세포수 관찰과 역전사 증합효소 연쇄반응으로 확인하였다. 표면 성질의 하나인 물 접촉각 측정 결과 플라즈마 처리 시간이 길어짐에 따라 필름표면의 접촉각이 감소하였으며 암형성 유전자와 암억제 유전자의 발현률이 60~70° 사이에서 높음을 확인할 수 있었다. 또한 세포수 관찰을 통해 접촉각이 60~70°인 표면에서 세포 증식률이 우수하여 표면성질이 세포의 성장과 분화에 중요함을 확인하였다.

ABSTRACT : The adhesion and proliferation of mammalian cells on polymeric biomaterials depend on the surface characteristics such as wettability, chemistry, charge and roughness. In order to recognize the correlation between the adhesion and proliferation of human bone marrow derived stem cells (BMSCs) and surface property, radio frequency generated plasma treatment on low density polyethylene (LDPE) has been carried out. The modified LDPE surfaces were characterized by measuring the static water contact angle. The adhesion and proliferation of cells on LDPE films were characterized by cell counting and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The water contact angle of the film surface decreased with plasma treatment time. Proto-oncogenes (c-myc, c-fos) and tumor suppressor gene (p53) showed maximum expression with contact angle of 60~70° range of LDPE film. By cell counting, we confirmed that the rate of cell proliferation appeared the higher on the film surface of the contact angle of 60~70°. We concluded that the surface wettability is an important role for the growth and differentiation of BMSCs.

Keywords : LDPE film, plasma treatment, surface wettability, contact angle, proto-oncogene, tumor suppressor gene.

1. 서론

조직공학이 발전하면서 여러 가지 생체재료들이 사용되고 있으며, 이식이 가능하고 장기간 사용할 수 있는 인

공조직이나 인공장기가 개발되어 사용되고 있다.¹⁻³ 그러나 재료의 생체적합성이 여전히 문제점으로 남아 있으며, 이식물 주위에서의 종양형성은 더 나은 생체재료의 개발을 위해 해결해야 할 문제점 중 하나이다.^{4,7} 이식물 주

위에서 중앙형성은 주로 재료의 물리적인 특성 즉, 거칠기나 표면형태 등에 의해 영향을 받으며 화학적인 요인도 중요한 역할을 한다. 세포와 생체재료의 상호작용은 이식이 가능한 생체재료의 개발과 발전에 있어서 가장 중요한 요소로서 생체재료의 표면 특성 즉, 적심성, 전하, 화학 및 거칠기 등에 의해 지배된다.⁸⁻²⁷

본 연구팀에서는 일련의 연구로서 코로나 방전처리를 이용하여 저밀도 폴리에틸렌 (LDPE)에 적심성 구배표면을 만들고 이들의 표면 성질 변화에 따른 세포접착 및 성장을 측정하여 표면의 접촉각이 55~60° 일 때 세포접착 및 성장이 최적임을 확인하였다.^{8,11-13,15,18,19,23,26,27} 한편 Kato 등은 여러 가지 고분자 표면을 이용하여 생체재료와 세포와의 상호작용을 연구하였는데,²⁸ 접촉각을 다양하게 하기 위하여 세포 배양용 폴리스티렌 플라스크, 고밀도 폴리에틸렌, 나일론, 테트라플루오로에틸렌-헥사플루오로프로필렌 공중합체 및 에틸렌 비닐 알코올 공중합체 등과 같은 여러 가지 지지체를 사용하여 표면 적심성에 따른 mRNA 중에 암형성 유전자인 c-myc, c-fos 및 암억제 유전자인 p53을 정량하였다. 그러나 이러한 여러 종류의 지지체들은 적심성이 일련적으로 다르다고 할지라도 표면의 화학적 구조나 표면에 그래프트된 정도가 모두 일정하지 않기 때문에 동일한 조건에서 실험을 수행하였다고 할 수 없다. 따라서 본 연구에서는 LDPE 필름을 사용하여 재료의 화학구조는 일정하며 단지 필름표면의 접촉각만을 변화시켜 세포와의 상호작용에 대하여 연구하였다.

조직공학에서 많이 이용되는 골수유래 줄기세포 (bone marrow derived-stem cells, BMSCs)는 부착성 세포 (anchorage-dependent cell)이며 자가 재생능력이 있어 생체 내에서 환경에 따라 여러 가지 조직으로 분화됨이 밝혀짐에 따라 현재 많은 주목을 받고 있다. 특히 골수에 존재하는 줄기세포는 미분화세포로 대체되거나, 연골, 지방, 뼈, 근육 그리고 골수와 같은 간엽성 조직의 계통으로 분화할 수 있는 다잠재성을 지니고 있다.^{27,29-31}

본 연구에서는 LDPE 필름에 플라즈마 처리를 수행한 후^{9,10} LDPE 필름의 접촉각을 측정하고 그에 따른 세포 증식 및 세포 분열 시 나타나는 암형성 유전자 (c-fos, c-myc)와 암억제 유전자 (p53)의 발현정도를 비교하여 세포와 LDPE 필름의 접촉각 사이의 상호관계를 관찰하였다.

