

세포친화적 하이드로젤의 기계적 물성이 세포 표현형 제어에 미치는 영향

김도윤 · 박흥현 · 이근용[†]

한양대학교 생명공학과

(2014년 8월 7일 접수, 2014년 9월 29일 수정, 2014년 11월 3일 채택)

Effect of the Mechanical Properties of Cell-Interactive Hydrogels on a Control of Cell Phenotype

Do Yun Kim, Honghyun Park, and Kuen Yong Lee[†]

Department of Bioengineering, Hanyang University, 222 Wangsimni-ro, Seongdong-gu, Seoul 133-791, Korea

(Received August 7, 2014; Revised September 29, 2014; Accepted November 3, 2014)

초록: 조직공학에 있어서 고분자 지지체의 물성은 세포의 부착, 이동, 성장 및 분화에 영향을 미치는 중요한 요소 중 하나이다. 이 논문에서는 다양한 강성을 가지는 세포 친화적인 알긴산 하이드로젤을 제조하고 골모세포(MC3T3-E1)와 심근세포(H9C2)를 2차원 배양한 후, 각 세포의 부착 및 성장을 연구하였다. 골조직에서 유래한 MC3T3-E1 세포는 하이드로젤의 강성도가 증가함에 따라 성장이 촉진되었지만 근육조직 유래의 H9C2 세포는 오히려 감소하였다. 재생하고자 하는 조직의 종류에 따라 지지체의 기계적인 물성을 변화시켜서 세포의 부착 및 성장을 제어하는 것은 조직공학적으로 조직 및 장기를 개발하는 데 있어서 중요한 역할을 할 것이다.

Abstract: A critical element in tissue engineering approaches is a control of the mechanical properties of polymer scaffolds to regulate cell phenotype, which may lead to clinically successful tissue regeneration. In this study, we hypothesized that gel stiffness could be a key factor to manipulate adhesion and proliferation of different types of cells. RGD-modified alginate gels with various mechanical properties were prepared and used as a substrate for MC3T3-E1 and H9C2 cells. Adhesion and growth rate of MC3T3-E1 cells *in vitro* were increased in parallel with an increase of gel stiffness. In contrast, those of H9C2 cells were decreased. This approach to control the mechanical properties of polymer scaffolds depending on the cell types may find useful applications in the tissue engineering.

Keywords: hydrogel, stiffness, alginate, adhesion, proliferation.

서 론

조직공학은 질병 또는 사고로 인해 조직이나 장기의 손상을 입은 환자들에게 인공(man-made) 조직이나 장기를 제공할 수 있는 방법으로써, 일반적으로 환자 자신의 세포와 지지체(scaffold)를 사용한다.¹ 간단하게 설명하자면 생체조직의 일부분을 채취한 후 필요한 세포를 분리 및 배양하여 충분한 세포 수를 확보한다. 이 세포들은 3차원 구조의 지지체와 함께 배양되어 조직으로 성장된 후 환자에게 다시 이식된다. 이때 지지체는 체내 조직의 세포외기질(extracellular matrix)의 다양한 역할을 모방하게 된다. 즉 지지체는 부착, 증식, 분화 등의 세포의 역할과 기능, 재생될 생체조직의 구조, 수용성 인자와 영양분 그리고 대사산물들의 확산 등의 조절을 가능

하게 한다.²

이러한 조직공학적 접근법에서 필수적으로 사용되는 지지체를 제조하기 위한 설계 요소로는 생체적합성, 세포와의 특이적 상호작용 능력, 기계적 성질, 그리고 생분해성 등이 있다.³ 특히 지지체의 기계적 성질이 매우 중요한 요소로 최근 강조되고 있다.⁴ 재료의 세포에 대한 기계적인 성질을 평가하기 위해서 견인력(traction power), 변형률(mechanical strain), 표면 지형도(surface topography), 그리고 강성도(stiffness) 등의 물리적 변화에 따른 세포 표현형의 제어에 대한 연구가 보고되었다.⁵ 그 중 재료의 강성도에 따른 세포의 증식 및 분화에 대한 연구는 최근에 많은 관심을 받아왔다.^{6,7}

