

오리발 유래 콜라겐 스펀지의 피부재생 효과: *In vitro* 연구

차세롬 · 정현기 · 김수영 · 김은영 · 송정은 · 박찬흠* · 권순용** · 강길선†

전북대학교 BIN융합공학과, 고분자나노공학과, 고분자융합소재연구소

*한림대학교 의과대학 춘천성심병원 이비인후과, **가톨릭대학교 의과대학 여의도성모병원 정형외과

(2014년 11월 26일 접수, 2014년 12월 4일 수정, 2014년 12월 9일 채택)

Effect of Duck's Feet Derived Collagen Sponge on Skin Regeneration: *In Vitro* Study

Se Rom Cha, Hyun Ki Jeong, Su Young Kim, Eun Young Kim, Jeong Eun Song,
Chan Hum Park*, Soon Yong Kwon**, and Gilson Khang†

Dept. of BIN Fusion Tech. & Dept. of polymerNano Sci. Tech., Chonbuk National University, 567 Baekje-daero, Jeonju 561-756, Korea

*Dept. of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Chuncheon Sacred Heart Hospital, College of Medicine, Hallym University, 1-1 Okcheon, Chuncheon, Gangwon 200-702, Korea

**Dept. of Orthopedic Surgery, Yeouido St. Mary's Hospital, Catholic University of Korea, 62 Yeouido-dong Yeongdeungpo-gu, Seoul 150-896, Korea

(Received November 26, 2014; Revised December 4, 2014; Accepted December 9, 2014)

초록: 피부재생을 위한 생체재료는 염증반응이 최소화되는 안정한 소재로 빠른 피부재생을 돕기 위해 우수한 생체활성과 생체친화성을 가져야 하며, 세포의 부착과 성장을 돕는 미세구조와 다공성이 있어야 한다. 본 연구에서는 새로운 콜라겐 원으로서의 축산부산물인 오리발을 사용하여 콜라겐을 추출하였고 이를 탈미네랄화된 골분(demineralized bone powder, DBP), 돼지 소장점막하 조직(small intestinal submucosa, SIS)과 비교하기 위해 스펀지 형태로 제작하였다. 지지체의 물리, 화학적 특징은 SEM, FTIR을 통해 확인하였다. 세포를 파종하여 MTT를 통해 세포의 부착 및 증식을 측정하였고, 전염증성 사이토카인의 발현도를 보기 위해 RT-PCR을 실시하였다. 또한 항산화 활성능력을 보기 위해 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)를 측정하였다. 그 결과 오리발 콜라겐 지지체가 물리적 특성이 우수하고 생체적합성이며, 상처 치유제로서의 가능성을 보여주었다.

Abstract: For biomaterials for skin regeneration with minimized inflammatory response, high bioactivity and biocompatibility are highly required. Also, it should have a porous microstructure to improve cell adhesion and growth. In this study, we extracted a new collagen source from duck's feet which is by-product, and made the shape of sponges from duck's feet collagen (DC) to compare with DBP and SIS. To analyze physical and chemical property of the scaffold, SEM and FTIR were used. MTT assay was used to measure the attachment and proliferation of NIH/3T3 in the scaffolds. RT-PCR was used to evaluate the expression of proinflammatory cytokine. Also, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) was used to measure the ability of antioxidant activity. Overall, this study shows that DC scaffold is biocompatible and has good physical property. Additionally, DC scaffold shows the potential as wound healing biomaterials.

Keywords: duck's feet collagen (DC), skin regeneration, inflammatory.

서 론

피부는 표피, 진피 및 피하조직으로 나눌 수 있다. 진피에는 콜라겐이나 글리코사미노글리칸을 주성분으로 하는 세포 외 매트릭스가 존재하고, 그것에 접착한 상태로 섬유아세

포가 존재한다.^{1,2} 그리고 섬유아세포나 그 외의 세포에 영양분과 산소를 공급하기 위해서 혈관망이 형성되어 있다.^{3,4} 피부는 외적인 요인에 의해서 손상을 입은 경우, 빠르게 상처 부위를 폐쇄하여 손상을 입은 조직의 기능을 회복하는 자연 치유 능력을 갖추고 있다.^{5,6}

생체재료를 선택할 시 고려해야 할 사항은 생체재료를 체내에 이식한 후 염증이 최소화되는 안정한 소재이어야 하고 빠른 재생을 돕기 위해 우수한 생체활성과 생체친화성을 가

†To whom correspondence should be addressed.