다양한 세포에 따라서 c-fos와 c-myc이라는 암형성 유전자는 신속하고 일시적인 성장촉진 자극의 발현을 유도하고 이 유전자와 일치하는 유전자 생성물은 G0-G1 전이와 세포주기 트래버스가 요구되는 사건을 정규화할 때 나타나는 핵 단백질이며, 특히 c-myc 유전자는 암세포에 있어서 많이 발현되는 유전자이다. 암억제 유전자인 p53은 암을 억제하는 성질을 가진 핵 단백질인 암호화하

는 것으로 알려져 있으며 세포 주기진행 및 DNA를 손상시키는 물질이 드러나는 세포에서 DNA 보전 및 세포 생존을 조절하는데 있어서 다양한 기능을 하는 전사요소와 관련된다.³²⁻³⁵

본 연구에서는 재료의 적심성 표면성질에 따른 세포의 부착과 성장을 플라즈마 처리시간에 따른 필름표면의 변화, 초기 세포 부착도와 성장률 및 성장에 관련된 유전자 발현여부를 통해서 알아보고자 하였다.

2. 실험

LDPE 필름시료의 준비. 아무런 첨가제도 첨가되지 않은 LDPE 필름은 한양화학 (Korea)으로부터 구입하였다. 두께가 0.22 mm인 투명한 LDPE 필름을 5×5 cm²의 크기로 잘라 에탄올과 초음파 세척기를 이용하여 3회 세척하여 진공오븐기로 7일 이상 건조한 후 진공건조기에 보관하였다.

골수유래 줄기세포의 분리와 배양. 사람의 골수유래 줄기세포는 14 게이지의 바늘과 3000 U 헤파린을 포함하는 수용액이 든 주사기를 사용하여 골수에서 채취하였다. 채취한 골수는 50% 퍼콜 (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA) 점진 구배 용액에 천천히 떨어뜨려 퍼콜층과 섞이지 않게 하고, 원심분리기로 500 g에서 25분간 원심분리하여 적혈구층, 퍼콜층, 세포층 및 혈장층으로 분리하였다. 마이크로 피펫을 사용하여 세포층만을 분리하여 배양액으로 희석시킨 후 1000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 세포를 1×10⁴ cells/cm²의 농도로 37 °C, 5%의 CO₂ 세포배양기에서 배양하였다. 세포 배양액은 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM : Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에 10% 우태혈청 (FBS : Gibco)과 10% 말혈청 (HS : Gibco)과 2% 항생제 (100 units/mL 페니실린과 100 µg/mL 스트렙토마이신, Gibco)를 첨가하였다. 배양된 세포는 2일에 한번씩 배양액을 교체해 주었으며, 15일에 한번씩 계대배양해 주었다.^{36,37}

플라즈마 처리와 접촉각 측정. LDPE 필름의 적심성을 변화시키기 위해서 자체 제작한 주파수 변조기 (부성전자, Corona-5000, Korea)를 사용하여 아무런 가스도 사용하지 않고 진공 플라즈마 처리를 시행하였다 (Figure 1).^{9,10} 주파수 변조 발전기의 전력은 100 V, 50 mA, 그리고 -11.3 psi의 진공도 조건으로 벨자 형태의 반응기 내에서 수행하였다. 먼저, LDPE 필름을 반응기 내의 동그란 전극판 위에 올려놓고, 5분간 진공을 유지한 후 0, 0.8, 1, 5, 10 및 20 초 동안 플라즈마를 처리하고 진공을 제거하여 즉시 필름의 접촉각을 측정한 후 세포를 파종하였다 (Table 1). 적심성의 한 척도인 접촉각은 접촉각 측정기 (Model 100-

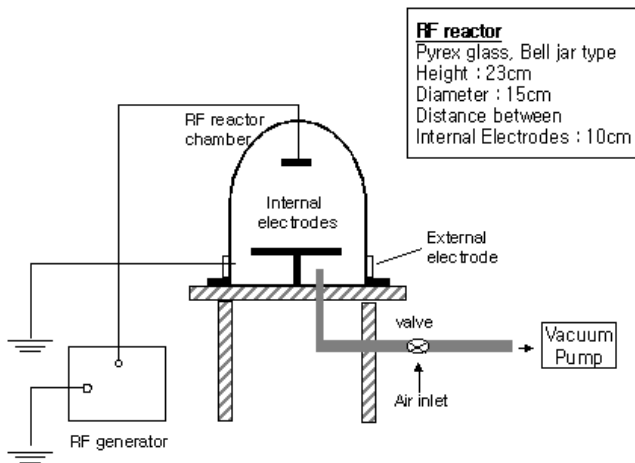


Figure 1. Schematic diagram of plasma treatment apparatus.