조직공학용 지지체로서 의료용고분자를 이용한 하이드로젤이 다양하게 개발되어 사용되고 있다. 일반적으로 하이드로젤은 세포외기질과 유사하게 수화된 구조를 가지고 있어서 생체적합성이 좋다고 알려져 있다. 또한 주사기 등을 사용하여 비교적 작은 상처만 남기고 생체에 주입될 수 있는 장점

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: leeky@hanyang.ac.kr

©2015 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

을 가지고 있다. 하이드로젤은 친수성 고분자로 이루어진 3차원의 구조체로서 많은 양의 물을 함유하고 있다(일반적으로 50% 이상).⁸ 하이드로젤은 다양한 천연유래 또는 합성고분자를 화학적(예: 공유가교) 또는 물리적(예: 이온가교)으로 가교시켜 제조할 수 있다.^{9,10} 물리적인 가교는 이온결합, 수소결합, 소수결합이나 분자간의 얽힘에 의해 가능하다. 화학적인 가교는 중합 시에 가교제 첨가에 의해 단량체가 공유결합을 형성하거나 중합 후 가교제를 사용하기도 한다. 일반적으로 가교제의 밀도, 가교제의 종류 등을 조절함으로써 가교된 하이드로젤의 물성을 조절할 수 있다.¹¹

기존의 연구에서 지지체의 강성은 세포의 퍼짐과 세포골격 형성을 제어하는 중요 변수임이 밝혀졌다.¹² 예를 들어 중간엽 줄기세포는 뇌의 물성과 같은 지지체 표면($E=0.1-1$ kPa)에서 가지가 많이 뻗은 형태를 보였고, 일주일만 경과되면 초기 뉴런과 비슷한 형태를 가진다고 보고되었다. 그리고 10배나 더 단단한 골격근과 같은 물성을 가지는 지지체($E=8-17$ kPa)에서는 근육세포의 스핀들 모양을 보여주었다. 뼈세포의 가교된 콜라겐과 같은 $E=25-40$ kPa를 가지는 지지체에서는 다각형 모양의 뼈세포와 같은 모양을 보여주었다.⁶ 동일한 세포가 지지체의 기계적인 성질에 따라 분화 가능한 조직을 구성하는 세포의 형태를 가질 수 있음이 증명되었다.^{6,13,14}

한편, 세포와 지지체의 특이적인 상호작용을 위해서 세포의 수용체가 인식할 수 있는 리간드를 도입하는 것이 필수적이다. RGD(arginine-glycine-aspartic acid) 서열을 포함한 리간드는 세포 부착 모델에 널리 이용되고 있는데, RGD는 다양한 종류의 세포에 널리 존재하는 인테그린 수용체(e.g., $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$)와 상호작용이 가능하고 수용성 조건에서 고분자 재료에 도입이 가능하다.¹⁵⁻¹⁷ 세포부착 리간드가 도입된 지지체에 부착된 세포는 지지체를 잡아 당겨서 재료의 탄성과 나노구조를 인식한다. 한편, 세포가 견인력을 형성하여 세포의 형태를 재구성하며 유전자 발현을 포함한 물리적 형질 도입이 시작된다.^{7,18}

본 연구에서는 현재 조직공학용 지지체로 널리 사용되는 하이드로젤의 강성도 변화에 따른 세포의 특이적인 부착과 성장의 경향에 대하여 조사하였다(Figure 1). 주재료로 사용된 알긴산은 갈조류에서 얻을 수 있는 음이온성 천연고분자이고, 뛰어난 생체적합성 및 낮은 독성으로 의료용 재료로서 현재 널리 사용되고 있다.^{19,20} 상업적으로 시판되고 있는 알긴산의 경우 동물실험에서 낮은 독성 및 면역 반응을 거의 유발하지 않는 것으로 보고되었다.²¹ 다당류인 알긴산은 β -D-mannuronate(M)와 α -L-guluronate(G) 잔기들로 이루어진 선형공중합체로 알려져 있다.²² 알긴산 수용액은 2가 양이온인 칼슘을 사용하면 이온가교되어 하이드로젤을 형성할 수 있다. 2가 양이온은 알긴산 사슬의 G 블록과 높은 수준의 배위결합을 형성하여 달걀 바구니 모델(egg-box model) 구조의 결합을 한다.²³ 알긴산 G 블록의 길이 및 함량, 첨가되는 칼

