

헤스페리딘이 첨가된 젤란검 지지체에서 연골 재생 연구

전성현 · 이원택 · 송정은 · 박 현 · 최일남 · 김초민 · 강길선[†]

전북대학교 BIN융합공학과, 고분자나노공학과, 고분자융합소재연구소,
(2017년 1월 16일 접수, 2017년 3월 15일 수정, 2017년 3월 29일 채택)

Cartilage Regeneration Using Hesperidin-Containing Gellan Gum Scaffolds

Sung Hyun Jeon, Won Taek Lee, Jeong Eun Song, Hyun Park, 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 January 16, 2017; Revised March 15, 2017; Accepted March 29, 2017)

초록: 젤란검은 글루콘산, 람노오스, 포도당이 1:1:2로 구성된 헤테로 다당류로 생체적합성과 물리화학적 특성이 뛰어나 조직공학 분야에서 다양하게 응용되고 있으며, 최근 여러 가지 분야에서 각광받는 고분자로 인정받고 있다. 헤스페리딘은 콜라겐 재생과 항염증 효과의 작용이 있는데 본 실험은 헤스페리딘이 연골 재생에 미치는 영향을 관찰하기 위해 0.7% 젤란검 수용액에 헤스페리딘을 각각 0, 1, 2, 4 mg씩 첨가하여 하이드로젤 지지체를 제조하였으며, 물리적 특성평가를 위해 압축강도 및 FTIR를 측정하였으며, 연골재생을 평가하기 위해 MTT, Bio-SEM, 및 RT-PCR과 같은 실험을 평가하였다. 그 결과, 1 mg 헤스페리딘/젤란검 지지체가 연골 재생효과가 가장 우수하다는 것을 확인하였다. 따라서 연골재생을 위해 1 mg 헤스페리딘/젤란검 지지체의 다양한 응용 가능성을 확인할 수 있었다.

Abstract: Gellan gum is an FDA-approved heteropolysaccharide, composed of sodium gluconate, rhamnose, and glucose in molar ratios of 1:1:2. It has been widely utilized in tissue engineering because of its biocompatibility and outstanding physicochemical properties such as stability at high temperature transparency, and dynamic elastic modulus. In this study, we prepared 0.7% gellan gum hydrogel scaffolds with different amount (0, 1, 2, 4 mg) of hesperidin to incorporate collagen regeneration and anti-inflammatory effect for cartilage regeneration. The physicochemical and biological characteristics of the scaffolds were evaluated by compressive strength, FTIR, MTT, Bio-SEM, and RT-PCR. Interestingly, the gellan gum scaffold containing 1 mg hesperidin was found to be the most excellent scaffold for cartilage tissue regeneration in terms of compressive strength, cell differentiation, cell viability, and gene expression.

Keywords: cartilage regeneration, gellan gum, hesperidin, chondrocyte cells, hydrogel.

서 론

퇴행성 관절 질병인 골관절염은 연골 퇴보와 뼈 과성장의 특성을 나타낸다. 골관절염은 임상실습에서 보이는 가장 흔한 퇴행성 골절과 노인 장애의 주된 요인이다. 연골은 연골 세포와 연골조직으로 구성된 조직으로 충격을 흡수하여 관절을 보호하는 완충작용을 하고 관절면을 뒤덮는 초자연골의 관절연골인 윤활액이 들어있는 관절 주머니를 가지는 윤활관절은 뼈 사이의 마찰력을 줄여 움직임을 부드럽게 한다.¹ 이러한 관절을 보호하는 역할을 하고 있는 연골이 노화와 비만, 무리한 관절사용으로 마모되거나 퇴행성 변화로 인해 파

열되면 골관절염 질병의 원인이 된다. 골관절염은 관절 염증, 통증, 부기, 부종, 변형 등의 증상들이 나타나는데 이러한 골관절염 증상들은 환자 삶의 질을 저하시킨다. 하지만, 관절연골의 낮은 자가치유 능력 때문에 골관절염은 현재로서는 정확한 치료방법이 없어, 도전적인 질병 분야이다.^{2,4} 궁극적으로 골관절염의 치료는 환자의 통증을 줄이고 관절의 기능을 개선시키는데 목적이 있다. 하지만, 기존의 비스테로이드성 소염제인 진통해열제와 합성 진통 마취제들은 통증과 부종을 완화시키는 데는 효율적이지만 근본적인 문제인 연골의 손상을 막을 수 없고 장기적인 복용이 힘들며, 대부분 심각한 부작용을 동반한다.⁵ 이에 반해 재생치료법은 연골 재생을 증진시키고 최종적으로 건강한 조직을 복구하는 치료법으로 최근 조직 재생과 치료의 효율성이 증대함에 따라 골관절염 치료로 생체적합성 및 생분해성이 뛰어난 고분자를 이용한 재생치료법의 연구가 많은 관심을 받고 있다.⁶