Table 1. Plasma Treatment Conditions of LDPE Film

	contact angle (°)	plasma treatment (s)	cell	LDPE film
sample 1	90	0		thickness :
sample 2	70	0.8	<i>h</i> -BMSCs	0.22 mm
sample 3	60	1	(P6)	diameter :
sample 4	50	5	(1 × 10 ⁵ cells/film)	5.00 cm
sample 5	40	10		(culture well)
sample 6	30	20		

0, Rame-Hart, Inc. USA)를 사용하여 측정하였으며, 각 샘플의 양 끝부분과 가운데 부분에 증류수 4 μL를 떨어뜨린 후 접촉각을 측정하였다.

개질된 LDPE 필름표면에서 세포의 배양. 플라즈마 처리로 개질된 LDPE 필름의 접촉각에 따른 세포의 부착 및 증식 거동을 확인하기 위하여 사람의 골수유래 줄기세포를 사용하였다. 골수로부터 분리하여 37 °C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양한 세포를 트립신-EDTA (Gibco)로 배양 플라스크로부터 떼어내어 적심성이 서로 다른 각각의 LDPE 필름에 1 × 10⁵ cells/film으로 파종하여 다시 동일한 조건의 세포배양기에서 1일 및 2일 동안 배양하였다.

세포 수의 관찰. 적심성이 서로 다른 각각의 LDPE 필름에 골수유래 줄기세포를 파종하여 1일 및 2일 동안 배양한 후 트립신-EDTA 용액 (Gibco)을 사용하여 LDPE 필름으로부터 세포를 떼어내어 헤마사이토미터 (Levy hemacytometer, Hausser scientific, USA)로 세포의 수를 계수하였다.

RT-PCR. 세포 수 계수가 끝난 세포현탁액을 배양액으로 2번 세척해주고 원심분리기를 사용하여 펠렛으로 만든 다음 TRIzol을 처리하여 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA는 UV 분광기를 사용하여 O. D. 260/280 값을 측

정하여 정량하였고, 역전사 중합효소 연쇄반응 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)을 실시하였다. 역전사 중합효소 연쇄반응이란 분리한 RNA를 cDNA로 역전사시킨 후 열처리를 통해 두 가닥의 DNA를 한 가닥의 DNA로 해리시키고 해리된 DNA에 프라이머를 반응시켜 온도를 낮추면 프라이머가 상보적인 한 가닥의 DNA에 결합하게 되며 이 때 4 종류의 기질이 공존하는 상태에서 DNA 중합효소를 작용시켜 프라이머를 신장시키면 원하는 DNA의 특정영역을 증폭시킬 수 있는 기술이다. RT-PCR 반응시킨 생성물을 1.2% (w/v) 아가로스 젤에 전기영동 (Spectroline, UV Transilluminator, USA) 한 후, 측정된 사진으로 젤의 형광을 측정하여 *c-fos*, *c-myc* 및 *p53* 유전자를 housekeeping gene인 β -actin으로 표준화하였다. PCR에 사용한 프라이머는 진텍 (Korea)로부터 구입하였으며 프라이머 서열은 Table 2에 나타내었다.^{28,39-41} 또한 LDPE 필름에 세포실험을 하기 전에 물 접촉각이 80°인 폴리스티렌 배양용기에 단층 배양한 골수유래 줄기세포에서 mRNA를 분리한 후 RT-PCR을 수행하여 위의 유전자 발현을 전기영동을 통해 관찰하였다.

3. 결과 및 토론

접촉각 측정. Figure 2에 나타내었듯이 플라즈마를 짧은 시간 처리해도 필름의 접촉각이 급격히 감소하였으며 플라즈마를 처리하지 않은 필름은 약 90° 정도의 접촉각을 나타내었다. LDPE 필름에 플라즈마를 0.8초 처리하면 70°로, 1초 처리하면 60°로 접촉각이 감소함을 확인할 수 있었다. 또한 플라즈마를 5초 처리하면 50°, 10초 처리하면 40°, 20초 처리하면 30°로 접촉각이 감소함을 확인할 수 있는데 이는 플라즈마 처리 시 표면에서 공기 중에 포함되어 있는 산소의 산화작용에 의하여 산소를 포함한 작용기의 작용 및 식각 반응이 일어나 필름표면에 요철들이 생성되어 친수성이 증가하게 되는 것이며³⁸

Table 2. RT-PCR Primer Sequence

target gene	primers	size of product(bp)	Ref.
c-myc	5'-TCCAGCTTGTACCTGCAGGATCTGA-3'	338 bp	39
	5'-CCTCCAGCAGAAGGTGATCCAGACT-3'		
c-fos	5'-AGACAGACCAACTAGAAGATGA-3'	366 bp	40
	5'-AGCTCTGTGGCCATGGGCCC-3'		
p53	5'-CAGCCAAGTCTGTGACTTGCACGTAC-3'	293 bp	40
	5'-CTATGTCGAAAAGTGTTCCTGTCATC-3'		
β -actin	5'-ACTACCTCATGAAGATCCTC-3'	566 bp	41
	5'-CTAGAAGCATTTCGGTGGACGATGG-3'		

