

PLGA의 염증완화에 대한 피브린의 효과 ; *in vivo* 연구

김수진 · 홍현혜 · 김순희 · 김혜린 · 김세호 · 강길선[†]

전북대학교 BIN 융합공학과, 고분자 융합소재 연구센터

(2009년 9월 16일 접수, 2009년 10월 21일 수정, 2009년 10월 21일 채택)

Reduction of Inflammatory Reaction of PLGA Using Fibrin; *in vivo* Study

Su Jin Kim, Hyun Hye Hong, Soon Hee Kim, Hye Lin Kim, Se-Ho Kim, and Gilson Khang[†]

Department of BIN Fusion Tech, Department of Polymer-Nano Sci. Tech.,

Chonbuk National University, 664-14 Dukjin, Jeonju 561-756, Korea

(Received September 16, 2009; Revised October 21, 2009; Accepted October 21, 2009)

초록: PLGA는 미국 식품의약품안전청(FDA)의 승인을 받은 합성고분자로서 생체재료로 널리 쓰이고 있다. 하지만, 분해산물인 산으로 인하여 염증반응을 일으키고, 독성물을 생산하여 세포중식물의 감소를 야기시킨다고 보고된 바 있다. 이러한 PLGA의 단점을 보완하고자 생체재료인 피브린을 사용하였는데, 피브린은 피브리노겐의 풍부함과 이들의 정체가 비교적 용이하다는 장점을 가지고 있다. 본 연구에서는 PLGA의 염증완화에 대한 피브린의 효과를 알아보았다. 피브린 첨가에 따른 PLGA 다공성 지지체에 염증의 발현정도를 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였고 지지체와 조직 간의 상호작용을 통한 염증세포의 침윤과 대식세포 발생 정도를 확인하기 위해 H&E와 ED-1 염색을 수행하였다. 위 실험결과 천연재료인 피브린이 PLGA의 이물반응을 감소시키는데 긍정적인 영향을 미치는 것으로 확인되었다.

Abstract: In this study, we evaluated the effect of fibrin, a natural material, on the local inflammatory reaction of PLGA *in vivo*. PLGA degradation products can decrease the pH in the surrounding tissue, causing local inflammatory reaction. To solve this problem, fibrin/ PLGA scaffolds were implanted in 5-week-old Wister rats. To evaluate the influence of fibrin content on inflammatory cytokine expression induced by PLGA, RT-PCR analysis was used. Fibrous wall thickness and macrophage infiltration were evaluated by H&E and ED-1 immunohistochemical staining, respectively. In this study, we showed that fibrin/PLGA scaffolds reduced inflammatory reaction as compared to PLGA scaffold. We concluded that fibrin could reduce inflammatory response of PLGA.

Keywords: fibrin, PLGA scaffold, inflammatory cytokine, *in vivo*.

서 론

염증반응은 상처부위에 침입한 미생물들에 대한 적대 환경을 만드는 비특이적 방어 작용으로, 상처가 나거나 외부 감염체가 체내로 들어왔을 때, 초기단계 면역반응을 맡고 있는 백혈구들이 몰려들어 사이토카인을 뿜어낸다.¹ 사이토카인은 면역세포 및 염증세포의 염증반응을 유발하고 매개하는 주요한 분자이다. 염증반응을 일으킬 수 있는 세포에 외부 자극이 가해지면 종양괴사인자(TNF- α)와 인터루킨-1 β (IL-1 β) 등의 전-염증성 사이토카인의 발현이 유도되고, 유도된 전-염증성 사이토카인이 호중구를 활성화하여 염증 부위로 이동하면 염증 반응에 관여하는 물질을 생성하게 하여 염증반응이 일어나게 된다. 이와 같은 염증 물질이 과량 생산되면, 과도한 면역 반응을 야기하여 각종 염증성질환을 유발시키고 악화시키게 된다.^{2,3}

생체조직공학이란 생체에서 완전히 흡수되고 세포와 친화력이 있는 고분자 지지체를 생체조직에 이식함으로써 새로운 실질조직을 복원, 재생, 대체하여 정상적인 기능을 유도하는 일련의 기법이다.^{4,5} 조직공학에 사용되는 생체재료지지체의 역할은 생체내에서 세포가 잘 정착하여 배양될 수 있도록 도와줄 수 있어야 하며 고유의 표현형을 유지하면서 생체재료지지체에 골고루 분포되고 세포외기질을 분비하여 분화된 조직의 재생을 촉진시켜야 한다. 또한, 체내에 이식한 후에도 주변 조직과 융화가 잘 되고 일정시간이 지나도 안전하게 흡수, 분해하는 생체적합성을 가져야 한다.^{4,6}