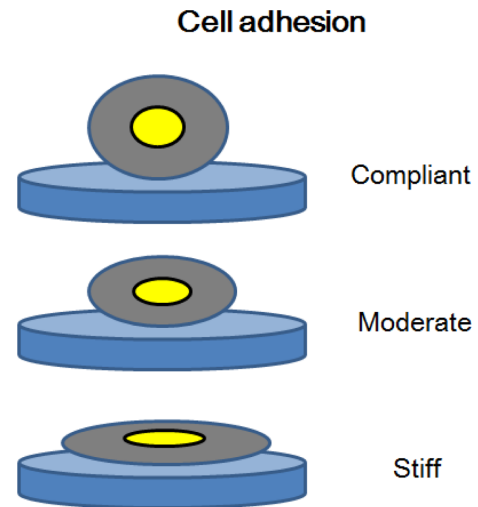


Figure 1. Schematic description of cell adhesion on hydrogels with different mechanical properties.

슘이온의 농도에 따라 가교의 양을 조절함으로써 형성되는 하이드로젤의 기계적인 물성을 조절할 수 있다.^{24,25} 따라서 본 연구에서는 알긴산과 황산칼슘을 기반으로 기계적 물성이 조절된 세포친화적인 하이드로젤 위에 골모세포(MC3T3-E1)와 심근세포(H9C2)를 배양하면서 하이드로젤의 기계적 물성이 세포 표현형에 미치는 영향을 조사하였다.

실 험

재료. 알긴산은 FMC(미국)에서, calcium sulfate, ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid(MES), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide(EDC), N-hydroxysulfosuccinimide(sulfo-NHS)는 Sigma-Aldrich(미국)에서 구입하였다. Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM), α -minimum essential medium(α -MEM), penicillin-streptomycin(PS)는 Life Technologies(미국)로부터, fetal bovine serum(FBS)는 Corning(미국)에서, G₄RGDSP는 Anygen(한국)에서 구입하여 사용하였다.

RGD-알긴산 합성. 알긴산을 MES 수용액(0.1M NaCl, pH 6.5)에 용해시켜 1%의 용액을 만든 후 sulfo-NHS, EDC, RGD 펩타이드의 순서대로 넣어 RGD-알긴산을 제조하였다. Sulfo-NHS와 EDC는 2:1의 몰비로 사용하였고(예: sulfo-NHS:EDC=27.4 mg:16.7 mg per gram alginate), RGD 펩타이드의 최종농도는 알긴산 1g 당 50.1 mg이 되도록 조절하였다. 24시간 후 반응액을 3일간 투석시켜 미반응물을 제거하였다(molecular weight cut-off=3500). 투석이 끝난 후 활성탄(activated charcoal) 처리 및 여과를 거친 후 동결건조하였다. RGD 펩타이드의 알긴산에의 결합여부는 적외선 분광분석법에 의하여 확인하였다(Perkin Elmer; KBr pellet; 400-

4000 cm^{-1} ; resolution, 4 cm^{-1} ; scan rate, 4 mm/s).

알긴산 하이드로젤 제조 및 물성 측정. 건조된 알긴산을 FBS가 없는 DMEM 용액에 용해시킨 후 주사기를 이용하여 50 μL 의 황산칼슘 현탁액과 혼합하여 하이드로젤을 제조하였다. 형성된 하이드로젤은 지름 8 mm의 원형으로 잘라내어 FBS가 첨가되지 않은 DMEM 용액에 보관하였다. 실험에 필요한 물성을 가진 하이드로젤을 얻기 위해 알긴산 농도(1-3%)와 황산칼슘 농도(0.375-6M)를 변화시켜 다양한 물성의 하이드로젤을 제조하였다. 이러한 젤들의 물성은 유동계를 이용하여 측정하였다(Bohlin Gemini 150, Malvern). 측정온도 37 $^{\circ}\text{C}$, 지연시간 2초, 5 Pa, 1 Hz의 스트레스를 가하면서 측정하였다.