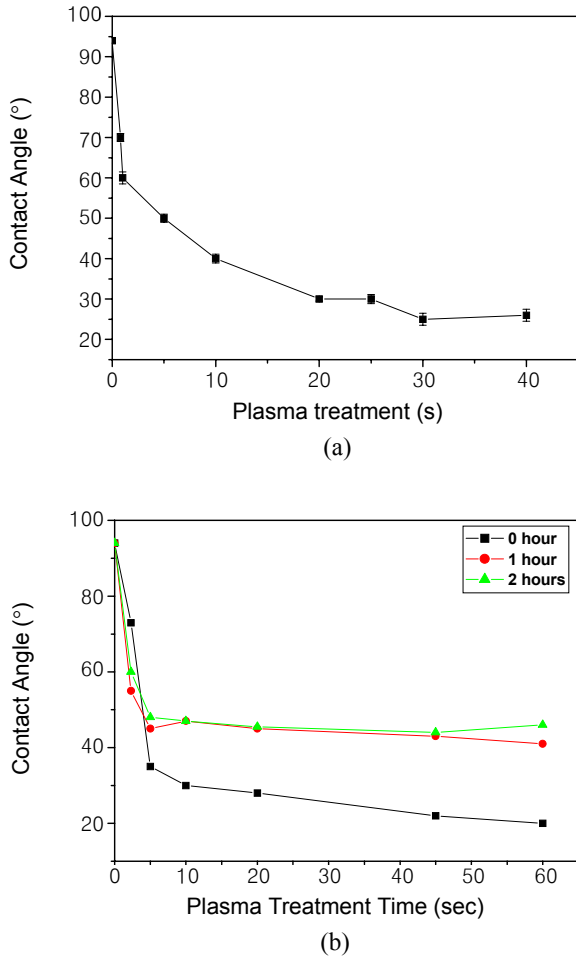


Figure 2. Contact angle of LDPE film following plasma treatment time; (a) contact angle of LDPE film following plasma treatment time and (b) aging effects of contact angle of LDPE film.

약 20초 이후에는 접촉각이 20~30° 정도로 거의 일정하게 유지되는 것을 볼 수 있는데 이는 표면에 생성될 수 있는 작용기의 농도가 한계에 도달하여 한계의 접촉각을 가지기 때문에 20초 이상 처리해도 접촉각이 일정하게 유지되는 것으로 판단된다.^{9,10} 또한 플라즈마를 처리한 다음 시간이 경과함에 따라 플라즈마 처리시간이 길수록 접촉각이 50~60°까지 다시 증가하는 것을 볼 수 있는데 이는 일시적으로 플라즈마를 처리하여 필름표면의 접촉각을 감소시켰을지라도 생성된 작용기의 소멸에 의하여 본래의 성질대로 회귀하려 하기 때문에 감소된 접촉각이 원래의 접촉각으로 회복하려는 현상을 보이는 것이라 사료된다. 이런 결과는 플라즈마 처리 후에 바로 세포를 파종하지 않으면 정확한 실험이 될 수 없음을 의미하고 있으며 따라서 본 실험은 플라즈마 처리 후 바로 세포를 파종하여 실험을 진행하였다.

세포 수의 관찰. 플라즈마 처리로 표면이 개질된 필름에 세포를 파종한 후 1일 배양했을 때는 필름표면의 접촉각이 50, 40 및 30°인 표면에서 세포 수가 초기 1×10^5 으로부터 4.8×10^5 으로 증가하여 접촉각이 30~40°일 때 세포 수가 가장 많이 증가했음을 확인할 수 있었다. 2일 배양의 경우는 1일 배양과 달리 필름표면의 접촉각이 50~60°일 때 세포 수가 초기 1×10^5 으로부터 4×10^5 정도로 증가하여 접촉각이 50~60° 사이일 때 세포 수의 증가가 돋보였다. 세포 수가 초기 파종한 세포 수에 비해서 가장 많이 증가한 것은 접촉각이 30~40° 사이인 표면으로 일반적으로 접촉각이 작을수록 세포 수가 증가함을 알 수 있지만 (Figure 3) 1일 배양과 2일 배양의 증가율을 비교해 보면 필름표면의 접촉각이 60~70° 사이인 표면에서 증가속도가 빨라졌음을 알 수 있다. 이는 친수성인 샘플에서 초기에 세포가 잘 부착하는 것은 사실