본 연구에서 사용된 히드록시산 계열인 폴리글리콜라이드(PGA), 폴리락타이드(PLA) 및 그들의 공중합체인 폴리락타이드-글리콜라이드공중합체(PLGA)는 미국 식품의약품안전청(FDA)의 승인을 받은 합성고분자로서 생체재료로 널리 쓰이고 있으며,^{7,8} 높은 생체적합성과 생분해성 및 가공성으로 조직공학적 다공성 지지체, 약물 전달체계의 디바이스로 응용되고 있다.^{6,9,10} 하지만, 분해산물인 산

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: gskhang@jbnu.ac.kr

로 인하여 염증반응을 일으키고, 독성물을 생산하여 세포중식물의 감소를 야기시킨다고 보고된 바있다.¹¹⁻¹⁴ 또한, 체내에 이식했을 경우 PLGA 표면과 이물거대세포간에 국소부위의 조직반응연속체가 일어남으로써 pH가 더 낮아진다고 알려져 있는데 이는 이물거대세포들이 활동하면서 더 많은 산성액을 분비하기 때문으로 보고된다.¹⁵ 이러한 기존의 고분자 지지체의 문제점을 개선하기 위해 생체 적합한 천연재료를 혼합하여 천연재료와 합성고분자와의 단점을 보강하여 장점을 극대화하도록 하는 연구가 많이 진행되고 있다.³ 생체 적합성 고분자라 함은 생체에서 목적하는 기능을 발휘하며, 재료자체의 독성이 없고 멸균 가능한 고분자라고 할 수 있는데 생체 적합한 천연유래 고분자로는 알지네이트, 콜라겐, 피브린, 케라틴, 히알루론산, 셀룰로오스, 키틴 등이 있는데¹⁶ 이중 피브린은 자연계에서 가장 풍부하고 특성결정이 아주 잘 된 생체유래 고분자로서¹⁷ 생체 적합하여 몇 일 또는 몇 주내에 일반적인 상처치유 과정에 의해 흡수되며, 염증반응, 면역반응, 조직괴사 혹은 섬유비대증 등의 부작용이 없다는 장점 때문에 이를 약물전달 혹은 세포 전달체로서 응용하려는 시도들이 이루어지고 있다.¹⁸

따라서, PLGA로 인한 염증을 줄이기 위한 노력의 일환으로 피브린을 작용코자 하였으며 이전 연구에서 천연재료인 피브린을 PLGA와 혼합하여 *in vitro* 테스트를 통한 염증완화 효과를 확인하였다. 이를 바탕으로 본 연구에서는 피브린을 함유한 PLGA 지지체에서의 염증완화 효과를 *in vivo* 테스트를 통해 확인하고자 하였다.

실 험

시약 및 재료. 생분해성 고분자인 PLGA(락타이드/글리콜라이드 몰비 75/25, Resomer®RG756, Boehringer Ingelheim Chem. Co. Ltd., Germany)는 평균분자량이 33000 g/mole인 것을 사용하였으며, PLGA 지지체에 도포할 피브린(Greenplast®)은 주식회사 녹십자에서 제공받았다. 염화나트륨(NaCl, Orient Chem. Co., Korea)은 다공 생성물질로 사용하였는데, 분자체를 사용하여 입자의 크기를 180~250 μm로 조절하였다. 메틸렌클로라이드(methylene chloride, MC, Tedia Co. Inc., USA) 및 이외의 모든 화학약품과 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다.

Fibrin/PLGA 다공성 지지체 제조. PLGA 다공성 지지체는 용매 캐스팅/염 추출법에 의해 제조되었으며 제조 모식도를 Figure 1(a)에 나타내었다.¹⁹ 1 g의 PLGA를 4 mL의 MC에 용해한 후, 다공형성물질인 NaCl은 PLGA의 9배가 되도록 9 g을 첨가하고, 직경 7 mm 및 높이 3 mm의 실리콘 몰드에 넣고 프레스(MH-50Y, CAP 50 tons, Japan)를 이용하여 상온에서 60 kgf/cm²의 압력으로 24 시간 동안 가압하였다. 24시간 후 다공형성을 위해 염의 추출을 3차 증류수에서 6시간마다 교체하여, 48시간 동안 용출하였고, 5 mTorr, -80 °C 조건에서 24시간 동안 동결건조하였다. 잔류용매인 MC를 충분히 제거하기 위하여 최소 일주일 이상 25 °C 진공오븐에서 건조시킨 후 70% 알콜에 멸균하여 피브리노겐 20 μL과 혈장 단백질인 피브리노겐을 섬유상의 피브린으로 만드는 트롬빈을 30 μL씩 도포해주었다.