세포 배양 및 성장속도 산출. MC3T3 세포를 10% FBS와 1% PS가 포함된 α -MEM을 사용하여 배양하였고, H9C2 세포는 10% FBS와 1% PS가 포함된 DMEM에서 배양하였다. 알긴산 하이드로젤 위에 각각 $5 \times 10^3 \text{mL}^{-1}$ 의 세포를 2차원 배양하고 6시간 후 혈구계산판을 사용하여 세포 수를 측정하였다(N_0). 배양 후 1일, 3일, 5일에도 마찬가지로 세포의 수를 측정하였고(N), 다음과 같은 식을 이용하여 세포의 성장속도(k, day^{-1})를 산출하였다.

$$N = N_0 \times 2^{kt}$$

세포 형태 관찰 및 종횡비 산출. 세포의 초기부착은 24시간 뒤 광학현미경(Olympus, 일본)을 이용하여 관찰하였다. 부착된 세포의 장축과 단축의 길이를 NIH ImageJ를 이용하여 결정하고 장축/단축의 종횡비(aspect ratio)를 계산하여 세포의 퍼짐 정도를 나타내었다.

세포 활성화도 평가. 하이드로젤 위에 24시간 동안 배양한 세포의 활성화도를 Live/DEAD[®] viability/cytotoxicity kit (Invitrogen, 미국)를 이용하여 평가하였다. 10 mL의 DPBS용액에 20 μL 의 ethidium homodimer-1과 5 μL 의 calcein AM을 투여하고 잘 혼합한 후 각각의 젤에 150 μL 의 용액으로 30분 동안 처리하고 형광현미경으로 관찰하였다(Olympus, 일본).

결과 및 토론

알긴산 및 황산칼슘 농도 조절에 의한 하이드로젤의 강성도 변화. 알긴산 용액과 황산칼슘 현탁액의 농도 조합을 통하여 다양한 물성을 가지는 하이드로젤을 제조하였다(Figure 2). 1%의 알긴산 용액을 사용한 하이드로젤은 강성도가 칼슘의 농도 영향을 거의 받지 않았다. 이는 고분자 농도가 충분하지 않았기 때문에 하이드로젤을 형성할 때 가교제 농도가 크게 영향을 미치지 않은 것으로 생각된다. 알긴산 농도가 증가한 경우 예상했던 대로 하이드로젤의 강성도는 황산칼슘 농도가 증가할수록 향상되었다. 이와 같은 결과로부터 기계

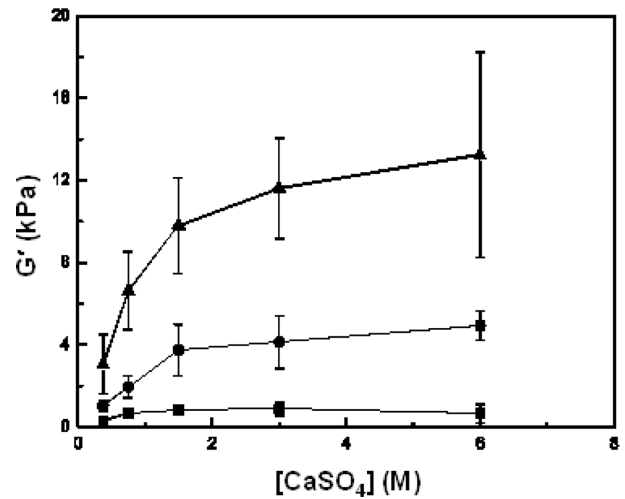


Figure 2. Changes in storage shear modulus (G') of alginate hydrogels as a function of calcium ion concentration (■, [alginate]=1 wt%; ●, 2 wt%; ▲, 3 wt%; $n=3$).

Table 1. Alginate Hydrogels with Various Mechanical Properties

Sample	Alginate (wt%)	CaSO ₄ (M)	G' (kPa)
A	1	0.75	0.7±0.1
B	3	0.75	6.6±1.9
C	3	3	11.6±2.4

적 성질이 상이하게 다른 세 종류의 알긴산 하이드로젤을 선택하여 앞으로의 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 하이드로젤의 자세한 조건을 Table 1에 정리하였다. 하이드로젤의 기계적 성질은 젤화시키는 방법뿐만 아니라, 고분자 사슬의 고유의 물리적 특성에 주로 의존한다. 적절한 기계적 성질을 가지는 하이드로젤의 제조는 새로운 형태의 고분자 합성 또는 생체적합성이 이미 검증된 기존의 고분자의 변형을 통해서도 가능하다. 알긴산 하이드로젤의 기계적 성질을 조절하기 위해 다양한 가교분자를 사용하여 하이드로젤을 제조할 수도 있으나, 화학 가교제를 사용하는 경우 반응 부산물의 독성을 우려하여 단순하게 물리적으로 가교된 알긴산 하이드로젤을 제조하여 사용하였다.

세포의 초기 부착. 조직이 재생되는 동안 하이드로젤은 일정한 공간을 제공하고 형태를 유지하는 역할을 하기 때문에 기계적 성질의 조절은 하이드로젤의 설계에 있어서 매우 중요하다. 기계적 물성이 다른 하이드로젤에 2차원 배양한 뒤 24시간 지난 MC3T3-E1과 H9C2 세포의 초기 부착형태를 광학현미경으로 관찰하였다(Figure 3). 알긴산은 타고난 친수성으로 인하여 단백질 흡착 및 세포 부착이 어렵기 때문에 세포 부착 리간드인 RGD 펩타이드를 도입하여 세포와의 특이

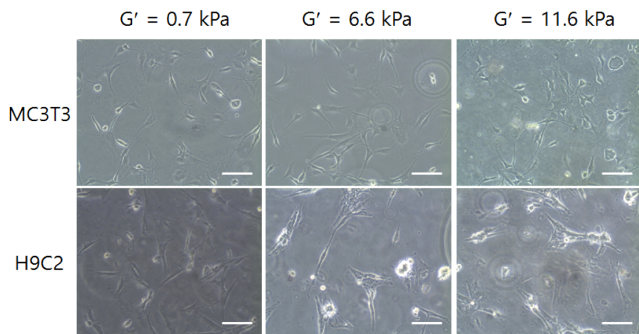


Figure 3. Images of MC3T3-E1 and H9C2 cells adhered to alginate gels with different mechanical properties. Pictures were taken 24 h post-seeding (scale bar, 20 μm).

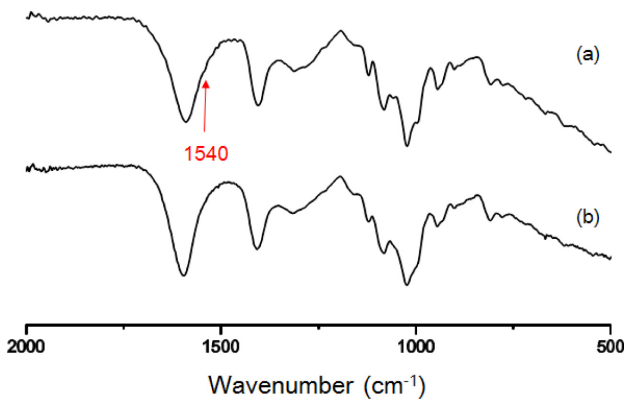


Figure 4. FTIR spectra of (a) RGD-modified alginate; (b) non-modified alginate.

적인 상호작용을 가능하게 하였다. RGD 펩타이드는 알긴산의 카르복실기와 RGD 펩타이드의 아민기가 아미드 결합을 형성함으로써 도입된다.²⁶ RGD 펩타이드가 도입된 알긴산은 적외선 분광분석 결과 1540 cm^{-1} 에서 새로운 아미드 피크가 나타났다(Figure 4). 본 실험에 사용된 알긴산 하이드로젤은 모두 같은 RGD 펩타이드 농도를 가지도록 설계하고 제조하였다. 일반적으로 리간드-수용체 특이적인 상호작용에 의하여 세포가 세포외기질에 부착하는 경우 세포 내에 cytoskeleton을 형성하고 안정된 focal contact를 형성한다. 세포의 초기 부착 형태 및 정도는 세포의 종류와 하이드로젤의 물성에 따라 상이하였다. 하이드로젤의 강성이 증가함에 따라 배양된 MC3T3-E1은 더욱 뻗어간 형태를 보였다. MC3T3-E1은 뼈 조직에서 유래한 세포이므로 강성도가 높은 재료에 부착이 더욱 용이하고 생체 내에서의 형태를 잘 나타냄을 알 수 있었다.⁶

세포 종횡비는 세포가 부착된 형태를 수치적으로 표현하기 위하여 계산하였는데 이 수치가 클수록 세포가 하이드로젤과 상호작용을 함으로써 잘 펼쳐진(extended) 것으로 간주하였다(Figure 5). MC3T3-E1 세포는 하이드로젤의 물성이 증가

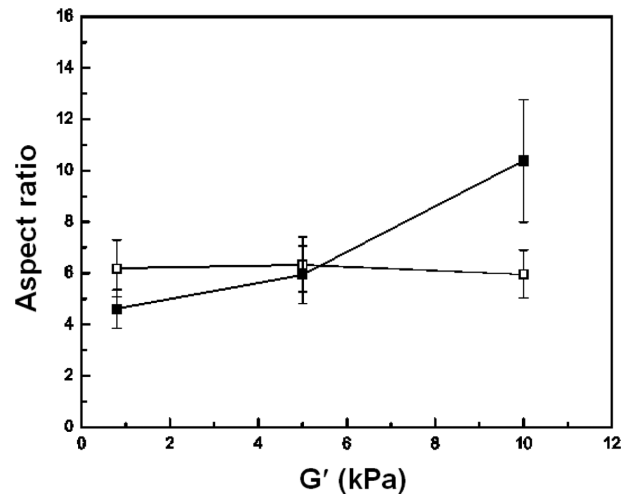


Figure 5. Aspect ratio of MC3T3-E1 (■) and H9C2 (□) vs. storage shear modulus (G') of alginate hydrogels ($n=3$).

함에 따라 종횡비가 향상된 반면 H9C2 변화가 거의 없었다. H9C2는 심근세포이고 생체 내에서 변화하는 물리 자극에 유연하게 대처하기 때문에 재료의 물성이 세포의 부착 형태에 크게 영향을 끼치지 못하는 것이라 판단되었다.

세포의 성장. 서로 다른 강성도를 가진 하이드로젤 위에서 배양한 세포 수의 시간에 따른 변화와 이를 바탕으로 산출한 세포의 성장속도를 Figure 6에 나타내었다. 실험에 사용된 세포는 골모세포(MC3T3-E1)와 심근세포(H9C2)이다. 일반적으로 뼈와 근육은 강성도가 다른 대표적인 조직이기 때문에 모델세포로 사용하였다. MC3T3-E1 세포의 수는 강성이 높은 하이드로젤 위에서 배양할 때 가장 빠르게 증가하였다. 한편, H9C2 세포는 $G'=6.6$ kPa인 시료 B에서 성장속도가 가장 빠르고, 강성이 높은 하이드로젤의 경우에는 오히려 감소하였다. 이러한 결과로부터 강성도가 높은 지지체는 뼈에서 유래한 MC3T3-E1 성장에 좋은 환경을 제공해 주고, 반면 높은 강성도의 지지체는 MC3T3-E1과 달리 H9C2의 성장에 방해가 됨을 알 수 있었다. 하지만, H9C2의 경우에도 물성이 낮아질수록 세포의 성장이 좋아지는 것은 아닌데 이것은 시료 A의 경우 물성이 너무 낮아 장기적 생존에 불안정한 환경이기 때문이라 판단되었다. 따라서 조직재생을 위한 지지체의 기계적 물성이 재생하고자 하는 세포 및 조직의 종류에 따라 다르게 조절되어야 함을 알 수 있었다.