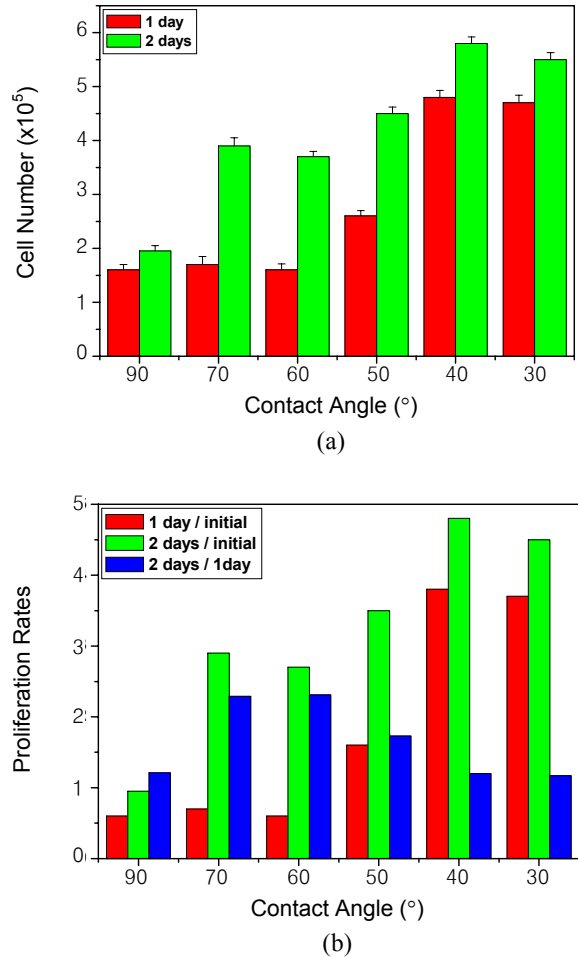
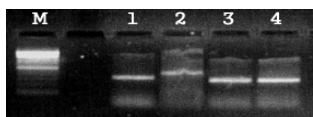


Figure 3. Growing cell number and proliferation rates of mesenchymal stem cell onto different wettability LDPE; (a) growing cell number of mesenchymal stem cell and (b) proliferation rates of mesenchymal stem cell.

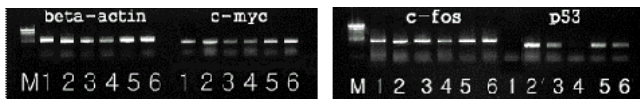
이지만 특정한 접촉각에서 부착된 세포가 빠른 속도로 분화·성장하는 것을 보여주는 것이라 하겠다.²⁸

RT-PCR. Figure 4에 나타내었듯이 1일 배양에서는 β -actin, c-myc 및 c-fos의 경우에는 모든 표면에서 잘 발현된 것으로 보이거나 띠의 밝기와 넓이는 샘플에 따라 약간씩 차이를 보이고 있다. p53의 경우에는 표면의 접촉각이 60°와 30°인 샘플에서 희미한 띠가 보여 p53 유전자가 발현된다는 것을 알 수 있다. 암형성 유전자인 c-myc은 접촉각이 90, 70, 40 및 30°인 표면에서 띠가 뚜렷이 보이며, c-fos의 경우에는 90, 70, 60, 40 및 30°인 표면에서 띠가 밝게 보인 것으로 보아 이 표면에서 세포분열이 좀더 활발하다고 사료된다. 암억제 유전자인 p53은 접촉각이 70, 60, 40 및 30°인 표면에서 띠가 밝게 보이는 것으로 보아 이들 샘플에서 세포의 주기진행과 DNA의 보전이 잘 이루어지고 있다고 사료된다. 2일 배양한 RT-PCR 결과를 보면 β -actin, c-myc, c-fos 및 p53 유전자는 전체적으로 모든 표면에서 잘 발현된 것으로 보이며 1일 배양한 것에 비해 전체적으로 띠가 밝고 크게 보였다. 또한 1일 배양에서는 p53 유전자가 접촉각이 90° 및 50°인 표면에서 띠가 매우 희미했던 반면에 2일 배양에서 뚜렷하게 보이고 있는 것으로 보아 세포성장이 우수하며 세포의 성장과 관련된 유전자 발현 또한 우수하다는 것을 확인할 수 있었다.

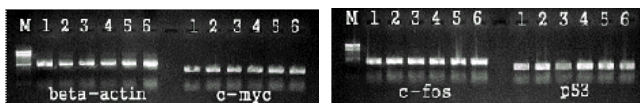
암형성 유전자와 암억제 유전자의 발현. RT-PCR 반응을 수행한 후 전기영동을 통해 얻은 젤에서 각 유전자의 상