Fibrin/PLGA 다공성 지지체 이식. 모든 수술은 동일 시술자에 의해 같은 방법으로 시행되었으며, 5 주령 Wister rat(100~150 g,

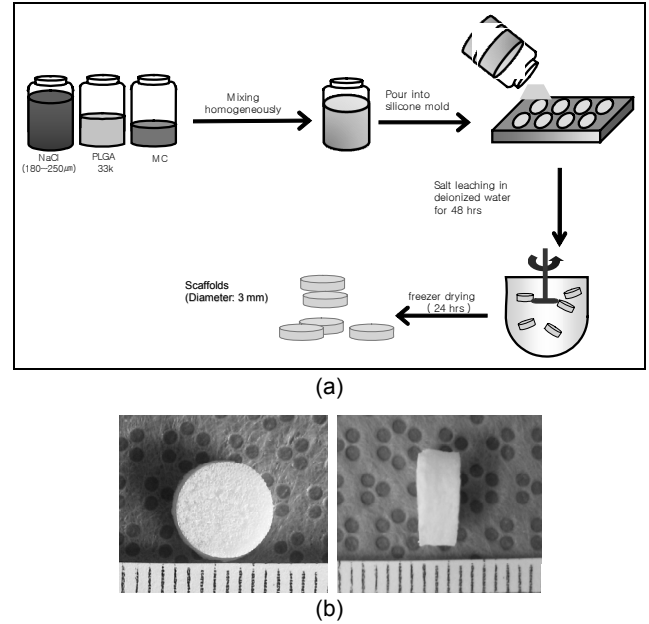


Figure 1. (a) Process for fabrication of PLGA scaffolds by solvent casting/salt leaching method; (b) photographs of PLGA scaffolds.

female)에 림폰과 세다젝트를 1대 3비율로 혼합하여 150 μL씩 근육주사를 통한 전신 마취하에 시행되었다. PLGA 지지체를 70% 에탄올에 멸균한 후 PBS에 행군 후 피브리노겐과 트롬빈을 도포하여 면역기관인 림프절이 주로 모여있는 겨드랑이 부위의 피하에 이식한 후 환부를 봉합해주었다. 조직학적 평가를 위하여 이식 5일과 14일 후 실험동물을 마취시켜 이식된 지지체를 적출한 후 안락사시켰다.

피브린 첨가에 따른 특정 mRNA 발현도 확인. Fibrin/PLGA 지지체에 대한 염증 사이토카인의 mRNA 발현여부를 알아보기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 지지체 이식 후 5일 및 14일째에 회수된 지지체에 1 mL의 Trizol(Invitrogen™ Life Technologies Co., Groningen, Netherlands)을 첨가하여 5분 동안 인큐베이션 한 다음 1.5 mL의 EP 튜브에 넣어 0.2 mL의 클로로포름(Sigma)을 첨가하고 4 °C, 12000 g에서 15분 동안 원심분리하여 mRNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 Oligo(dT)12-18 프라이머(Invitrogen™, 5×first strand buffer(Invitrogen™), dNTP(dGTP, dATP, dTTP, dCTP, Gibco), RNase inhibitor(Invitrogen™, Superscript™ RNase H 역전사트랜스크립타제(Invitrogen™), DNase/RNase free water(Gibco)를 첨가하여 Authorized thermal cycler(TP600, Takara Bio Inc., Japan)를 통하여 cDNA로 역전사하였다.²⁰⁻²³ 역전사시킨 cDNA를 GAPDH, TNF-α, IL-1β 및 IL-6 PCR을 수행하였다. PCR후 증폭된 DNA를 1.5%(w/v) 아가로스겔에 전기영동을 한 후, 상대적 발현을 SYBR 녹색형광(SYBR™ Green I Nucleic Acid Gel Stain, Cambrex, U.K)에 의해 시각화하였으며 300 nm 자외선 조사기로 사진촬영을 하여 GAPDH, TNF-α, IL-1β 및 IL-6 mRNA 밴드의 발현정도를 확인하였다. 프라이머는 제노텍(Korea)으로부터 구입하였으며 프라이머의 염기 서열은 Table 1에 나타내었다.