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: gskhang@jbnu.ac.kr

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

이 중에 식품첨가물, 의약품, 화장품 등 다양한 분야에서 응용되고 있는 젤란검(gellan gum)은 생분해성 물질로 생체 주입에 적합하고 내열성, 내산성, 내효소성의 우수한 물성뿐만 아니라 친수콜로이드(hydrocolloid)로 신체에 주입 시 젤을 형성하여 손상된 부위를 축축하게 유지하고, 피사조직의 자연분해를 도와 생체조직공학에서의 응용이 광범위하다. 젤란검은 O-글리코시드(O-glycosidically)가 결합된 에스터(ester)로 아실기(acyl group)를 함유하고 있으며, 아실기의 함유량에 따라 하이아실젤란검(high acyl gellan gum), 로우아실젤란검(low acyl gellan gum)으로 나뉘어진다.⁷ 하이아실젤란검은 탄성, 신축성 및 유연성이 높으며, 로우아실젤란검은 기계적 강도는 높지만 잘 부서지는 특성을 갖는다.⁸⁻¹³ 젤란검 하이드로젤 지지체에 첨가하는 헤스페리딘은 비타민 P의 일종으로 콜라겐 생성을 돕고 항염증 작용, 노화에 관련된 질병에 효과가 있으며, 관절 및 연골에 영향을 준다고 알려져 있다.¹⁴

이에 본 연구에서는 로우아실젤란검에 함량별 헤스페리딘(hesperidin)을 첨가한 헤스페리딘/젤란검 하이드로젤 지지체를 제작하여, 지지체 특성평가 및 헤스페리딘의 함량 변화에 따른 젤란검 하이드로젤 지지체의 연골재생 효과를 알아보고자 하였다.

실 험

시약 및 재료. 로우아실젤란검(Gelzan™ CM; Sigma-aldrich, USA, 평균 분자량 1,000,000 g/mole, G1910), 헤스페리딘(≥80%, Sigma-aldrich, 평균 분자량 610.56 g/mole, G1910)을 사용하였고, 그외 모든 화학약품 및 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다.

하이드로젤 제조. 중탕시킨 90 °C의 3차 증류수에 젤란검을 용해시켜, 0.7%의 젤란검 수용액을 제조한다. 이때, 가교제인 0.03% 염화칼슘(CaCl₂)을 첨가하고 교반하였다. 0.7% 젤란검 수용액 50 mL에 0, 1, 2, 4 mg의 헤스페리딘을 각각 첨가하고, 교반한 뒤에, 페트리 디쉬에 넣어준다. 이를 상온에서 30분 동안 굳힌 후 직경 6.0 mm의 바이옵시 펀치(biopsy punch)를 사용하여 0, 1, 2, 4 mg 헤스페리딘/젤란검 하이드로젤 지지체(H/G, 직경 6.0 mm×높이 5.0 mm)를 제조하였다.

세포 배양. 연골 세포를 얻기 위해 생후 2주된 암컷 뉴질랜드 화이트 토끼(Hanil laboratory animal center, Korea)를 사용하였다. 토끼의 무릎 관절 사이에서 연골부위를 절개한 후 PBS(pH 7.4, Gibco, USA)로 여러 번 세척한 다음 연골세포를 긁어내었다. 긁어낸 연골세포는 코니컬 튜브에 넣고 1200 rpm, 4 °C에서 3분 동안 2번 원심분리하였다. 원심분리가 끝난 연골세포에 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM/F-12, Gibco), 10% 우태아혈청(FBS, Gibco) 그리고 1% 항생제(100 units/mL 페니실린과 100 µg/mL 스트렙토마이신)

을 혼합한 배양액 10 mL와 0.2 wt% 콜라게네이즈 A형(Roche, USA) 200 µL를 첨가하여 36 °C, 5% CO₂ 조건하의 인큐베이터 안에서 1일 동안 콜라겐을 분해하였다. 1일 후 1200 rpm, 4 °C에서 3분 동안 원심분리 후 피펫팅하여 세포 배양접시(cell culture dish)에 배양액과 함께 분주하였으며, 3일에 한번씩 배양액을 교체해주었다. 본 실험에서 사용된 세포는 Passage 2의 세포를 지지체당 1×10⁵ cell/scaffold로 파종하여 실험을 진행하였다.