(a) h-BMSCs culture in monolayer



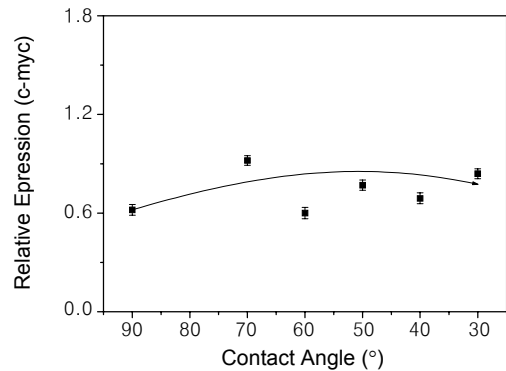
(b) 1 day



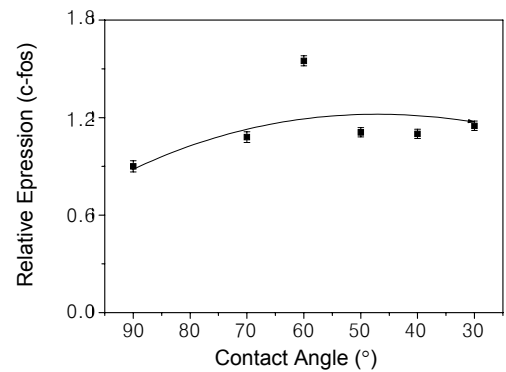
(c) 2 days

Figure 4. Agarose gel electrophoresis; (a) h-BMSCs culture in monolayer M (marker), 1 (c-myc, 338 bp), 2 (c-fos, 366 bp), 3 and 4 (p53, 293 bp), (b) 1 day culture β -actin (566 bp), c-myc (338 bp), c-fos (366 bp) and p53 (293 bp), M (marker), 1 (90°), 2 (70°), 3 (60°), 4 (50°), 5 (40°) and 6 (30°) and (c) 2 days culture β -actin (566 bp), c-myc (338 bp), c-fos (366 bp) and p53 (293 bp).

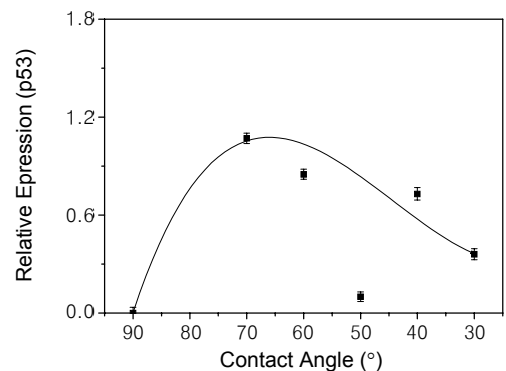
대적인 발현율을 확인하기 위하여 형광을 측정하였다. 1 및 2일 배양 결과를 비교해 보면 1일 배양시 표면의 접촉각이 70°일 때 c-myc 유전자의 발현이 0.92, c-fos가 1.08, p53이 1.07이고 접촉각이 60°일 때 c-myc 유전자의 발현이 0.60, c-fos가 1.55, p53이 0.85로 표면의 접촉각에 따른 유전자의 발현이 어떠한 경향성도 보이지 않았으나 시간이 지나 2일 배양했을 때의 결과를 보면 표



(a)



(b)



(c)

Figure 5. Expression of c-myc, c-fos and p53 mRNA as a standard of β -actin by RT-PCR method at 1 day; (a) c-myc, (b) c-fos and (c) p53.

면의 접촉각이 70°일 때 c-myc 유전자의 발현이 1.17, c-fos가 1.47, p53이 1.59이었고 접촉각이 60°일 때는 c-myc 유전자의 발현이 0.95, c-fos가 1.38, p53이 1.02로 90, 50, 40 및 30°의 접촉각을 갖는 표면보다 암형성 유전자와 암억제 유전자 발현율이 높음을 볼 수 있었다. 따라서 접촉각이 60~70° 사이인 표면이 다른 적십성을 갖는 표면에 비하여 BMSCs의 유전자가 우월하게 발현되고 있음을 확인할 수 있었다 (Figures 5 and 6).

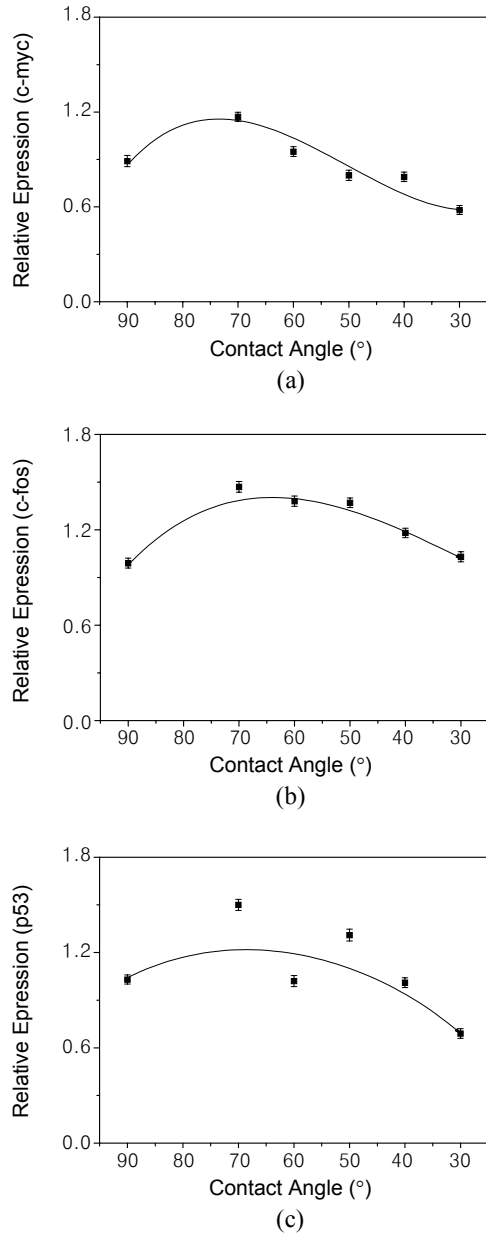


Figure 6. Expression of c-myc, c-fos and p53 mRNA as a standard of β -actin by RT-PCR method at 2 days; (a) c-myc, (b) c-fos and (c) p53.

4. 결론

본 연구에서는 BMSCs가 생체재료를 어떻게 인식하는지에 대해 알아보기 위하여 플라즈마로 재료표면을 개질하고 플라즈마 처리 시간에 따른 접촉각을 측정하였다. 또한 조직공학의 중요한 요소 중의 하나인 BMSCs 세포의 성장 및 부착에 있어서 재료표면의 접촉각에 따른 세포 수 관찰과 세포의 증식률을 확인하고 RT-PCR을 통해 암형성 유전자인 c-myc, c-fos 및 암억제 유전자인 p53의 발현을 확인하였다.

물 접촉각 측정을 통해 플라즈마를 처리함에 따라 필름표면의 접촉각이 점차적으로 감소하였다. 즉, 친수성이 증가함을 확인할 수 있었고 20초 이후에는 접촉각이 일정하게 유지되는 것을 볼 수 있었다. 접촉각이 작은 표면에서 초기 세포 부착이 우수한 건 사실이지만 세포 성장률은 특정 접촉각 즉, 60~50°의 접촉각을 갖는 표면에서 우수하다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 60~70°의 접촉각을 갖는 표면에서 일시적인 성장촉진자극의 발현을 유도하는 c-myc과 c-fos 유전자 발현 및 암형성을 억제함으로써 세포 생존을 조절하는 p53 유전자 발현이 우수함을 볼 수 있었다.

이를 통해 재료표면이 세포의 부착과 성장에 영향을 준다는 것을 알 수 있었고, c-myc, c-fos 및 p53의 발현이 세포가 생체재료를 어떻게 인식하는지에 대한 중요한 정보라는 것을 즉, 조직공학적 바이오장기의 연구에 있어서 생체재료의 역할이 중요하다는 것을 확인할 수 있었다.

현재 플라즈마 방전 처리 후의 LDPE 표면의 정확한 화학구조의 변환, 이에 따른 이들의 mRNA의 발현과 세포의 부착 및 성장 형태와의 상관관계에 대하여 연구 중에 있다.

감사의 글 : 이 실험은 보건복지부 IMT-2000 (01-PJ11-PG9-01NT00-0011)의 지원으로 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

References

1. G. Khang and H. B. Lee, in *Methods of Tissue Engineering*, A. Atala and R. Lanza, Editors, Academic Press, Section II, Chapter 67, p 771 (2001).
2. J. H. Lee, J. W. Lee, G. Khang, and H. B. Lee, in *Science and Technology of Polymers and Advanced Materials; In Emerging Technologies and Business Opportunities*, P. N. Prasad, J. E. Mark, S. H. Kandil and Z. H. Kafafi, Editors, Plenum Publishing, NY, p 535 (1997).
3. Y. Iwasaki, K. Ishihara, N. Nakabayashi, G. Khang, J. H. Jeon,

- J. W. Lee, and H. B. Lee, in *Advances in Biomaterials Science I*, T. Akaike, T. Okano, M. Akashi, M. Terano and N. Yui, Editors, CMC Co., Ltd., Tokyo, p 91 (1997).
4. G. E. Moore, *Cancer*, **67**, 2731 (1991).
5. T. Nakamura, Y. Shimizu, N. Okumura, T. Matsui, S. H. Hyon, and T. Shimamoto, *J. Biomed. Mater. Res.*, **28**, 17 (1994).
6. A. Nakamura, Y. Kawasaki, K. Takada, Y. Aida, Y. Kurokama, S. Kojima, H. Shintani, M. Matsui, T. Nohmi, A. Matsuo, T. Sofuni, M. Kurihara, and N. Miyata, *J. Biomed. Mater. Res.*, **26**, 631 (1992).
7. T. Nakamura, Y. Shimizu, Y. Takimoto, T. Tsuda, Y. H. Li, T. Kiyotani, M. Teramachi, S. H. Hyon, Y. Ikada, and K. Nishiya, *J. Biomed. Mater. Res.*, **42**, 475 (1998).
8. J. H. Lee, H. Kim, G. Khang, H. B. Lee, and M. S. Jhon, *J. Colloid Interface Sci.*, **152**, 563 (1992).
9. G. Khang, B. J. Jeong, H. B. Lee, and J. B. Park, *Bio-Med. Mater. Eng.*, **5**, 259 (1995).
10. G. Khang, Y. H. Kang, H. B. Lee, and J. B. Park, *Bio-Med. Mater. Eng.*, **6**, 335 (1996).
11. J. H. Lee, J. W. Lee, G. Khang, and H. B. Lee, *Biomaterials*, **18**, 351 (1997).
12. J. H. Lee, G. Khang, J. W. Lee, and H. B. Lee, *Macromol. Chem., Macromol. Symp.*, **118**, 571 (1997).
13. J. H. Lee, G. Khang, J. W. Lee, and H. B. Lee, *J. Colloid Interface Sci.* **205**, 323 (1998).
14. Y. Iwasaki, K. Ishihara, N. Nakabayashi, G. Khang, J. H. Jeon, J. W. Lee, and H. B. Lee, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **9**, 801 (1998).
15. J. H. Lee, S. J. Lee, G. Khang, and H. B. Lee, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **10**, 283 (1999).
16. G. Khang, S. J. Lee, J. H. Lee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **7**, 102 (1999).
17. Y. Iwasaki, S. Sawada, N. Nakabayashi, G. Khang, H. B. Lee, and K. Ishihara, *Biomaterials*, **20**, 2185 (1999).
18. G. Khang, S. J. Lee, Y. M. Lee, J. H. Lee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **8**, 179 (2000).
19. J. H. Lee, S. J. Lee, G. Khang, and H. B. Lee, *J. Colloid Interface Sci.*, **230**, 84 (2000).
20. G. Khang, S. J. Lee, J. H. Jeon, J. H. Lee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **24**, 869 (2000).
21. S. J. Lee, G. Khang, J. H. Lee, Y. M. Lee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **24**, 877 (2000).
22. G. Khang, M. K. Choi, J. M. Rhee, S. J. Lee, H. B. Lee, Y. Iwasaki, N. Nakabayashi, and K. Ishihara, *Korea Polymer J.*, **9**, 107 (2001).
23. S. J. Lee, G. Khang, Y. M. Lee, and H. B. Lee, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **13**, 197 (2002).
24. G. Khang, C. W. Choe, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *J. Appl. Polymer Sci.*, **85**, 1253 (2002).
25. Y. Iwasaki, S. Sawada, N. Nakabayashi, G. Khang, H. B. Lee, and K. Ishihara, *Biomaterials*, **23**, 3877 (2002).
26. S. J. Lee, G. Khang, Y. M. Lee, and H. B. Lee, *J. Colloid Interface Sci.*, **259**, 228 (2003).
27. G. Khang, C. W. Choe, S. J. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *J. Appl. Polymer Sci.*, **92**, 599 (2004).
28. S. Kato, T. Akagi, K. Sugimura, A. Kishida, and M. Akashi, *Biomaterials*, **21**, 521 (2000).
29. H. B. Lee, G. Khang, and S. J. Lee, in *Tissue Engineering : Concepts and Application*, 2nd Eds., J. J. Yoo and I. Lee, Chap. 41, Editors, pp 751 (2002).
30. A. M. Mackay, S. C. Beck, M. F. Pittenger, and C. O. Chichester, *Tissue Eng.*, **4**, 415 (1998).
31. B. U. Yoo, T. S. Barthel, K. Nishimura, L. Solchaga, A. I. Caplan, and B. Johnstone, *J. Bone Joint Surg.*, **80-A**, 1745 (1998).
32. Y. Luo, and M. O. Krause, *J. Cell Physiol.*, **160**, 303 (1994).
33. B. C. Delidow, B. A. White, and J. J. Peluso, *Endocrinology*, **126**, 2302 (1990).
34. M. S. Greenblatt, W. P. Bennett, M. Hollstein, and C. C. Harris, *Cancer Res.*, **54**, 4855 (1994).
35. A. J. Levine, *Cell*, **88**, 323 (1997).
36. J. S. Choi, S. J. Lee, G. Khang, I. Lee, and H. B. Lee, *Biomaterials Res.*, **6**, 129 (2002).
37. K. S. Park, E. J. Kim, G. Khang, C. W. Han, I. Lee, and H. B. Lee, *Biomaterials Res.*, **7**, 120 (2003).
38. D. Ratner and L. Schoen, in *Biomaterials Sci.*, D. Ratner and L. Schoen, Editors, Academic Press, Section 2.9, Chapter 2, pp 105 (1996).
39. T. Sugimoto, F. Tsukamoto, M. Fujita, and S. Takai, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **201**, 574 (1994).
40. Y. Kaneko, A. Tsukamoto, and K. Korokawa, *Cancer Lett.*, **66**, 155 (1992).
41. K. Sugimura, T. Ohni, T. Kusuyama, and I. Azuma, *Melanoma Res.*, **2**, 191 (1992).