조직 염색 분석. 조직학적 평가를 위하여 용매 캐스팅/염 추출법으로 제작한 PLGA 지지체와 fibrin/PLGA 지지체를 피하에 이식한 후

5일과 14일째에 회수하여 10% 포르말린(Sigma) 용액에 고정하였다. 그후 지지체를 측면으로 세워 파라핀 블록으로 제작하여 6 μm의 두께로 잘라 슬라이드에 고정하였다. 조직 절편을 탈파라핀 과정을 거친 후 H&E 염색과 ED-1에 대한 면역조직 화학염색을 시행하였다. H&E 염색은 세포의 핵에 헤마톡실린이, 세포질에 에오신이 염색되는 것으로써 지지체를 이식한 부위의 염증세포의 침윤을 확인하기 위해 시행하였다. ED-1은 avidin-biotin peroxidase complex(ABC) 방법으로 확인하였으며, 유리슬라이드를 60 °C 건조기에서 파라핀을 녹인 후 자일렌으로 5분간 3회의 탈파라핀 과정을 거치고 100, 95, 90, 80 및 70% 에탄올에서 각각 5분씩 처리하여 함수하였다. 항원 복구를 위해 0.01 N HCl 5 mL에 펩신 15 mg을 녹여 20분간 전처리하였다. 조직내 과산화효소의 작용을 억제하기 위하여 3% 과산화수소수에 10분간 처리한 후, 조직내의 항원과 비특이적 단백질을 결합을 억제하기 위해 15분간 blocking agent(ultra tech HRP kit protein blocking agent, Beckman coulter)를 처리해 주었다. 일차 항체인

ED-1 (mouse anti-rat CD68 monoclonal antibody, abcam@ 1 : 90)을 1시간 30분 동안 부착시킨 후 PBS로 수세하였다. Biotin 이 부착된 이차항체(bio-tinylated secondary antibody)에 30분간 반응시킨 다음 PBS로 수세 후 이차항체에 부착되어 있는 biotin 과 결합할 수 있는 streptavidin peroxidase reagent를 30분간 처리하였다. 발색은 chromogen substrate(ultra tech AEC kit AEC substrate : ultra tech AEC kit AEC chromogen, 1 : 50)를 이용하여 5분간 반응시킨 후 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하여 수용성봉입제로 봉입하였다.

통계. 각 실험의 통계학적 분석은 student's *t*-test를 시행하여 *P* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 것으로 하였다.

결과 및 토론

Fibrin/PLGA 다공성 지지체 제조. 용매 캐스팅/염 추출법으로 제조된 PLGA 지지체 모습을 Figure 1(b)에 나타내었다. 육안 관찰 결과 형태는 실리콘 몰드의 형태와 같게 얻어졌으며 수축, 부풀림, 불규칙한 크기의 구멍 및 여타 결함이 없는 것으로 관찰되었다. 제조된 PLGA 지지체를 용출과 건조과정을 거쳐 70% 알콜에 멸균 후 피브리노겐 20 μL과 트롬빈을 30 μL씩 도포해주었다.

지지체 육안관찰. Fibrin/PLGA 지지체를 이식 후 5일과 14일 후에 적출하였고 이를 Figure 2에 나타내었다. 육안 관찰 결과 단독의 PLGA 지지체 보다 피브린을 함유한 PLGA 지지체가 형태적 유지가 더 뛰어난 것을 확인할 수 있었다. 이는 피브린이 지지체의 물성 및 분해에 긍정적인 영향을 주었기 때문이라고 사료된다. 또한, fibrin/PLGA 지지체와는 달리 PLGA 지지체에서 많은 혈관이 관찰되는데 이는 염증 생성성 혈관벽이 손상되고 혈관으로부터 사이토카인이 누출되어 신생혈관형성의 자극인자로 작용했기 때문으로 사료된다.²⁴

mRNA 분리 및 RT-PCR. 피브린 첨가에 따른 PLGA 다공성 지지체에 염증의 발현정도를 mRNA 관점에서 알아보았다. Figure 3(a)

Table 1. PCR Primers and Protocol for Thermal Cycling

Species	Protein	Primer sequence	Protocol	Cycles	
rat	GAPDH	F: 5'-tga acg gga gac tca ctg g-3'	D=94 °C; 30 sec	28	
		R: 5'-ttc acc acc ctg ttg ctg ta-3'	A=60 °C; 30 sec		
	TNF-α	F: 5'-ggc gct ccc caa gaa gac ag-3'	D=94 °C; 30 sec		
		R: 5'-gcg gct gat ggt gtg ggt ga-3'	A=60 °C; 15 sec		
	IL-1β	F: 5'-aga agc tgt ggc agc tac cta tgt-3'	D=95 °C; 30 sec		28
		R: 5'-ctc tgc ttg aga ggt gct gat g-3'	A=60 °C; 30 sec		
IL-6	F: 5'-gaa atg aga aaa gag ttg tgc-3'	D=95 °C; 30 sec	28		
	R: 5'-gga agt tgg ggt agg aag gac-3'	A=60 °C; 30 sec			
			E=72 °C; 1min		

D: denature, A: annealing, E: extension.

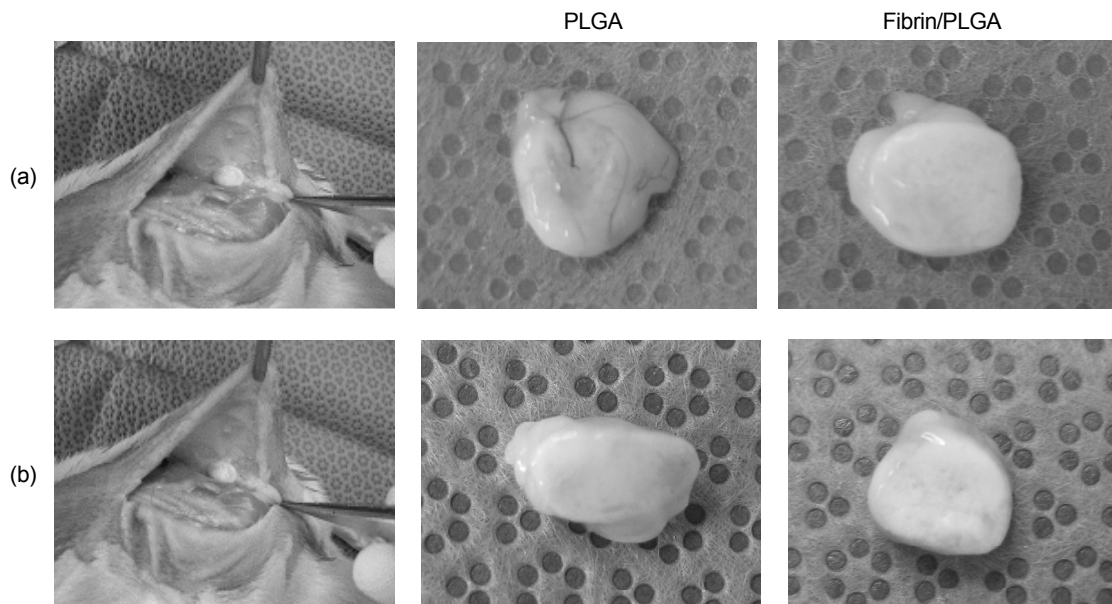


Figure 2. Gross morphology for explanted scaffolds. (a) 5 days after; (b) 14 days after implantation.

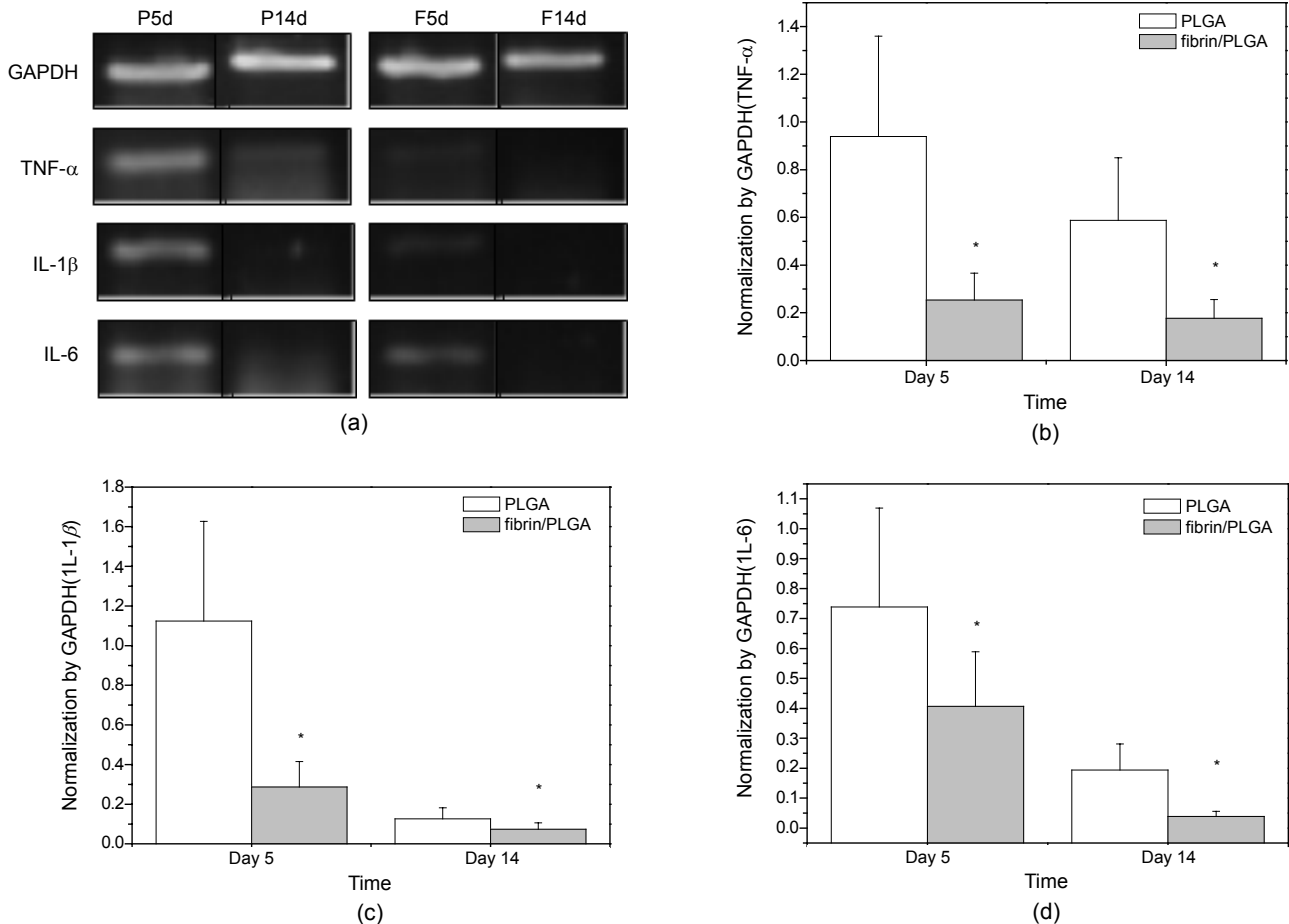


Figure 3. Gene expression profiles of GAPDH, TNF- α , IL-1 β and IL-6 as analyzed by RT-PCR on day 5 and 14: (a) The result of agarose gel electrophoresis. Normalization of (b) TNF- α ; (c) IL-1 β ; (d) IL-6 by GAPDH.

는 지지체 적출 후 염증사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 GAPDH mRNA 발현여부를 본 결과이다. Figure 3(a)에 나타난 것 같이 모든 실험군에서 house keeping gene인 GAPDH가 발현됨을 확인할 수 있었다. 또한, 5일째와 14일째에 사이토카인의 mRNA의 발현량을 비교해 볼 때 단독의 PLGA보다 피브린을 함유한 PLGA 지지체에서 밴드의 밝기가 약해지는 것으로 보아 피브린이 첨가됨에 따라 염증사이토카인의 발현정도가 감소됨을 확인할 수 있었다. GAPDH로 밴드의 광도를 표준화한 Figure 3(b)를 보면 14일째에서 두 그룹 모두 염증사이토카인의 발현정도가 감소됨을 확인할 수 있었는데 이는 초기에는 PLGA의 분해산물의 산(lactic acid, glycolic acid)으로 인해 주위의 pH가 낮아지게 되면서 염증반응을 유발하지만 시간이 흐른 후 PLGA가 생체내에서 분해되면서 염증 반응이 줄어든 것으로 사료된다. 이는 *in vitro*에서 HL-60을 배양했을 때 얻어진 결과와 유사하며 이를 통해 생체 내·외에서 fibrin/PLGA 지지체가 같은 작용을 하고 있음을 알 수 있다.

조직학적 평가. 지지체와 조직간의 상호작용을 통한 염증세포의 침윤을 확인하기 위해 H&E 염색을 실시하였고, 대식세포 발생 정도를 확인하기 위해 ED-1 단일클론항체를 이용하여 면역조직화학염색을 실시하였다. Figure 4(a)는 이식해놓은 지지체를 적출하여 H&E 염색 후 전체적인 모양을 40배 광학현미경 시야에서 관찰한 결과 두

그룹의 전체적인 모양은 차이점을 보이지 않았다. Figure 4(b)는 200배 광학현미경 시야에서 관찰하여 섬유성 막 두께를 화살표로 표시해준 것이다. 5일째와 14일째 모두 단독의 PLGA 지지체 fibrin/PLGA 지지체보다 염증세포가 더 많이 침윤되고 섬유성의 두께가 더 두껍게 형성된 것을 확인할 수 있었다. 또한, 14일째는 5일째보다 두 그룹 모두 섬유성의 두께가 얇아진 것으로 보아 지지체를 이식한 주변의 조직에서 염증세포의 침윤이 두 그룹 모두 감소함을 뜻하며 이는 앞서 분석한 결과와 부합하였다.

이상의 분석 결과들을 바탕으로 PLGA로 인한 염증반응을 피브린이 완화시켜 주고 있음을 알 수 있는데, 이는 피브린 중합 시 이용되는 트롬빈의 영향이 큰 것으로 보인다. 피브리노겐을 피브린으로 변화시키는 트롬빈은 염증반응 조건에서 백혈구가 혈관내피세포에 부착하는 것을 저해함으로써 염증을 막아줄 뿐 아니라 염증반응신호를 받은 백혈구가 혈관내피세포에 부착하더라도 염증반응 부위로 이동하기 위해 혈관내피세포간의 결합을 뚫는 것을 트롬빈이 저해하는 것으로 보인다. 또한, 트롬빈은 내피세포막에 존재하는 트롬보모듈린(thrombomodulin, TM)을 통해 결합할 수 있는데 트롬보모듈린에 결합한 트롬빈은 불활성 상태인 단백질 C를 활성화된 단백질 C로 활성화시키는 것으로 알려져있다. 활성화된 단백질 C는 트롬빈 형성을 조절하는 역할뿐만 아니라 최근의 여러 논문에서 항염증작용과 세포사멸억

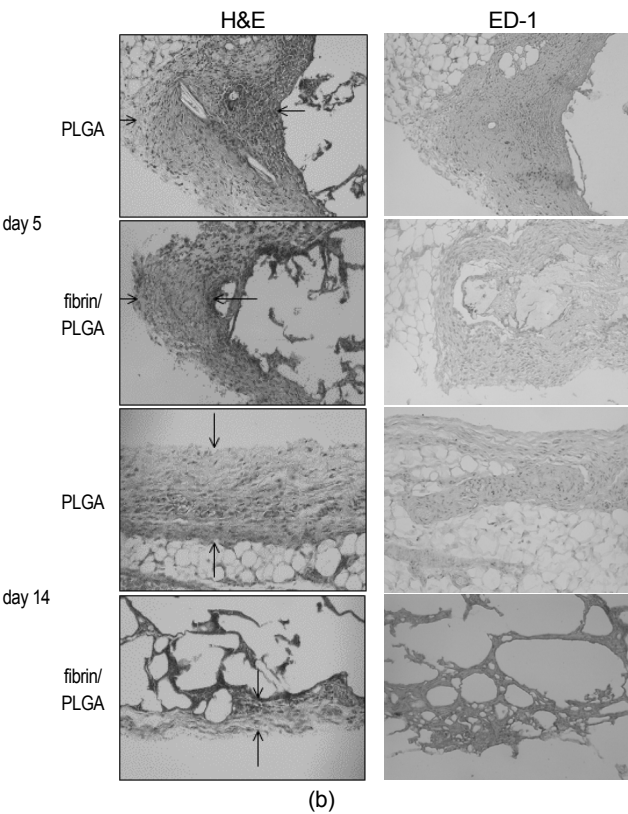
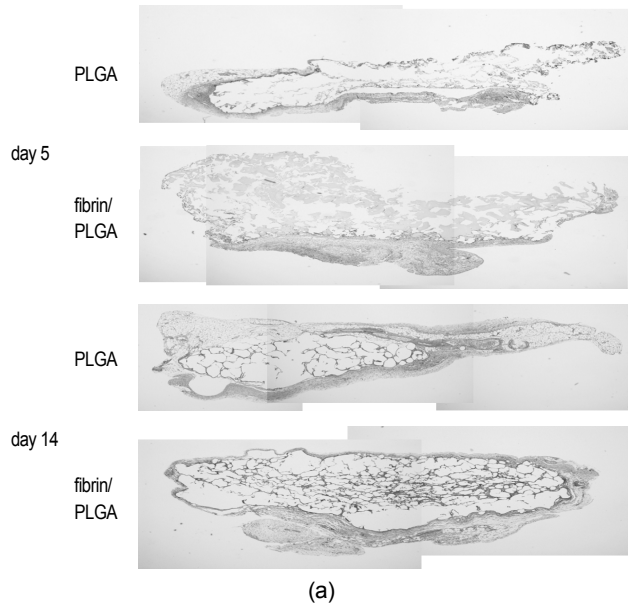


Figure 4. (a) Histological sections of implants stained by H&E (magnification, x40); (b) H&E and ED-1 immunohistochemistry staining of PLGA and fibrin/PLGA scaffolds after 5 and 14 days of implantation *in vivo*(magnification, x200).

체기능을 보여주고 있다.²⁵

결론

본 연구팀에서는 천연 재료인 피브린을 첨가한 fibrin/PLGA 다공

성 지지체를 제조하여 피브린이 PLGA 지지체로 인해 형성되는 염증 반응을 완화시킴을 *in vitro* 환경에서 증명하였다. 이에 본 연구에서는 이전의 연구에서 더 나아가 *in vivo* 환경에서 염증완화를 위한 피브린 함유 PLGA 지지체의 영향을 확인하기 위해 지지체를 Wister rat 피하에 이식하여 여러 가지 실험을 하였다. 다공성 지지체의 제조는 용매 캐스팅/염 추출법을 사용하여 제조한 후 피브리노겐 20 μ L과 트롬빈을 30 μ L씩 도포하여 사용하였다. 생체의 염증반응을 확대 증폭시키는 사이토카인인 TNF- α , IL- β , IL-6의 발현 여부를 RT-PCR을 이용하여 확인하였다. 그 결과 단독의 PLGA보다 fibrin/PLGA 지지체에서 염증 사이토카인의 발현정도가 감소됨을 확인하였다. 또한, 지지체와 조직 간의 상호작용을 통한 염증세포의 침윤을 확인하기 위해 H&E 염색과, 초기 염증 반응 시 생성되는 대식세포 발생 정도를 확인하기 위해 ED-1 면역조직 화학염색을 실시한 결과 fibrin/PLGA 지지체에서 염증세포의 침윤이 감소하였음을 확인하였고, 섬유벽의 두께도 더 얇게 형성되었다. 이는 천연재료인 피브린이 PLGA의 이물반응을 감소시키는데 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료된다.

감사의 글: 본 연구는 세계수준의 연구중심대학(WCU R31-20029) 연구지원에 의하여 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. S. H. Baek, J. H. Lee, J. W. Lee, M. L. Cho, S. I. Kim, J. I. Kim, D. S. Kim, S. H. Lee, and G. T. Kim, *J. Korean Rheum. Assoc.*, **15**, 2 (2008).
2. U. Klueh, D. I. Dorsky, F. Moussy, and D. L. Kreutzer, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **67**, 838 (2003).
3. B. S. Choi, S. H. Kim, S. J. Yoon, H. J. Ha, M. S. Kim, Y. I. Yang, Y. Son, G. Khang, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue. Eng. Reg. Med.*, **3**, 295 (2006).
4. Y. K. Ko, S. H. Kim, H. J. Ha, M. S. Kim, C. W. Han, J. M. Rhee, Y. Son, H. B. Lee, and G. Khang, *Tissue. Eng. Regen. Med.*, **4**, 67 (2007).
5. G. Khang, M. S. Kim, and B. Y. Min, *Tissue. Eng. Regen. Med.*, **3**, 376 (2004).
6. G. Khang, M. S. Kim, and S. H. Cho, *Tissue. Eng. Regen. Med.*, **1**, 9 (2004).
7. S. M. Kim, S. H. Kim, C. M. Kim, A. Y. Oh, G. A. Kim, I. W. Lee, J. M. Rhee, G. Khang, M. S. Kim, and H. B. Lee, *Tissue. Eng. Regen. Med.*, **4**, 179 (2007).
8. Y. K. Ko, S. H. Kim, J. S. Jeong, H. J. Ha, S. J. Yoon, J. M. Rhee, M. S. Kim, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **31**, 14 (2007).
9. G. Khang, S. J. Lee, and M. S. Kim, "Scaffolds: Tissue Engineering", in *Webser's Biomedical Engineering Handbook*, 2nd Ed., Marcel Dekker, New York, Vol **1**, 336 (2006).
10. J. W. Jang, B. Lee, C. W. Han, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **28**, 382 (2004).
11. M. S. Taylor, A. U. Daniels, K. P. Andriano, and J. Heller, *J. Appl. Biomater.*, **5**, 151 (1994).
12. J. Suganuma and H. Alexander, *J. Appl. Biomater.*, **4**, 13

- (1993).
13. C. C Verheyen, J. R. Wijn, and C. A. Blitterswijk, *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**, 1115 (1993).
 14. K. Athanasiou, G. G. Niederauer, and C. M. Agrawal, *Bio-materials*, **17**, 93 (1996).
 15. J. M Anderson and M. S. Shive, *Adv. Drug Del. Rev.*, **28**, 5 (1997).
 16. H. H. Hong, S. H. Kim, A. Y. Oh, N. R. Jeon, S. H. Jung, S. J. Lee, M. Dyke, J. J. Yoo, Y. Son, J. M. Rhee, and G. Khang, *Tissue. Eng. Regen. Med.*, **5**, 4 (2008).
 17. S. H. Kim, D. Lee, Y. S. Kang, B. H. Min, Y. Son, and G. Khang, *Tissue. Eng. Regen. Med.*, **6**, 273 (2004).
 18. S. Y. Kim, *Tissue. Eng. Regen. Med.*, **5**, 1 (2008).
 19. A. Y. Oh, S. H. Kim, S. H. Kim, I. W. Lee, M. S. Kim, J. M. Rhee, G. Khang, and H. B. Lee, *Tissue. Eng. Regen. Med.*, **4**, 60 (2007).
 20. E. K. Lee, J. S. Lee, and H. S. Park, *Tissue. Eng. Regen. Med.*, **2**, 94 (2005).
 21. G. Khang, S. J. Lee, C. W Han, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **534**, 235 (2003).
 22. K. J. Lee, J. G. Roper, and J. C. Wang, *Spine J.*, **5**, 217 (2005).
 23. J. Y. Lim, S. H. Kim, J. W. So, J. H. Choi, J. M. Rhee, H. S. Shin, and G. Khang, *Tissue. Eng. Regen. Med.*, **5**, 437 (2008).
 24. Y. J. Shin, J. K. Lee, and H. Chung, *J. Korean Ophthalmol. Soc.*, **43**, 4 (2002).
 25. J. S. Bae, M. K. Park, and S. W. Park, *Korean Chem. Eng.*, **47**, 4 (2009).