하이드로젤 지지체 압축강도 측정. H/G의 압축강도를 측정하기 위해 실험실용 프레스(TMS-Pro, food technology corporation, sterling, USA)를 사용하였다. 이때 측정거리는 1 mm, 측정 속도는 2 mm/sec, 측정 힘은 0.5 N으로 설정하여, 압축강도를 측정하였다.

FTIR 분석. H/G의 결합구조 확인(작용기 확인)과 분광학적 성질을 관찰하기 위해 적외선 분광 광도계(FTIR, Spectrum GX, Perkin Elmer, USA)를 사용하여 4000~500 cm⁻¹ 파장에서 분석하였다.

SEM 분석. 주사전자현미경(SN-3000 Hitachi, Hitachi, Japan)을 사용하여 20 KV, x1.0 K 조건 하에서, 연골세포를 파종 후 2주 동안 배양한 H/G의 표면을 촬영하여 관찰하였다.

세포증식능 측정. 세포 부착과 세포 증식률을 발색 측정으로 관찰하기 위해 MTT(3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, Sigma-Aldrich) 분석을 실행하였다. 제조된 H/G에 연골세포(1×10⁵ cell/scaffold)를 파종하여 배양 1, 4, 7, 14 및 21일째에 MTT 용액(5 mg/mL stock in PBS)을 100 µL씩 넣고 4시간 동안 인큐베이터(37 °C, 5% CO₂)에 배양하였다. 3시간 후 H/G를 48 well plate에 옮겨 디메틸설폭사이드(DMSO, Sigma-Aldrich) 용액을 1 mL씩 넣어 각각 30번씩 피펫팅하였다. 그 후, 96 well plate에 시료를 각각 100 µL씩 분주하고 570 nm 흡광도에서 측정하였다.

유전자 발현도 확인. 연골세포의 특정 유전자 발현여부를 알아보기 위해 역전사 효소를 사용하여 RNA를 증폭시켜 RT-PCR 기기분석을 실행하였다. 세포 파종 후 7, 14 및 21일째에 회수된 H/G를 PBS 1X로 세척 후 300 µL의 RNAiso plus (Takara Bio Inc., Japan)을 첨가 후 피펫팅하여 1.5 mL의 EP 튜브에 옮겨 담고 180 µL 클로로포름(Sigma-Aldrich)을 첨가한 후 4°C, 12000 rpm에서 15분 동안 원심분리하였다. 분리된 RNA는 Oligo(dT)12-18 프라이머(Invitrogen™, 5× first strand buffer(Invitrogen™), dNTP (dGTP, dATP, dTTP, dCTP, Gibco), RNase inhibitor (Invitrogen™, Superscript™ RNase H 역전사트랜스크립타이스(Invitrogen™), DNase/RNase free water(Gibco)를 첨가하여 authorized thermal cycler (TP600, Takara Bio Inc.)를 통하여 cDNA로 역전사하였다. 역전사시킨 cDNA는 beta-actin, aggrecan, Collagen-I 및 Collagen-II를 신장시키기 위해, PCR을 수행하였다. PCR 과정 후 증폭된 cDNA를 1%(w/v) 아가로스겔에 전기영동을 한

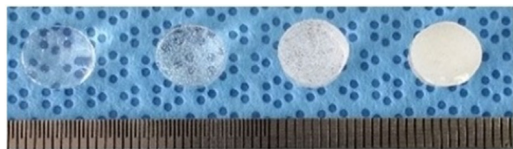
후, 상대적 발현을 SYBR 녹색형광(SYBR™ Green I Nucleic Acid Gel Stain, Cambrex, UK)에 의해 시각화하였으며, 300 nm 자외선 조사기로 사진촬영을 하여 Beta-actin, Aggrecan, Collagen-I 및 Collagen-II 밴드의 발현 정도를 관찰하였다.

통계학적 분석. Student's *t*-test를 시행하여 각 실험의 통계학적 분석을 하였고 *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.

결과 및 토론

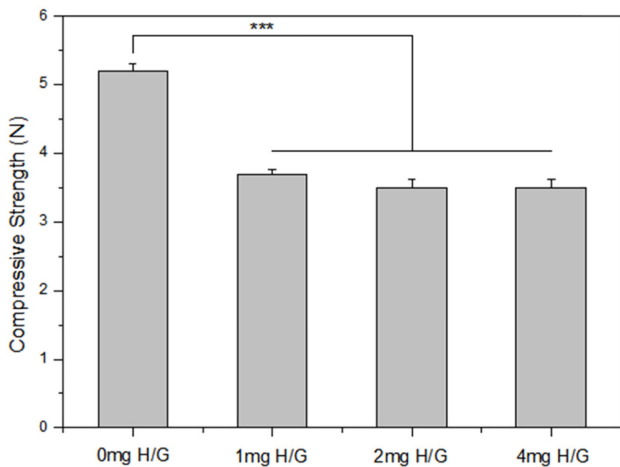
압축강도 분석. 제조한 H/G의 기계적 물성을 관찰하기 위해 압축강도를 실시하였다. Figure 1은 지지체의 육안 이미지와 압축강도를 나타내는 그래프이다. 1 mm/sec의 속도로 0.5 N의 압력을 가하여 압축시켰을 때 H/G의 균열파괴 시의 하중을 지지체의 단면적으로 나누었다. 그 결과 0 mg H/G에서 5 N 이상의 압축강도가 관찰되었으며, 1, 2 및 4 mg H/G에서는 헤스페리딘 함량이 증가할수록 압축강도가 점차 감소하는 경향성을 나타냈다. 압축강도 기기분석은 총 5번 반복 실험하여 데이터 값의 재현성을 높였다.

FTIR 분석. 특징적인 흡수 스펙트럼을 알아내어 지지체의



0mg H/G 1mg H/G 2mg H/G 4mg H/G

(a)



(b)

Figure 1. (a) Gross image; (b) compressive strength of 0, 1, 2, and 4 mg H/G scaffolds.

구조변화를 관찰하기 위해 FTIR을 이용하여 측정하였다. 분석 결과, 젤란검의 특이 피크인 C-O(1000~1100 cm^{-1}), 에스테르기(ester groups)의 C=O(1550~1650 cm^{-1}) 및 O-H(3300~3400 cm^{-1})의 특징적 피크를 관찰할 수 있었다(Figure 2).¹⁵⁻²⁰ 0 mg H/G에서 나타나는 피크가 1, 2 및 4 mg H/G에서도 공통적으로 나타나는 것을 확인할 수 있는데, 이는 젤란검 고유의 구조적 특성이 모든 군에서 유지되고 있다는 것을 알려준다. 특히, O-H기는 글리코스 아미노글리칸 분자의 구성성분으로써, 세포의 유동성을 높여 연골증식을 유도하기 때문에, 세포증식에 우수한 환경을 제공해줄 것으로 사료된다.

SEM 관찰. Figure 3은 세포 파종 후 2주 후에 각각 0, 1, 2, 4 mg의 H/G의 단면을 Bio-LV SEM으로 표면을 촬영하여

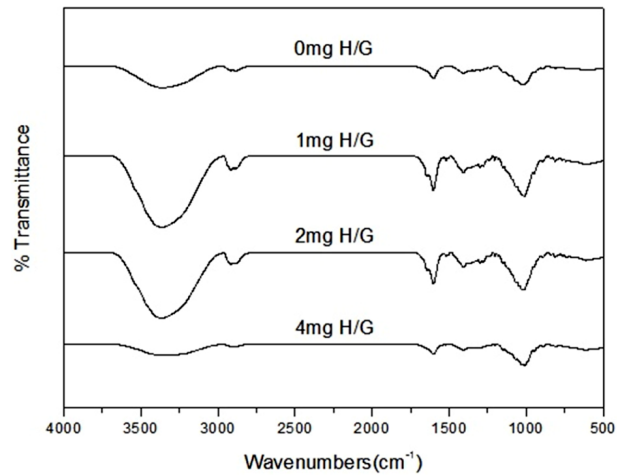
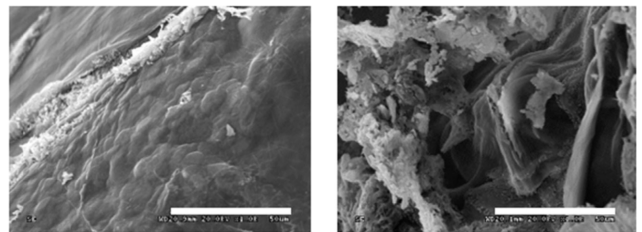
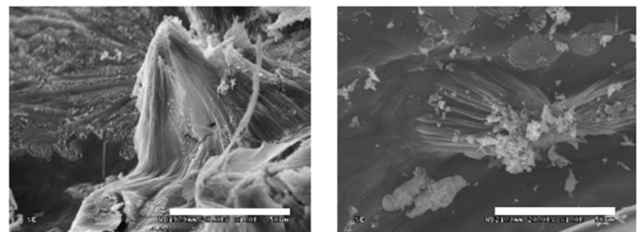


Figure 2. FTIR spectra of 0, 1, 2, and 4 mg H/G scaffolds.



(a) 0 mg H/G

(b) 1 mg H/G



(c) 2 mg H/G

(d) 4 mg H/G

Figure 3. Bio-LV SEM photomicrographs of 0, 1, 2, and 4 mg H/G scaffolds. (Magnification with 20.0 kv×1.0 k, scale bar=50 μm).

관찰한 것이다. 관찰 결과 대조군인 0 mg H/G에서는 세포증식 및 세포외기질(extracellular matrix)의 모습이 전반적으로 관찰되었고, 1, 2 및 4 mg의 H/G군 역시, 연골세포의 증식이 활발하게 이루어지고 있는 것을 관찰할 수 있었으며, 세포외기질이 응집되고 뺏어나간 것을 관찰할 수 있었다. 이는 헤스페리딘은 플라보노이드계 화합물의 일종으로써 세포내의 염증을 일으키는 단백질을 제거하고 세포벽을 튼튼하게 하는 기능이 있어 세포의 결합조직 형성과 기능 유지에 긍정적인 영향을 미치기 때문으로 사료된다.^{15,21-23}

MTT 분석. H/G에 1×10^5 개의 연골세포를 파종 후 배양하여 1, 4, 7, 14 및 21일에 연골세포 증식률을 관찰하기 위해 MTT 분석을 시행하였다. 실험 결과(Figure 4), 시간이 증가할수록 세포 증식률이 모든 군에서 증가하는 것을 확인하였다. 또한 모든 타임포인트에서 1 mg H/G에서 가장 우수한 세포 증식률을 보였고, 14일 및 21일째에는 2, 0, 4 mg H/G 순으로 증식률이 감소하였다. 특히, 4 mg H/G 군은 대조군인 0 mg H/G 보다 낮은 증식률을 보였는데, 이는 헤스페리딘 첨가는 연골세포 증식에 긍정적인 역할을 하지만, 일정량 이상의 용량이 초과하게 되면 오히려 연골세포 증식을 방해했기 때문이라고 사료된다.³⁻²⁵ MTT 분석은 총 3번 반복실험하여 데이터 값의 재현성을 높였다.

RT-PCR 분석. 연골세포 유전자 발현을 관찰하여 연골세포 증식과 확산 정도를 관찰하기 위해 H/G에 연골세포 파종 후, 1, 2, 및 3주째에 mRNA를 분리하고 역전사효소를 사용하여 상보적 DNA(cDNA)로 증폭시킨 후 연골기질의 주요 성분인 어그리칸(aggrecan), 연골조직의 세포간질 속에서 볼 수 있는 교원섬유(collagen fibers)를 구성하는 Collagen-I, 연골세포의 표지 분자인 Collagen-II 프라이머들을 사용하여 전기영동(electrophoresis)한 후 나타난 각각의 발현도를 확인하였다. 이들 발현도는 항존유전자(housekeeping gene)인 beta-

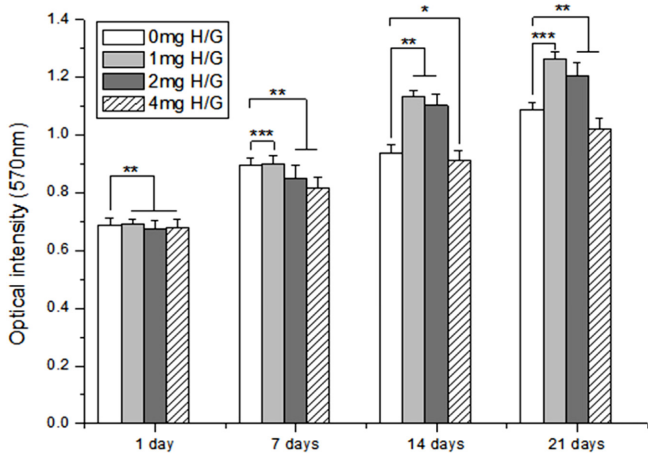


Figure 4. Cell viability of 0, 1, 2, and 4 mg H/G scaffolds was analyzed by MTT assay after 1, 7, 14 and 21 days post-seeding *in vitro*.

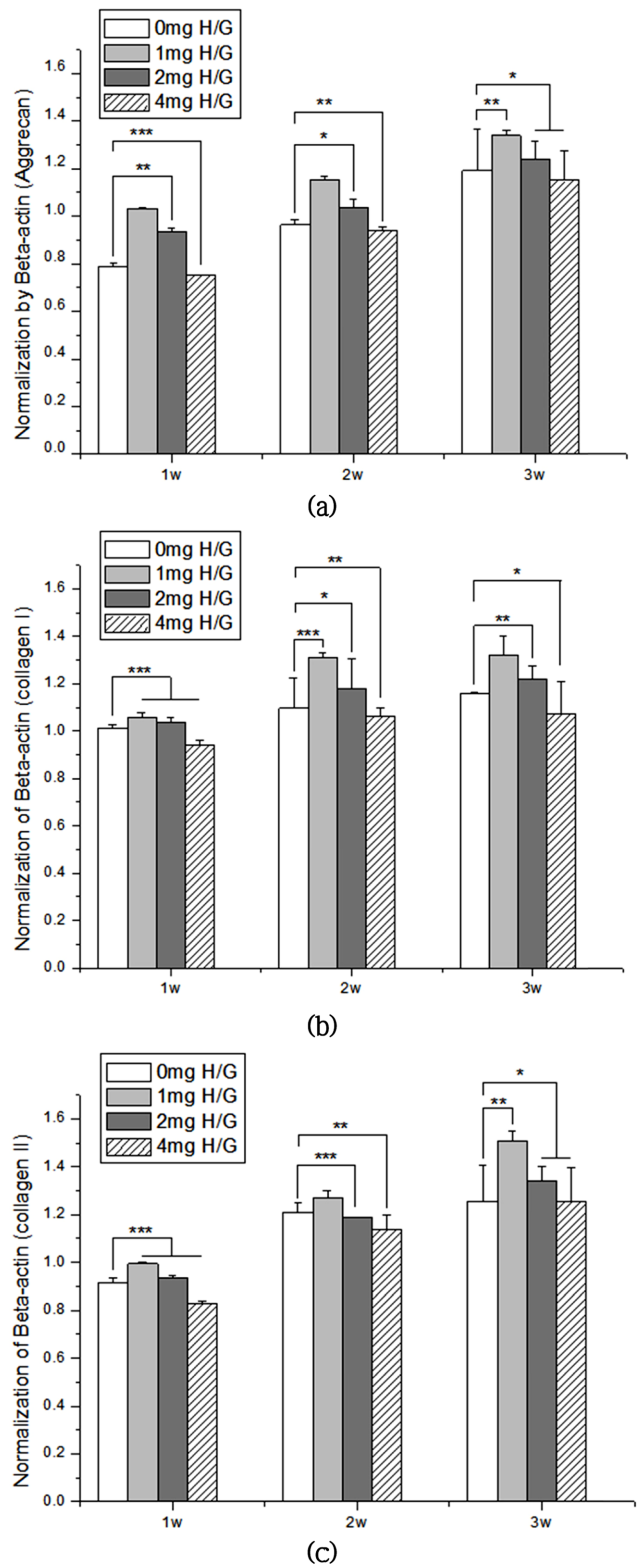


Figure 5. RT-PCR of the BMSCs on 0, 1, 2, and 4 mg H/G scaffolds was analyzed after 1, 2, and 3 weeks. Quantitative analysis of (a) aggrecan; (b) collagen I; (c) collagen II by normalization of beta-actin.

actin를 대조군으로 사용하여 normalization하였다(Figure 5).²⁵⁻³⁰ 그 결과 어그리칸, Collagen-I, II의 발현도가 1 mg H/G군에서 모두 가장 높게 나왔다. 이는 연골세포 증식분화의 하이드로젤 지지체로 1 mg의 H/G가 다른 H/G 보다 이상적인 연골세포 지지체임을 증명한다. Figure 5(a), (b), (c)에서 1, 2 mg H/G은 대조군인 0 mg H/G보다 발현도가 모두 높거나 비슷하게 관찰되었으나, 4 mg H/G는 대조군인 0 mg H/G과 발현도가 비슷하거나 더 낮았다. 이로써 헤스페리딘이 연골세포에 긍정적인 역할을 한다는 사실을 알 수 있지만 첨가한 양이 일정량 이상을 초과하게 되면, 오히려 연골세포 증식을 저해한다는 사실 또한 알 수 있다.³⁰⁻³⁴ 이는 MTT 분석 결과와 유사함을 보인다.

결 론

본 연구에서는 0, 1, 2, 4 mg의 H/G를 제작한 후, FTIR 분석을 통해 구조 분석한 결과 헤스페리딘 첨가한 후에도 젤란 겔의 고유 피크를 가져 구조가 변화하지 않은 것을 확인하였으며, Bio-LV SEM 분석을 통해, 각 H/G에서 연골세포 증식 및 세포외기질을 이미지로 확인하였다. 또한 MTT 분석을 통해 세포 증식률을 관찰하였고, RT-PCR을 통하여 연골세포 유전자 발현도를 측정하였다. 이 모든 *in vitro* 결과에서 1 mg H/G이 다른 군보다 뛰어난 세포증식과 세포외기질 분비하기 위한 우수한 환경을 제공한다는 것을 확인하였다. 따라서 일정량의 헤스페리딘은 연골재생에 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었으며, 연골조직 재생을 위한 지지체로 1 mg H/G가 다양하게 응용될 수 있을 것이라 사료된다.

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

참 고 문 헌

- A. H. Gomoll, A. Phan, M. Mastrocola, L. F. Ambra, and N. Shah, *Am J. Sports Med.*, **10**, 1117 (2016).
- S. Kumar, P. Kaur, M. Bernela, and R. Rani, *Int. J. Biol. Macromol.*, **93**, 988 (2016).
- S. W. Ng, *Inter. J. Tissue Regen.*, **4**, 29 (2013).
- S. R. Caliar, M. A. Ramirez, and B. A. C. Harely, *Biomaterials*, **32**, 8990 (2011).
- B. L. Farrugia, J. M. Whitelock, M. Jung, and B. McGrath, *Biomaterials*, **35**, 1462 (2014).
- J. S. Park, J. Y. Park, H. M. Kim, S. C. Oh, J. W. Yang, C. J. Lee, H. K. Jeong, and G. Khang, *Inter. J. Tissue Regen.*, **5**, 31 (2014).
- B. Balakrishnan, N. Joshi, A. Jayakrishnan, and R. Bangerjee, *Acta Biomater.*, **10**, 3650 (2014).
- S. Xu, L. Sang, Y. Zhang, X. Wang, and X. Li, *Mater. Sci. Eng. C*, **33**, 648 (2013).
- W. Lee, J. C. Debasitis, V. K. Lee, J. H. Lee, K. Fischer, K. Edminster, J. K. Park, and S. S. Yoo, *Mater. Sci. Eng. C*, **33**, 2855 (2013).
- F. Han, Y. Dong, Z. Su, R. Yin, A. H. Song, and S. M. Li, *Int. J. Pharm.*, **476**, 124 (2014).
- J. A. Gerstenhaber, R. Brodsky, R. B. Huneke, and P. I. Lelkes, *Wound Medicine*, **5**, 9 (2014).
- F. Wang, Y. Wen, and T. C. Bai, *Mat. Sci. Eng. C*, **69**, 268 (2016).
- E. Nakamachi, T. Noma, K. Nakahara, Y. Tomita, and Y. Morita, *Int. J. Numer. Method Biomed. Eng.*, **10**, 2864 (2017).
- S. A. Cho, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **25**, 625 (2014).
- J. Brinckmann, *Top. Curr. Chem.*, **247**, 1 (2005).
- R. M. Boehler, S. Shin, A. G. