

연골 재생을 위한 젤라틴과 젤란검을 혼합한 하이드로젤 평가

송정은 · 송아성 · 전성현 · 최일남 · 김초민 · 강길선*

전북대학교 BIN융합공학과, 고분자나노공학과, 고분자융합소재연구소
(2016년 12월 19일 접수, 2017년 2월 1일 수정, 2017년 2월 10일 채택)

Evaluation of Gelatin and Gellan Gum Blended Hydrogel for Cartilage Regeneration

Jeong Eun Song, Yah Seong Song, Sung Hyun Jeon, Il Nam Choi, Cho Min Kim, and Gilson Khang[†]

Dept. of BIN Convergence Tech & Dept. of PolymerNanoSci Tech, Chonbuk National University,
567 Baekje-daero, Jeonju 54898, Korea

(Received December 19, 2016; Revised February 1, 2017; Accepted February 10, 2017)

초록: 천연 다당류인 젤란검은 내열성, 내산성, 내효소성이 우수하여, 널리 조직공학적으로 응용을 위해 사용된다. 그러나 젤란검은 낮은 세포 부착력을 갖는 단점이 있다. 따라서 본 연구에서는 연골 세포 부착 효율을 증진시키기 위해, 젤란검 무게당 0, 10, 20 및 30 wt%의 젤라틴이 포함된 젤라틴/젤란검(G/GG) 하이드로젤을 제작하였다. 제작된 G/GG 하이드로젤의 물리적, 화학적 특성을 평가하기 위해, 압축강도, SEM, FTIR을 평가하였다. 또한 하이드로젤에서 연골 세포의 세포 부착력 및 기능적 유지를 관찰하기 위하여, MTT, RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, 21일에 20 wt% G/GG 하이드로젤의 연골 세포 증식률은 0, 10, 및 30 wt%의 G/GG 하이드로젤보다 1.058, 1.051 및 1.04 배 높게 나타났으며, 타입 2 콜라겐 유전자 발현 역시 각각 1.35, 1.21 및 1.16배로 관찰되었다. 그러므로, 20 wt% G/GG 하이드로젤은 연골 재생을 위한 생체재료로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

Abstract: Gellan gum is a natural polysaccharide with good heat, acid and enzymes resistance, and widely used for tissue engineering application. However, one of the drawbacks of gellan gum is lower cell attachment. Hence, in this study, gelatin/gellan gum (G/GG) hydrogels containing 0, 10, 20, and 30 wt% of gelatin per gellan gum weight were prepared for improvement of chondrocyte attachment efficiency. The mechanical and chemical properties of prepared G/GG hydrogel were evaluated using compression strength, scanning electron microscopy and FTIR. Also, the cellular proliferation and functional maintenance of chondrocytes in hydrogel was assessed by MTT analysis, and RT-PCR. The results showed that 20 wt% G/GG hydrogel was 1.058, 1.051 and 1.04 folds higher chondrocyte proliferation compared to 0, 10 and 30 wt% and Type-II collagen gene expression was 1.35, 1.21 and 1.16 folds at 21 days, respectively. Thus, 20 wt% G/GG hydrogel can be envisioned as a useful biomaterial for future cartilage regeneration applications.

Keywords: gellan gum, gelatin, hydrogel, cartilage regeneration.

서 론

관절 연골(articular cartilage) 조직은 80%의 물과 치밀한 세포의 기질로 구성되어 있다. 세포의 기질은 제 2형 콜라겐으로 이루어져 있으며, 콜라겐과 콜라겐 사이는 물과 단백당(proteoglycan)이 겔 형태로 차지하고 있다.¹⁻³ 관절 연골은 관절에 가해지는 충격을 흡수하고, 분산시켜, 마찰과 마모를 최소화시켜주는 역할을 한다.

외상, 노화, 질병 등과 같은 원인으로 관절 연골 손상이 발생하면, 통증과 기능 제한이 발생되어, 일상생활에 불편함을 초래한다. 또한 관절 연골에는 혈관, 신경, 림프 조직이 없어, 손상 시 회복능력이 제한된다.^{4,7} 따라서 연골 손상이 되면, 관절 내 주사, 약물 복용, 물리치료, 수술 등의 치료법이 전통적인 치료방법으로 사용되고 있다.⁸ 한편, 결손 부위가 큰 경우, 전통적인 치료방법으로는 치유가 쉽지 않아, 결손 부위에 효과적인 치료방법이 필요한 실정이다. 기존의 자가 또는 동종 이식술(osteochondral autograft or allograft)은 연골 세포를 채취하는 데에 있어서, 기증자 및 환자 자신에게 고통이 수반되며, 외부감염 및 연골조직 제한 등의 문제점을 가진다.⁹ 따라서 조직공학적 방법 즉 체외에서, 연골세포를 배양하여 하이

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: gskhang@jbnu.ac.kr

©2017 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

드로젤에 혼합하여 자연연골과 유사한 환경을 조성하여 주입하는 방법이 가장 효과적인 치료 방법으로 대두되고 있다.^{10,11}

연골재생 기질로 가장 많이 사용되는 천연고분자는 콜라겐,^{12,13} 알지네이트,¹⁴ 히알루론산,¹⁵ 젤란검, 젤라틴 등이 있다. 젤란검(gellan gum, GG)은 글루콘산, 람노오스, 포도당(1:1:2)이 규칙적으로 반복되는 선형의 복합다당류로, 무색 투명하고, 내열성, 내산성, 내효소성 등이 우수하다.^{16,17} 또한 pH나 이온 첨가 등을 통해 젤의 물성을 조절할 수 있으며, 세포 독성이 없어 연골 및 디스크 재생 등의 분야에서 생체 재료로 다양하게 연구되고 있다.¹⁸ 젤라틴(gelatin, G)은 콜라겐의 가수분해 산물로 글리신, 프로린(proline), 하이드록시프로린(hydroxyproline) 및 기타 아미노산이 반복되는 형태로 이루어져 있으며, 세포부착성 및 생분해성이 뛰어나며, 낮은 항원성을 가진다.^{19,20} 또한 콜라겐에 비해 가격이 저렴하여 생체 재료로 많이 이용되고 있다. 젤란검은 앞선 장점에도 불구하고, 매끄러운 표면으로 인해, 세포 부착이 다른 생체재료보다 다소 낮은편이다. 따라서 본 연구에서는, 젤란검의 세포 부착력을 향상시키고자, 젤라틴을 혼합한 하이브리드 젤라틴/젤란검 하이드로젤(G/GG)을 제작하여, 연골재생 하이드로젤로의 응용 가능성을 확인하고자 하였다.

실 험

시약 및 재료. 젤란검은 Gelzan™ CM(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, 평균 분자량 1000000 g/mole, G1910), 젤라틴(Kanto Chemical CO, Tokyo, Japan)을 사용하였다. 그 외 모든 화학약품 및 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다.

젤란검 하이드로젤 제조. 젤란검은 3차 증류수에 2 wt%의 젤란검 분말을 첨가시켜 상온에서 90 °C까지 가열시켜 젤란검이 완전히 용해가 되도록 30분간 교반하였다. 그 후 젤라틴은 젤란검 양의 각각 0, 10, 20 및 30 wt%의 농도로 넣어준 후 교반시키고, 0.03% CaCl₂를 첨가하여, 가교하였다. 젤란검 및 젤라틴/젤란검 수용액은 60 °C로 낮춘 후 패트리 디쉬에 분주하여 굳혔다. 굳힌 젤란검은 바이옵시(biopsy)를 이용하여, 직경 8 mm, 높이 5 mm의 하이드로젤 형태의 젤란검을 제조하였다(Figure 1). 그리고 물성 분석을 위해 제조된 하이드로젤은 냉장, 냉동에서 각각 4시간 동안 보관하고, -80 °C에서 24시간 동안 급랭시킨 후 2일 동안 동결 건조하여 스펀

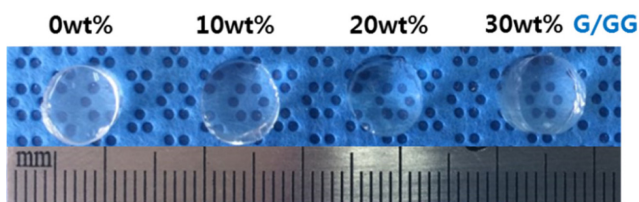


Figure 1. Fabricated G/GG hydrogels.

지 형태로 제조하였다.

압축강도 측정. G/GG 하이드로젤의 압축강도를 측정하기 위하여 만능물성측정기(TMS-Pro, Food Technology Corporation, Sterling, USA)를 이용하였다. 만능물성측정기의 설정값으로 측정거리는 3 mm, 측정 속도는 20 mm/min, 측정 힘은 1 N으로 하였다.

SEM 관찰. G/GG 하이드로젤의 다공 및 지지체의 표면을 관찰하기 위하여 SEM 측정을 실시하였다. 지지체를 아르곤 가스 하에서 플라즈마 스퍼터(Emscope, Model SC500K, West Sussex, UK)를 이용하여 백금 코팅하였고 주사전자 현미경(Hitachi Co, Model S-2250N, Tokyo, Japan)을 이용하여 표면을 관찰하였다.

FTIR 분석. G/GG 하이드로젤의 화학적 변화를 확인하기 위하여 적외선 분광 광도계(FTIR, GX, Perkin Elmer, Connecticut, USA)를 이용하여 4000~500 cm⁻¹ 파장에서 분석하였다.

연골 세포 분리 및 배양. 연골세포는 뉴질랜드 화이트 토끼(4주, Hanil laboratory animal center, Wanju, Korea)의 무릎 관절에서 분리하여 사용하였다. 토끼는 희생시킨 후 다리의 털을 제거하고, 멸균된 수술용 가위로 무릎 관절을 절개해 연골 부위만 취한 다음 인산완충용액(PBS, pH7.4, Gibco, New York, USA)으로 세척 후 0.25 wt%의 콜라게네이즈 A형(Roche, Indianapolis, USA) 용액으로 12시간 동안 인큐베이터(37 °C, 5% CO₂)에서 조직을 용해시켰다. 용해된 조직은 70 μm의 나이론 매쉬로 거른 후 원심분리하여 PBS로 3회 세척한 다음 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM, Gibco)과 F-12 영양배지 혼합액(Ham's F-12, Gibco), 10% 우태아혈청(FBS, Gibco) 및 1% 항생제(100 units/mL 페니실린과 100 μg/mL 스트렙토마이신)와 200 mM L-글루타민(Gibco), 50 μg/mL 아스코르빈산(Sigma, St. Louis, USA), 15 mM HEPES buffer 1 M(Gibco BRL)이 함유된 배양액으로 현탁액을 만든 후 세포배양 플라스크에 분주하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 배양액은 일주일에 세 번 교체해 주었고 이렇게 얻어진 세포들의 순수 배양 정도를 현미경 관찰을 통하여 확인하였다.

세포 증식률 측정. 세포 증식능력을 분석하기 위해 MTT(디메틸치아졸-2-일-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드) 분석법을 시행하였다. 각 하이드로젤에, 1×10⁵ 세포/하이드로젤의 농도로 연골세포를 파종하고, 상기의 배양액으로 정적 배양하였다(각 하이드로젤 당 n=3). 배양 1, 3, 7, 14 및 21일째에 MTT 용액(5 mg/mL stock in PBS, Sigma)을 100 μL씩 넣고 4시간 동안 37°C 인큐베이터에서 배양하였다. 그 후 보라색 결정이 생성되면 하이드로젤을 시험관에 옮겨 디메틸설폭사이드(DMSO, Sigma) 용액을 1 mL씩 넣어 결정이 완전히 녹을 때까지 용해한 후 96 well plate에 시료를 각각 100 μL씩 분주하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

mRNA 발현도 확인. G/GG 하이드로젤에 파종된 연골 세포의 특정 mRNA 발현여부를 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 세포 파종 후 7, 14, 21일째에 G/GG 하이드로젤에 1 mL의 Trizol(Invitrogen™ Life Technologies Co., Groningen, Netherlands)을 첨가하여 5분 동안 인큐베이션한다. 그 후 EP 튜브에 용액을 넣고, 0.2 mL의 클로로포름(Sigma)을 첨가한 다음 원심분리(4 °C, 12000 g, 15분)를 하여, 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 cyclor(TP600, Takara Bio Inc., Shiga, Japan)를 통하여 cDNA로 역전사하였다. 역전사시킨 cDNA를 GAPDH, aggrecan, type II collagen 및 type I collagen PCR을 수행하였다. PCR 후 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, aggrecan, type II collagen 및 type I collagen mRNA 밴드의 발현 정도를 확인하였다.

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 3 번 이상에 걸쳐 진행하였다(*n*=3).

결과 및 토론

압축강도 측정. G/GG 하이드로젤의 물리적 특성을 평가하기 위하여 압축강도를 실시하였다(Figure 2). 0, 10, 20, 및 30 wt% G/GG 하이드로젤의 압축강도는 각각 70.32±2.82, 57.72±4.31, 55.28±3.38 및 53.24±3.11 KPa 값으로 나타났다.

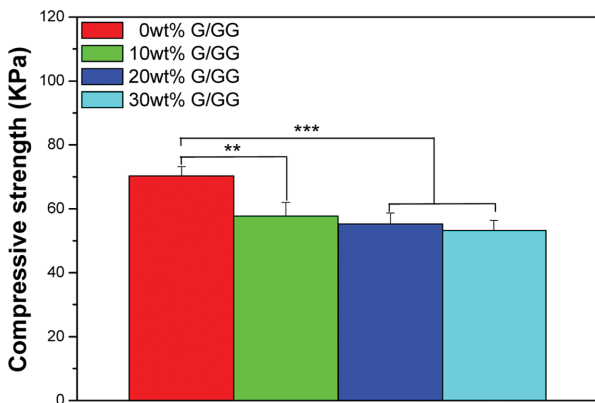


Figure 2. Compressive strength of G/GG hydrogels (***p*<0.01, ****p*<0.001).

이는 젤라틴이 젤란검에 첨가된 양이 많아질수록 압축강도가 감소된 것으로써, 이러한 이유는 젤란검 구조에서 글루콘산에 있는 음이온 결합부위를 젤라틴이 감소시키므로써, 가교 결합을 할 수 있는 부분을 감소시키기 때문으로 사료된다.^{18,21}

SEM 관찰. 동결 건조시킨 G/GG 하이드로젤의 SEM 관찰 결과, G/GG 하이드로젤은 전체적으로 모든 군에서 비교적 매끄러운 표면을 갖는 것을 확인할 수 있었으며, 0 wt% G/GG의 다공은 다른군보다 크고 동그란 형태를 유지하는 반면, 젤라틴이 포함되는 10, 20, 및 30 wt%의 G/GG 하이드로젤의 경우 젤라틴의 함량이 증가할수록 다공모양이 판상형태로 변하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 앞서 언급한 바와 같이 젤라틴이 증가할수록, 젤란검의 음이온 결합부위가 감소됨에 따라 구조를 유지하지 못하여, 다공크기가 감소되면서, 판상 형태로 변화하는 것으로 사료된다(Figure 3).

FTIR 분석. Figure 4는 G/GG hydrogels의 FTIR 분석결과이다.

젤란검의 주요 피크인 O-H가 3358 cm⁻¹, ester 결합의 C=O 피크가 1635 cm⁻¹ 부근에서 확인할 수 있었다.^{22,23} 젤라틴의 경우 N-H 피크가 3289 cm⁻¹, amide I의 C=O가 1638 cm⁻¹, amide II의 N-H는 1523 cm⁻¹에서 나타난 것을 확인할 수 있

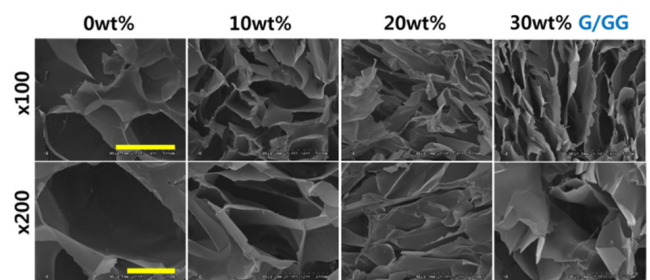


Figure 3. SEM microphotographs of freeze dried G/GG hydrogels (magnification with ×100 and 200, scale bar=500 and 200 μm).

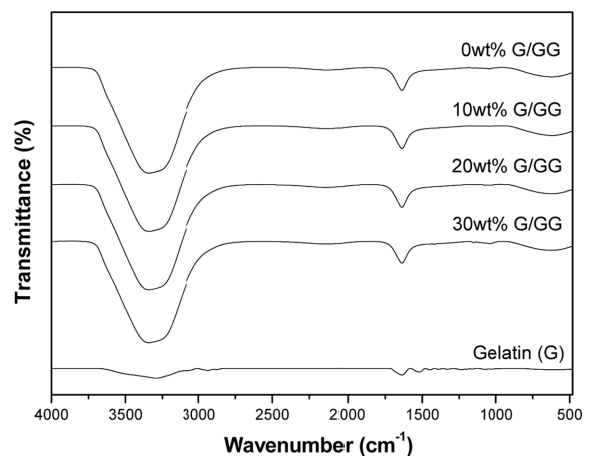


Figure 4. FTIR spectra of G/GG hydrogels.

다.²⁴ G/GG 하이드로젤에서는 앞서 언급한 주요 피크값들이 잘 나타나 있는 것으로 보아 각 성분들의 고유 성질을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 이는 제조과정에서 젤란검과 젤라틴의 성질을 잃지 않았음을 증명한다.

세포 증식을 평가. G/GG 하이드로젤에서의 세포 증식을 평가하기 위하여 연골세포를 파종하여 MTT를 분석한 결과는 Figure 5와 같다.

1일차에 0, 10, 20, 및 30 wt% G/GG 하이드로젤은 각각 0.073 ± 0.0024 , 0.07 ± 0.0028 , 0.073 ± 0.0014 및 0.072 ± 0.0021 의 세포 증식을 보였다. 초기 값은 모든 군에서 세포 증식이 비슷한 결과 값을 가졌으며, 시간이 증가함에 따라 모든 군에서 세포 증식이 증가하는 것을 확인하였다. 특히, 7, 14, 21일에 20 wt% G/GG 하이드로젤의 값은 0.089 ± 0.0026 , 0.127 ± 0.0039 및 0.159 ± 0.0023 값으로 다른 군보다 세포 증식이 높음을 확인할 수 있었다. 종합하면, 젤라틴이 첨가된 젤란검 하이드로젤군이 0 wt% G/GG 하이드로젤보다 세포 증식이 높은 것을 확인할 수 있었으며, 이는 젤라틴이 연골의 구성성분인 콜라겐의 가수분해 산물로 얻어진 단백질의 일종으로 세포부착력을 증진시키는 역할을 하기 때문이다. 그리고 30 wt% 보다 20 wt% G/GG 하이드로젤에서 세포 증식이 더 높은 이유는, 20 wt% G/GG 하이드로젤이 천연 연골 조직과 유사한 조직을 갖기 때문으로 사료된다.

mRNA 발현도 확인. *In vitro* 환경에서, G/GG 하이드로젤에 연골세포를 7, 14 및 21일 동안 배양한 후 RNA 분리 및 RT-PCR을 수행하여 연골세포에서 나타나는 특이적 유전자 발현여부를 확인하였다. GAPDH를 기준으로 하여, 연골의 구성 성분으로 정상적이고 건강한 연골에서 나타나는 어그리칸 (aggrecan), 연골 세포의 표현형을 유지하게 하며 sGAG를 합성한다고 알려진 제 2형 콜라겐과 연골의 퇴화에서 나타나는 유전자인 제 1형 콜라겐의 발현정도를 확인한 결과는 Figure 6에 나타내었다. 모든 실험 군에서 house keeping gene

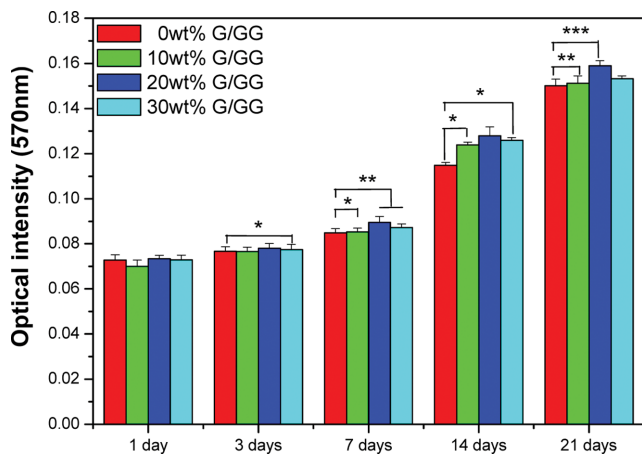


Figure 5. Chondrocyte proliferation in G/GG hydrogels at 1, 3, 7, 14 and 21 days *in vitro* (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

인 GAPDH가 발현되었으며, Figure 6(A)에서, 어그리칸의 발현도를 보면 시간이 지날수록 그 발현이 증가하며, 특히 모든 타임포인트에서 20 wt% G/GG 하이드로젤에서 다른 군보다 발현도가 더 현격히 증가하는 것을 확인할 수 있다. 또한 Figure 6(B)에서 제 2형 콜라겐의 발현도를 보면 이 역시 시간이 지날수록 20 wt% G/GG 하이드로젤에서 높은 발현을

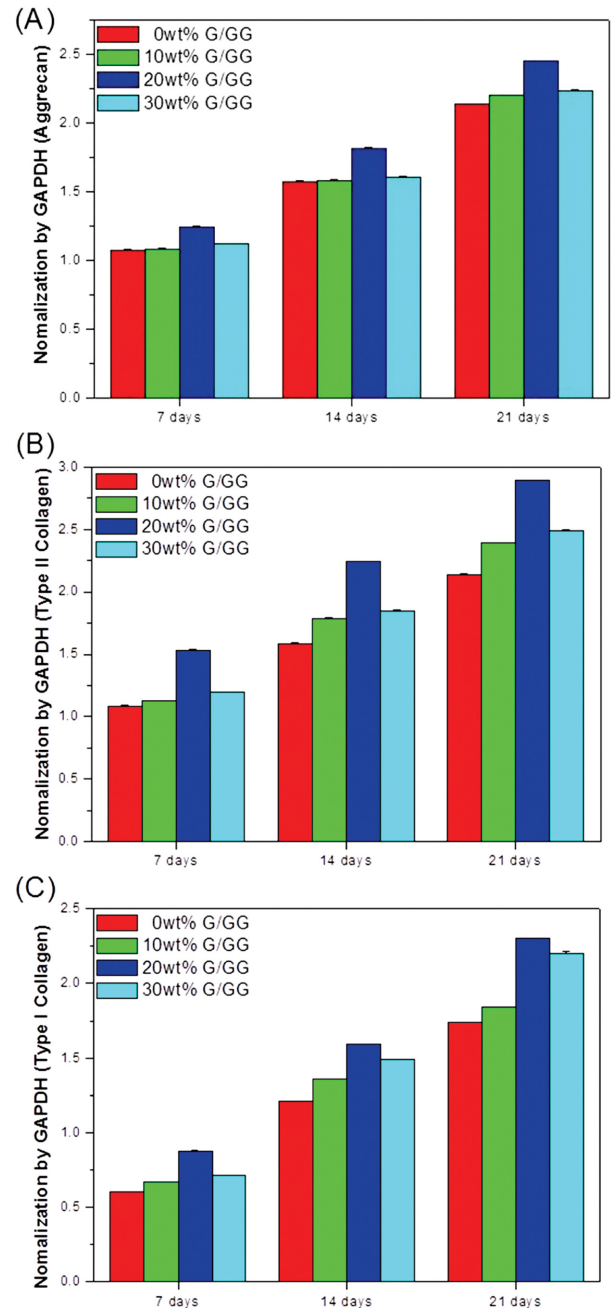


Figure 6. Gene expression of GAPDH, aggrecan, type I and II collagen analyzed by RT-PCR on 7, 14, and 21 days. Agarose gel electrophoresis normalization of aggrecan (A); type I (B); II collagen (C) by GAPDH.

보이는 것을 확인할 수 있다. Figure 6(C)에서 제 1형 콜라겐의 발현정도를 보면 시간에 따라 증가하나, 어그리칸과 제 2형콜라겐보다는 상대적으로 낮은 발현도를 보이는 것을 확인할 수 있었다.

이는 앞서 언급한 MTT와 일치하는 결과로써, 20 wt% G/GG 하이드로젤에서 연골 세포의 증식이 활발히 진행된다는 것을 확인한 것이다.

결론

본 연구에서는 젤란검에 젤라틴을 혼합한 0, 10, 20, 및 30 wt% G/GG 하이드로젤을 제작하여, 연골재생 이식물로서의 가능성을 확인하기 위해서 *in vitro*에서 평가를 실시하였다. G/GG 하이드로젤은 젤라틴의 함량이 증가할수록 다공이 판상형태로 작아지는 것을 확인하였으며, 젤라틴의 함량이 증가할수록 G/GG 하이드로젤의 압축강도는 낮아지는 것을 확인하였다. 또한 FTIR 결과, 제조된 하이드로젤은 젤란검과 젤라틴의 고유 성분이 변하지 않는 것을 확인하였으며, 세포 파종 후의 다른 군에 비해 20 wt% G/GG 하이드로젤에서 세포의 증식률이 높아지는 것을 확인하였다. 또한 mRNA 발현에서도 20 wt% G/GG 하이드로젤이 연골 표현형인 어그리칸과 제 2형 콜라겐의 발현도가 다른 군보다 높은 것을 확인하였다. 이러한 연구결과에 따르면, 20 wt% G/GG 하이드로젤은 연골 세포에 증식에 긍정적인 영향을 미치므로, 연골 재생을 위한 조직공학적 재료로 유용하게 사용될 것으로 사료된다.

감사의 글: 이 논문은 보건복지부의 재원으로 한국보건산업진흥원의 보건의료기술연구개발사업 지원(HI15C2996)을 받아 수행된 연구입니다.

참고 문헌

1. L. Vikingsson, J. A. Gomez-Tejedor, G. G. Ferrer, and J. L. G. Ribelles, *J. Biomech.*, **48**, 1310 (2015).
2. K. Ren, C. He, C. Xiao, G. Li, and X. Chen, *Biomaterials*, **51**, 238 (2015).
3. D. Lee and P. Partington, *Orthop. Trauma*, **30**, 265 (2016).
4. K. X. Zhang, S. F. Yan, G. F. Li, L. Cui, and J. B. Yin, *Biomaterials*, **71**, 24 (2015).
5. S. Fischer and A. Kisser, *J. Orthopaedics*, **13**, 246 (2016).
6. Y. Yasui, W. Ando, K. Shimomura, K. Koizumi, C. Ryota, S. Hamamoto, M. Kobayashi, H. Yoshikawa, and N. Nakamura, *J. Clin. Orthop. Trauma*, **7**, 157 (2016).
7. X. L. Zhang, Y. Wu, Z. Y. Pan, H. Sun, J. J. Wang, D. S. Yu, S. Zhu, J. Dai, Y. S. Chen, N. F. Tian, B. C. Heng, N. D. Coen, H. Z. Xu, and H. W. Ouyang, *Acta Biomater.*, **42**, 329 (2016).
8. Y. Zhang, F. Yang, K. Liu, H. Shen, Y. Zhu, W. Zhang, W. Liu, S. Wang, Y. Cao, and G. Zhou, *Biomaterials*, **33**, 2926 (2012).
9. M. Mumme, A. Barbero, S. Miot, A. Wixmerten, S. Feliciano, F. Wolf, A. M. Asnaghi, D. Baumhoer, O. Bieri, M. Kretzschmar, G. Pagenstert, M. Haug, D. J. Schaefer, I. Martin, and M. Jakob, *Lancet*, **388**, 1985 (2016).
10. I. G. Kim, J. Ko, H. R. Lee, S. H. Do, and K. Park, *Biomaterials*, **85**, 18 (2016).
11. Y. C. Kuo and C. C. Wang, *Colloids Surf. B*, **93**, 235 (2012).
12. Q. Zhang, H. Lu, N. Kawazoe, and G. Chen, *Acta Biomater.*, **10**, 2005 (2014).
13. J. Wang, Q. Yang, N. Cheng, X. Tao, Z. Zhang, X. Sun, and Q. Zhang, *Mater. Sci. Eng. C*, **61**, 705 (2016).
14. J. E. Song, A. R. Kim, C. J. Lee, N. Tripathy, K. H. Yoon, D. Lee, and G. Khang, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **26**, 181 (2015).
15. J. Y. Kang, C. W. Chung, J. H. Sung, B. S. Park, J. Y. Choi, S. J. Lee, B. C. Choi, C. K. Shim, S. J. Chung, and D. D. Kim, *Inter. J. Pharm.*, **369**, 114 (2009).
16. G. Khang, S. K. Lee, H. N. Kim, J. Silva-Correia, M. E. Gomes, C. A. Viegas, I. R. Dias, J. M. Oliveira, and R. L. Reis, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **9**, 265 (2015).
17. H. Park, H. Y. Kim, S. Y. Kwon, G. Khang, and Y. S. Kim, *Polym. Korea*, **39**, 144 (2015).
18. J. T. Oliveira, L. Martins, R. Picciochi, I. B. Malafaya, R. A. Sousa, N. M. Neves, J. F. Mano, and R. L. Reis, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **93A**, 852 (2010).
19. B. Balakrishnan, N. Joshi, A. Jayakrishnan, and R. Banerjee, *Acta Biomater.*, **10**, 3650 (2014).
20. S. W. Whu, K. C. Hung, K. H. Hsieh, C. H. Chen, C. L. Tsai, and S. H. Hsu, *Mater. Sci. Eng. C*, **33**, 2855 (2013).
21. V. M. de Oliveira Cardoso, B. S. F. Cury, R. C. Evangelista, and M. P. D. Gremião, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, **65**, 317 (2017).
22. F. Wang, Y. Wen, and T. C. Bai, *Mater. Sci. Eng. C*, **69**, 268 (2016).
23. D. F. Coutinho, S. V. Sant, H. Shin, J. T. Oliveira, M. E. Gomes, N. M. Neves, A. Khademhosseini, and R. L. Reis, *Biomaterials*, **31**, 7494 (2010).
24. L. H. Fan, H. Yang, J. Yang, M. Peng, and J. Hu, *Carbohydr. Polym.*, **146**, 427 (2016).