세포의 활성도. 기계적 물성이 다른 하이드로젤 위에서 배양한 MC3T3-E1과 H9C2 세포의 활성도를 Live/DEAD® viability/cytotoxicity kit를 이용하여 분석하였다. 녹색 형광을 내는 세포는 생존한 세포이고 붉은 형광을 내는 것은 죽은 세포이다(Figure 7). MC3T3-E1과 H9C2 세포 모두 하이드로젤 표면에 초기 부착하여 잘 생존하였음을 알 수 있다.

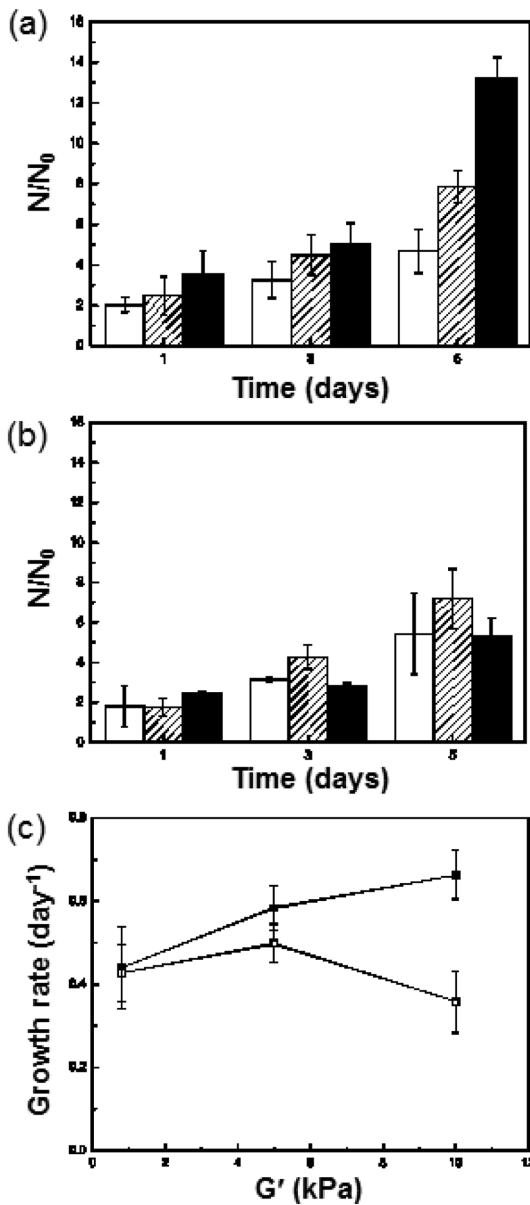


Figure 6. Changes in the number of (a) MC3T3-E1; (b) H9C2 cells over time cultured on alginate hydrogels with different mechanical properties (A, □; B, ▨; C, ■); (c) plot for growth rate of MC3T3-E1 (■) and H9C2 (□) vs. storage shear modulus (G') of alginate hydrogels ($n=3$).

결 론

본 연구에서는 알긴산을 주재료로 가교제인 황산칼슘을 사용하여 저장전단계수(G')가 0.7 kPa에서 11.6 kPa 정도의 광범위한 물성조절이 가능한 하이드로젤을 제조하였다. 다양한 강성도를 가지는 하이드로젤 표면에 뼈 조직에서 유래한 MC3T3-E1과 심근에서 유래한 H9C2를 배양하였다. 기계적 물성이 다른 조직에서 유래한 세포는 하이드로젤의 강성도에

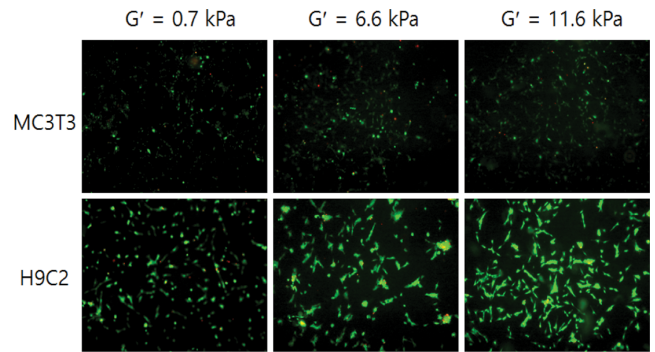


Figure 7. Live and dead assay images of MC3T3-E1 and H9C2 cells cultured on alginate hydrogels with different mechanical properties. Pictures were taken 24 h post-seeding.