E-mail: gskhang@jbnu.ac.kr

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

져야 한다.⁷⁻⁹ 이러한 생체재료로 천연고분자는 뛰어난 생체 적합성으로 인하여 체내에 이식 후 염증 반응이 적으며 우수한 생분해성 및 생체기능성을 가지고 있어 조직공학용 지지체로 이상적이다.¹⁰⁻¹⁴

천연재료 중 하나인 콜라겐은 세포와의 친화력이 매우 우수하며 생체 내 거부반응이 적기 때문에 생체의료용 재료로 주목 받고 있으며, 또한 지방 성분이 함유되어 있지 않고 수용성 단백질로 이루어져 흡수가 잘 이루어지는 장점이 있다.¹⁵⁻¹⁷ 피부, 뼈, 연골 등을 구성하는 당 단백질, 당 지질로 구조적으로 세포 부착이 가능하며, 산소전달 및 신축성을 가지는 특징으로 화장품의 원료뿐만 아니라 약물전달, 상처치유, 화상치유 지지체로 필름, 3D 등의 형태로 널리 응용되고 있다.¹⁸⁻²¹ 또한 다양한 사이토카인의 존재는 세포 점착이나 성장, 이동 등 세포의 기능적인 면에 관여하여 조직 재생이나 상처 치유에 매우 유용하게 작용한다.

조직공학에서는 콜라겐을 주로 소, 돼지에서 추출하여 사용한다.^{22,23} 동물유래 콜라겐은 낮은 항원성, 지혈효과, 세포 부착능력이 우수하지만 콜라겐추출 공정기간이 너무 길다는 단점을 가진다. 전 세계적으로 소, 돼지에서 광우병, 구제역이 발병하여 안정성에 관한 문제가 고려되고 있어 새로운 콜라겐 원에 대한 연구가 진행되고 있다.

이에 따라 본 실험에서는 소, 돼지에 비해 안정성이 우수하고 추출공정이 짧고 경제적으로 공급가격이 낮으며 제 1형 콜라겐이 풍부하다고 알려진 축산부산물인 오리발(duck's feet collagen, DC)을 사용하여 콜라겐을 추출하였다. 돼지에서 추출한 소장 점막하조직(small intestinal submucosa, SIS)과 소에서 추출한 탈미네랄화된 골분(demineralized bone powder, DBP)을 이전 연구에서 스펀지 형태로 제작하였을 때 가장 좋은 효과를 보인 2 wt% 함량으로 스펀지를 제작하여 비교하였다.^{24,25}

상처치유를 촉진하고 상처면의 삼출액을 조절함으로써 증발로 인한 수분 손실과 상처의 오염방지를 위해 3차원으로 제작하였으며, 손상부위를 지혈하기 위해 스펀지 형태로 피부 재생용 지지체로의 가능성을 평가하였다.²⁶⁻²⁸

실 험

시약 및 재료. 모든 화학약품 및 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였으며, 세포배양에 필요한 시약은 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하여 사용하였다.

오리발 콜라겐(DC) 분리. 오리발 3개를 수돗물에 담가 24시간 핏물을 제거한 후 지방제거를 위해 1 M NaOH에 넣고 24시간 교반한다. 그 다음 메탄올: 클로로포름을 3:1 비율로 지방제거 후 아세톤, 알코올, 3차 증류수(deionized water, DIW) 순서로 세척해준다. 콜라겐 추출을 위해 5% 구연산 2 L에 믹서기로 분쇄한 오리발을 담가 48시간 교반하고 불순물

을 거르로 걸러낸 후 원심분리(10000 rpm, 15 min)하여 산에 녹은 콜라겐을 분리해내고 콜라겐양의 3배인 알코올을 넣어 다시 한 번 원심분리(1500 rpm, 15 min)를 한다. 상층액은 버리고 침전된 콜라겐들을 모아서 DIW에 넣고 동결건조한다.²⁹

DBP 분리. DBP는 소의 대퇴골의 원위골단부, 근위골단부, 골막과 골수 및 연조직을 깨끗이 제거한 후 잘게 분쇄하여 클로로포름과 메탄올의 혼합 용매에 지방을 제거한 후 아세톤으로 건조시켰다. 0.5 N의 HCl 용액으로 탈미네랄화 과정을 거친 후 인산완충용액(PBS, pH 7.4, Sigma-Aldrich, USA)으로 pH 7.4로 조절하여 동결건조하였다.³⁰

SIS 분리. 돼지의 공장(jejunum)에 있는 지방조직을 제거하여 DIW로 공장 안과 밖을 세척한 후, 세척된 공장을 10 cm 길이로 잘라 아세트산에 담가 붙어있는 세포를 모두 괴사시킨 후, 식염수에 넣고 pH 7이 되도록 세척하였다. 잘라낸 공장을 물리적 힘을 가해서 바깥층에 있는 치밀층을 제거하고 다시 뒤집어서 점막 근육층을 제거하여 SIS층만을 분리하였다. 마지막으로 다시 식염수로 세척하고, 동결건조하였다.^{31,32}

스펀지 제조. DC, SIS, DBP 분말을 각각 DIW에 3% 아세트산(Sigma-Aldrich, USA)과 0.1% 펩신(Sigma-Aldrich, USA)을 함유한 용액에 2 wt%로 상온에서 24시간 교반 후 이를 48 well plate에 담고 냉장 4시간 냉동 4시간 후 동결 건조시켜 스펀지 형태의 지지체를 얻었다. 제조된 DC 스펀지는 0.25% 글루타알데하이드(Sigma-Aldrich, USA)에 넣어 4시간 동안 경화시킨 뒤 알데하이드 그룹의 작용을 막기 위해 0.1 M의 글리신에 24시간 담가두었으며 DBP, SIS 스펀지는 24시간 동안 EDC(*N*-(3-dimethylamino propyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride, Sigma-Aldrich, USA)로 가교하였다. 모든 스펀지는 DIW로 세척 후 동결건조하였다(Figure 1).

세포 배양. 쥐 단핵대식세포(RAW 264.7 mouse leukaemic monocyte macrophage cell line, KCLB40071)와 쥐 배아섬유아세포(NIH/3T3 mouse embryo fibroblast, KCLB21 658)는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 제공받았으며, 쥐 단핵대식세포는 DMEM 고농도 글루코오스(Dulbecco's modified eagle medium, Gibco)에 10% 우태아혈청(FBS),

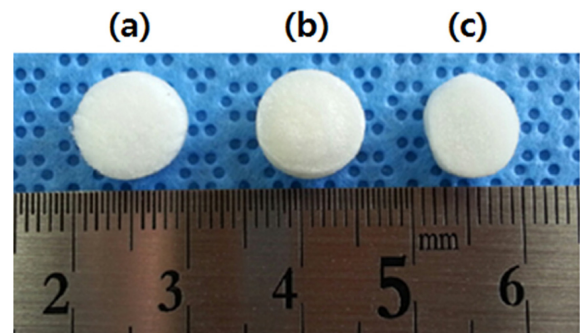


Figure 1. Images of (a) DBP; (b) SIS; (c) DC sponge.

1% 항생제(antibiotics/antimycotics)가 함유된 배양액을 만들었고, 쥐 배아섬유아세포는 RPMI 1640(Roswell Park Memorial Institute medium, Gibco)에 10% FBS, 1% 항생제(antibiotics/antimycotics)가 함유된 배양액을 만든 후 세포배양 플라스크에 분주하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 배양액은 1일에 한 번씩 교체해주었다.

스펀지 표면관찰. 스펀지의 다공크기와 세포의 모폴로지를 확인하고자 주사전자현미경(SEM; S-2250N, Hitachi, Tokyo, Japan) 관찰을 하였다. 2.5% 글루타알데하이드로 24시간 동안 고정 한 후 에탄올 구배 용액(50, 60, 70, 80, 90, 95 및 100%)으로 30분씩 탈수 후 건조하였다. 시료관찰이 용이하도록 시편을 잘라 시료폴더에 고정시킨 후, 아르곤가스 하에서 플라즈마 스퍼터(Emscope SC500K, London, UK)를 이용하여 백금 코팅하여 각각의 시료를 100, 200, 500배로 촬영하였다.

세포 증식률 측정. 세포독성과 세포증식능력을 발색 측정으로 정량하기 위해 MTT(3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma-Aldrich, USA) 분석법을 시행하였다. 제조된 스펀지에 NIH/3T3를 1×10⁵개 농도로 파종하여 배양 1, 2, 3일째에 MTT용액(5 mg/mL stock in PBS)을 100 µL씩 넣고 4시간 동안 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 4시간 후 스펀지를 시험관에 옮겨 디메틸설폭사이드(DMSO, Sigma-Aldrich, USA)용액을 1 mL씩 넣어 결정이 완전히 녹을 때까지 초음파 세척기로 용해한 후 96 well plate에 시료를 각각 100 µL씩 분주하고 570 nm 흡광도로 측정하였다.

mRNA 발현도 확인. 염증 사이토카인의 mRNA 발현여부를 알아보기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 세포 파종 후 1, 3 일째에 회수된 스펀지에 500 µL의 trizol(Invitrogen™ Life Technologies Co., Groningen, Netherlands)을 첨가하여 5분 동안 인큐베이션한 다음 1.5 mL의 EP 튜브에 넣어 100 µL 클로로포름(Sigma-Aldrich, USA)을 첨가한 후 4 °C, 12000 rpm에서 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. 역전사시킨 cDNA를 GAPDH, TNF-α, COX-2, IL-6, IL-1β을 PCR 수행을 하였다. PCR 후 증폭된 DNA를 1%(w/v) 아가로스겔에 전기영동을 한 후, 300 nm 자외선 조사기로 사진촬영을 하여 GAPDH, TNF-α, COX-2, IL-1β 및 IL-6 mRNA 밴드의 발현정도를 확인하였다.

FTIR. 제조된 스펀지의 화학적 변화를 확인하고자 FTIR-300E(JASCO, Japan)를 이용하였다. 1100~3600 cm⁻¹의 파장

범위에서 분석하였으며, 공기 중의 이산화탄소와 산소의 피크는 제거하였다.

항산화 활성 측정. 스펀지의 항산화 활성 능력을 측정하기 위해 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 분석법을 실시하였다. 메탄올로 용해시킨 DPPH 용액을 각 시료에 넣고 상온에서 30분동안 반응시킨 후 517 nm 흡광도를 측정하였다. 오차를 줄이기 위하여 시료자체의 흡광도를 측정하여 보정하였으며 대조군으로는 기존의 합성항산화제인 L-ascorbic acid를 사용하였다.

통계학적 분석. 각 실험의 통계학적 분석은 student's *t*-test를 시행하여 *P* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 것으로 하였으며(**P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001), 모든 실험은 3번 이상에 걸쳐 진행하였다(n=3).

결과 및 토론

스펀지 표면과 세포부착 양상. 피부 이식재로 적용하기 위한 최적의 생물학적 조건을 결정하기 위해 지지체를 스펀지 형태로 제조한 뒤 특성 분석을 실시하였다. 2 wt% DBP, SIS, DC 스펀지의 다공 크기를 확인하기 위해 100배, 200배로 SEM 촬영을 하여 Figure 2에 나타내었다.

DBP는 250~280 µm 크기를 가지며 매끄러운 둥근 모양을 보이는 반면에 SIS와 DC는 280 µm 이상의 다공 크기를 가지며 대부분 일정한 모양을 유지하고 있었다. 또한 NIH/3T3

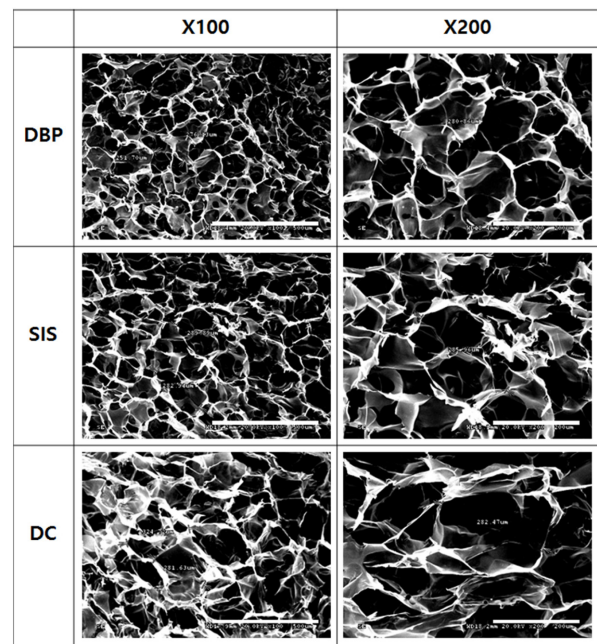


Figure 2. Surface characterization of scaffolds by SEM microphotographs (Magnification with ×100, ×200, scale bar=500 µm, 200 µm).

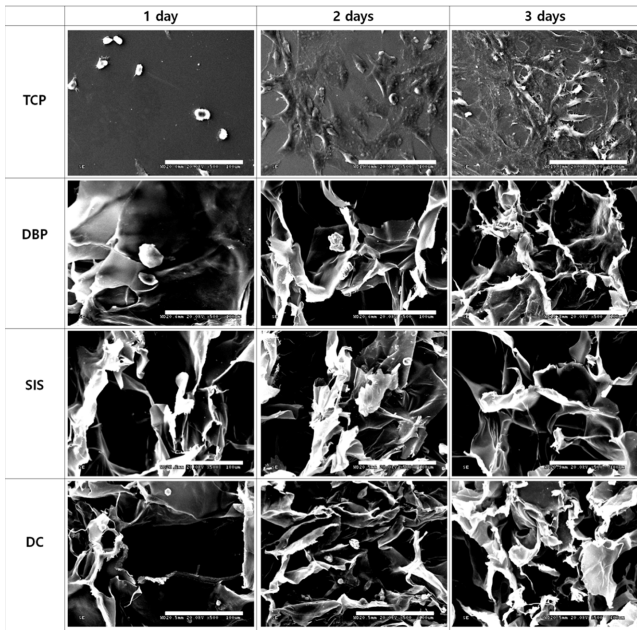


Figure 3. SEM microphotographs of NIH/3T3 cells on DBP, SIS, DC and TCP after seeded 1, 2 and 3 days for morphological study (Magnification with $\times 500$, scale bar=100 μm).

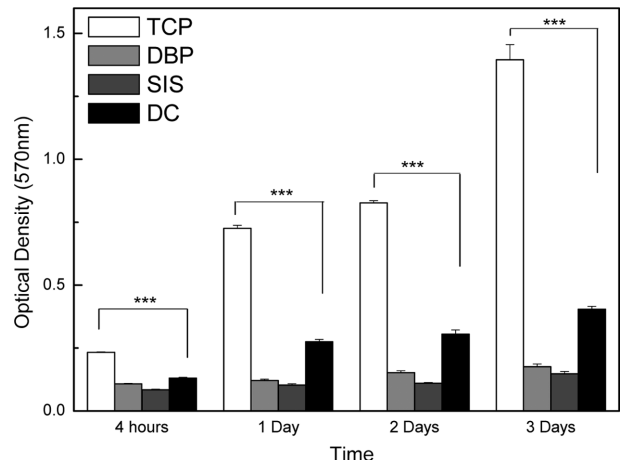
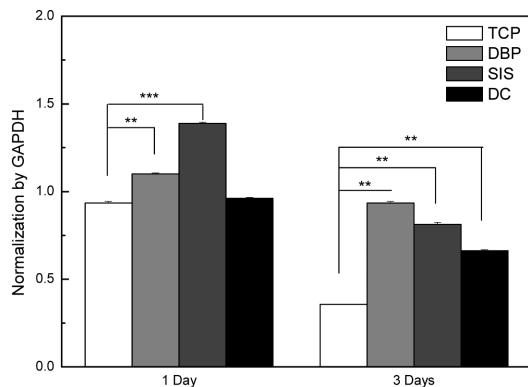


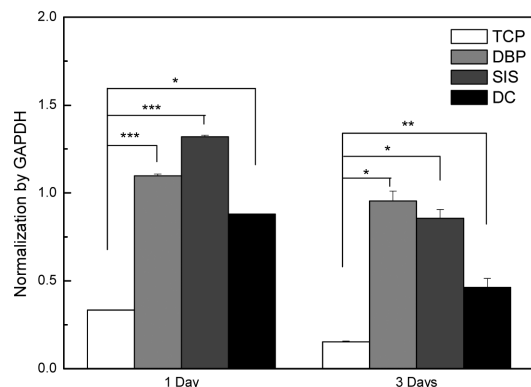
Figure 4. Cell proliferation of NIH/3T3 cell in sponges($***P < 0.001$).

세포의 부착도와 형태를 확인하기 위하여 세포를 1×10^5 개씩 파종하여 1, 2, 3일 후에 SEM 촬영을 하였으며 대조군으로 tissue culture polystyrene(TCP)를 관찰하였다(Figure 3).

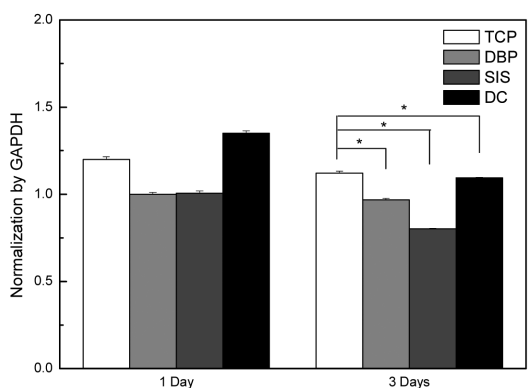
세포의 초기 부착 양상은 모든 군에서 둥근 형태를 나타내고 시간이 지날수록 세포의 수가 증가하는 것을 확인할 수



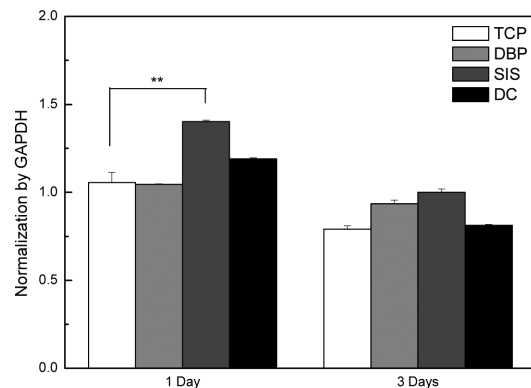
(a)



(b)



(c)



(d)

Figure 5. Gene expression profiles of (a) TNF- α ; (b) COX-2; (c) IL-1 β ; (d) IL-6 in TCP, DBP, SIS and DC sponge ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$).

있다. 특히 DC 스펀지가 표면을 덮으면서 세포의 수가 증가하는 것을 볼 수 있으며 세포의 모양 또한 긴 방추 형태로 뻗는 것을 확인할 수 있다.

세포 증식률 측정. 2 wt% 콜라겐 스펀지에서의 세포 증식률을 측정하기 위하여 *in vitro* 상에서 MTT 분석을 하였다. 각각의 스펀지에 세포를 1×10^5 개씩 파종하여 4시간, 1, 2, 3 일 후에 측정하였으며 그 결과는 Figure 4에 나타내었다. 세포의 초기 부착은 DC 스펀지가 다른 군에 비해 높게 나타났으며, SIS, DBP 스펀지의 세포 증식률은 모든 타임포인트에서 서로 비슷한 값을 가짐을 확인할 수 있었다. 시간이 지날수록 꾸준히 DC 스펀지가 다른 군에 비해 2.3배 이상 세포 증식이 일어났음을 확인할 수 있었으며 이러한 결과는 DC가 친수성 성질이 강하고 많은 세포외기질을 함유하고 있어 세포의 부착이 쉽고, 스펀지 형태로 제작되어 표면의 거칠기, 다공크기가 세포의 성장과 부착활동에 적절한 환경을 제공하여 세포에 유익한 환경을 주는 것으로 사료된다.

염증 사이토카인 발현도 분석. 2 wt% DBP, SIS, DC 스펀지에서의 염증의 발현 정도를 측정하기 위해서 스펀지에 RAW264.7 세포를 파종한 뒤 1, 3일 후에 GAPDH, TNF- α , COX-2, IL-1 β , IL-6 염증사이토카인의 mRNA 발현도를 Figure 5에 나타내었다. TNF- α 는 종양 세포를 괴사시키는 항종양 물질로서 바이러스 복제를 억제하는 능력을 가지며, COX-2는 프로스타글라틴의 합성에 중요한 효소이고 혈관 내피 성장 인자의 생산을 촉진한다. IL-1 β 는 대식 세포로부터 생성되며 대식세포의 식균 작용이 증가하게 되면 나타나는 전염증성 사이토카인이며, IL-6는 신경조직, 섬유아세포, 대식 세포에서 생산되며 급성 염증 발생 시 빠르게 유도된다. GAPDH는 house keeping gene으로 염증 사이토카인의 발현량을 표준화시켜 비교하였다. 염증사이토카인은 1일째에 비해서 3일째에 발현정도가 확연히 감소함을 볼 수 있으며 특

히 DC 스펀지에서 발현 감소량이 다른 군보다 더 많이 감소하는 것을 확인할 수 있어 피부 재생을 위한 지지체로 적합하다고 사료된다.³³

FTIR. 각각의 스펀지의 화학적 성분을 분석하기 위하여 FTIR을 측정하였다(Figure 6). DC, SIS 그리고 DBP에서 측정된 결과 모두 유사하게 콜라겐 특유의 피크인 1650, 1560, 1235 cm^{-1} 에서 콜라겐의 amide I, II, III가 나타난 것을 확인할 수 있었다. 또한 OH기 역시 3352 cm^{-1} 에서 확인할 수 있었다. 따라서 오리발에서 추출한 콜라겐의 경우 본 성질이 변하지 않고 콜라겐 피크를 가지는 것으로 사료된다.³⁴

DPPH 라디칼 소거활성에 의한 항산화 활성 측정. 피부는 활성산소로 인해 시간이 지날수록 점점 산화되어 수분을 잃게 되고 정상세포를 공격하여 각종 질병과 노화의 진행이 시작된다. 이러한 활성산소의 생성을 억제하는 항산화 효과는 노화방지를 위한 척도일 뿐만 아니라 피부의 재생을 위한 발판으로 DPPH 라디칼 소거 활성에 의해 항산화 활성을 측정하여 Figure 7에 나타내었다. Figure 7(a)는 대조군으로 널

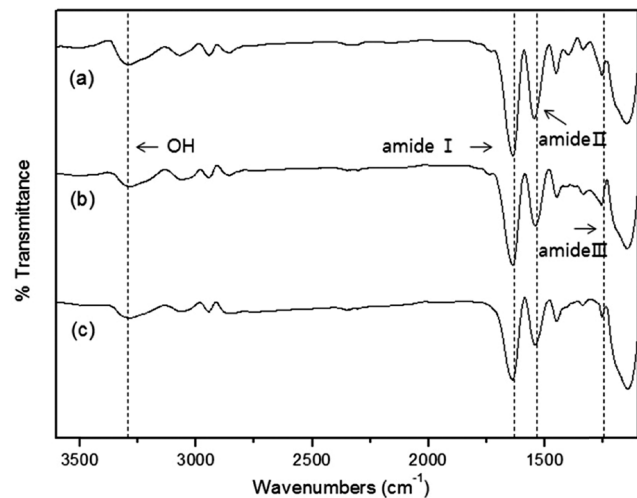


Figure 6. FTIR spectra of (a) DC; (b) SIS; (c) DBP sponge.

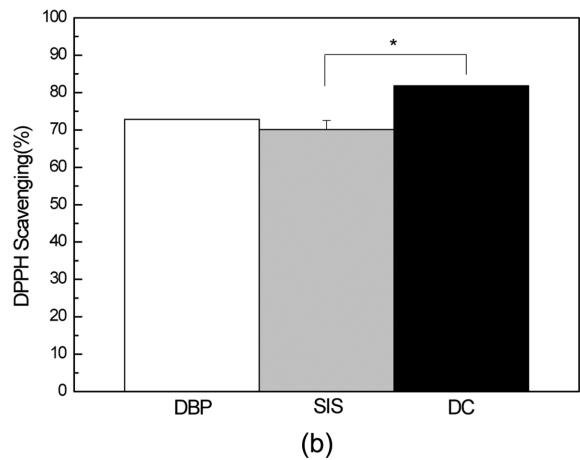
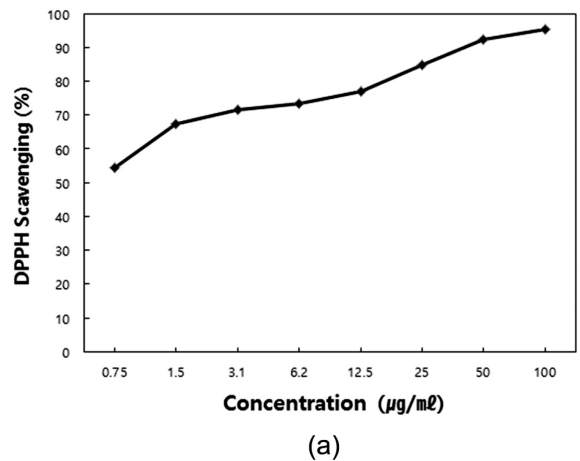


Figure 7. (a) antioxidant activity effect according to the concentration of L-ascorbic acid; (b) antioxidant activity effect of DBP, SIS and DC sponge (* $P < 0.05$).

리 이용되고 있는 L-ascorbic acid의 standard curve를 이용하여 DPPH 라디칼 소거능 값을 얻었다(Figure 7(b)). DPPH의 값을 보아 DBP, SIS 스펀지는 72, 70%의 값을 가지는 것에 비해 DC 스펀지는 82%의 높은 항산화 값을 띠는 것을 확인할 수 있다.³⁵

결 론

본 연구에서는 오리발에서 추출한 콜라겐을 돼지의 SIS, 소의 DBP와 비교하여 스펀지 형태의 지지체를 제작하였으며, 콜라겐 스펀지에서의 염증 완화 효과를 *in vitro* 환경에서 실시하였다. 오리발에서 추출한 콜라겐을 FTIR을 통해 콜라겐 성질을 가지고 있음을 확인하였고, SEM 분석을 통해 스펀지의 다공크기는 비교하였으며, 세포의 부착양상과 모폴로지를 확인할 수 있었다. MTT를 통해서 세포의 초기 부착률과 증식을 확인하였으며, 오리발에서 추출한 콜라겐 스펀지에서 가장 우수한 부착력을 보였다. 오리발 콜라겐 스펀지에서의 RT-PCR 결과 염증인자의 발현이 감소되어 염증완화 효과를 보이며, 항산화 활성 능력 또한 가장 높은 것을 알 수 있었다. 이러한 결과를 보아 오리발에서 추출한 콜라겐 스펀지는 피부 재생용 지지체로서 긍정적인 환경을 제공할 것이며, 화상 치료의 드레싱 재료로 응용 가능할 것이라 사료된다.

감사의 글: 이 논문은 2013년 전라북도에서 시행한 R&D 지원사업의 지원(2013하A11), 농림수산식품부 기술사업화 지원사업(814005-03-1-HD020)과 한국연구재단 BK21 플러스사업의 지원을 받아 수행된 연구입니다.

참 고 문 헌

1. W. Friess, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **45**, 113 (1998).
2. K. W. Ng, *Inter. J. Tissue Regen.*, **4**, 29 (2013).
3. S. J. Hollister, *Nat. Mater.*, **4**, 518 (2005).
4. A. Leal-Egana and T. Scheibel, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **55**, 155 (2010).
5. A. D. Metcalfe and M. W. Ferguson, *J. R. Soc. Interface*, **4**, 413 (2007).
6. O. J. Lee, J. M. Lee, H. J. Jin, and C. H. Park, *Inter. J. Tissue Regen.*, **1**, 68 (2010).
7. Q. Ye, K. Ohsaki, K. Li, D. J. Li, C. S. Zhu, T. Ogawa, S. Tenshin, and T. Takano-Yamanoto, *Auris Nasus Larynx*, **28**, 131 (2001).
8. C. Liu, Z. Xia, and J. T. Czernuszka, *Chem. Eng. Res. Des.*, **85**, 1051 (2007).
9. A. J. Singer and R. A. Clark, *N. Engl. J. Med.*, **341**, 738 (1999).
10. S. R. Caliar, M. A. Ramirez, and B. A. C. Harely, *Biomaterials*, **32**, 8990 (2011).
11. A. Aszodi, K. R. Legate, I. Nakchbandi, and R. Fassler, *Annu. Rev. Biol.*, **22**, 591 (2006).
12. J. E. Song, R. Kim, J. H. Lee, H. M. Kim, C. M. Kim, D. Lee, and G. Khang, *Inter. J. Tissue Regen.*, **4**, 17 (2013).
13. J. Brinckmann, *Top. Curr. Chem.*, **247**, 1 (2005).
14. R. M. Boehler, S. Shin, A. G. Fast, R. M. Gower, and L. D. Shea, *Biomaterials*, **34**, 5431 (2013).
15. G. R. Grotendorst, H. E. Seppa, H. K. Kleinman, and G. R. Martin, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78**, 3669 (1981).
16. J. A. Ramshaw, J. A. Werkmeister, and V. Glattauer, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, **13**, 335 (1996).
17. B. Chevally and D. Herbage, *Med. Biol. Eng. Comput.*, **38**, 211 (2000).
18. H. M. Powell, D. M. Supp, and S. T. Boyce, *Biomaterials*, **29**, 834 (2008).
19. R. M. Capito and M. Spector, *Gene Therapy*, **14**, 721 (2007).
20. J. C. Murray, G. Stingl, H. K. Kleinman, G. R. Martin, and S. I. Katz, *J. Cell Biol.*, **80**, 197 (1979).
21. E. J. Chong, T. T. Phan, I. J. Lim, Y. Z. Zhang, B. H. Bay, S. Ramakrishna, and C. T. Lim, *Acta Biomater.*, **3**, 321 (2007).
22. R. F. Oliver, H. Barker, A. Cooke, and R. A. Grant, *Biomaterials*, **3**, 38 (1982).
23. S. E. Lynch, R. B. Colvin, and H. N. Antoniades, *J. Clin. Invest.*, **84**, 640 (1989).
24. B. P. Kropp, B. L. Eppley, C. D. Prevel, M. K. Rippey, R. C. Harruff, S. F. Badylak, M. C. Adams, R. C. Rink, and M. A. Keating, *Urology*, **46**, 396 (1995).
25. S. Mizuno and J. Glowacki, *Biomaterials*, **17**, 1819 (1996).
26. N. Boucard, C. Viton, D. Agay, E. Mari, T. Roger, Y. Chancerelle, and A. Domard, *Biomaterials*, **28**, 3478 (2007).
27. J. H. Yeo, K. G. Lee, H. C. Kim, H. Y. L. Oh, A. J. Kim, and S. Y. Kim, *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 1220 (2000).
28. D. H. Roh, S. Y. Kang, J. Y. Kim, Y. B. Kwon, H. Y. Kweon, K. G. Lee, Y. H. Park, R. M. Baek, C. Y. Heo, and J. Choe, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **17**, 547 (2006).
29. H. A. Ko, H. M. Kim, H. J. Ha, R. Kim, J. E. Jang, K. H. Kim, J. H. Lee, J. S. Song, H. Yoon, O. J. Lee, D. Lee, C. H. Park, and G. Khang, *Inter. J. Tissue Regen.*, **3**, 103 (2012).
30. B. P. Kropp, B. L. Eppley, C. D. Prevel, M. K. Rippey, R. C. Harruff, S. F. Badylak, and M. A. Keating, *Urology*, **43**, 396 (1995).
31. K. S. Park, C. M. Jin, S. J. Yun, K. D. Hong, S. H. Kim, M. S. Kim, J. M. Rhee, G. Khang, and H. B. Lee, *Polym. Korea*, **29**, 501 (2005).
32. S. H. Kim, J. E. Song, D. Lee, and G. Khang, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **8**, 279 (2014).
33. C. R. Shim, Y. J. Lee, H. A. Ko, M. J. Kim, J. W. Bae, J. H. Lee, J. E. Song, and G. Khang, *Inter. J. Tissue Regen.*, **3**, 50 (2012).
34. L. L. Fernandes, C. X. Resende, D. S. Tavares, G. A. Soares, L. O. Castro, and J. M. Granjeiro, *Polimeros*, **21**, 1 (2011).
35. P. Molyneux, *Songklanakarinn J. Sci. Technol.*, **26**, 211 (2004).