따라 서로 다른 부착 형태 및 성장속도를 보였다. MC3T3-E1은 알긴산 하이드로젤의 강성도가 증가할수록 성장속도가 감소하였다. 재생하고자 하는 조직에 따라 기계적인 강도가 다른 지지체를 사용하는 것이 조직재생의 효율을 높일 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글: 본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호: HI13C1940).

참 고 문 헌

1. R. Langer and J. P. Vacanti, *Science*, **260**, 920 (1993).
2. R. Langer and D. A. Tirrell, *Nature*, **428**, 487 (2004).
3. K. Y. Lee and D. J. Mooney, *Chem. Rev.*, **101**, 1869 (2001).
4. F. Brandl, F. Sommer, and A. Goepferich, *Biomaterials*, **28**, 134 (2007).
5. A. Curtis and M. Riehle, *Phys. Med. Biol.*, **46**, R47 (2001).
6. A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, and D. E. Discher, *Cell*, **126**, 677 (2006).
7. N. Huebsch, P. R. Arany, A. S. Mao, D. Shvartsman, O. A. Ali, S. A. Bencherif, J. Rivera-Feliciano, and D. J. Mooney, *Nature Mater.*, **9**, 518 (2010).
8. K. Y. Lee and Y. S. Yuk, *Progr. Polym. Sci.*, **32**, 669 (2007).
9. J. L. Drury and D. J. Mooney, *Biomaterials*, **24**, 4337 (2003).
10. A. S. Hoffman, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**, 3 (2002).
11. N. A. Peppas, *Adv. Mater.*, **18**, 1345 (2006).
12. L. A. Flanagan, Y. E. Ju, B. Marg, M. Osterfield, and P. A. Janney, *Neuroreport*, **13**, 2411 (2002).
13. A. J. Engler, M. A. Griffin, S. Sen, C. G. Bonnetmann, H. L. Sweeney, and D. E. Discher, *J. Cell Biol.*, **166**, 877 (2004).
14. A. García and C. Reyes, *J. Dental Res.*, **84**, 407 (2005).
15. P. Lehenkari and M. Horton, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **259**, 645 (1999).
16. L. Y. Koo, D. J. Irvine, A. M. Mayes, D. A. Lauffenburger, and L. G. Griffith, *J. Cell Sci.*, **115**, 1423 (2002).

17. K. Y. Lee, H. J. Kong, and D. J. Mooney, *Macromol. Biosci.*, **8**, 140 (2008).
18. P. C. Georges and P. A. Janmey, *J. Appl. Physiol.*, **98**, 1547 (2005).
19. W. R. Gombotz and S. F. Wee, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **64**, 194 (2012).
20. H. H. Tønnesen and J. Karlsen, *Drug Develop. Ind. Pharm.*, **28**, 621 (2002).
21. K. Y. Lee and D. J. Mooney, *Progr. Polym. Sci.*, **37**, 106 (2012).
22. G. T. Grant, E. R. Morris, D. A. Rees, P. J. Smith, and D. Thom, *FEBS Letters*, **32**, 195 (1973).
23. J. L. Drury, R. G. Dennis, and D. J. Mooney, *Biomaterials*, **25**, 3187 (2004).
24. A. Seidi, M. Ramalingam, I. Elloumi-Hannachi, S. Ostrovidov, and A. Khademhosseini, *Acta Biomater.*, **7**, 1441 (2011).
25. K. Y. Lee, J. A. Rowley, P. Eiselt, E. M. Moy, K. H. Bouhadir, and D. J. Mooney, *Macromol.*, **33** 4291 (2000).
26. J. A. Rowley, G. Madlambayan, and D. J. Mooney, *Biomaterials*, **20**, 45 (1999).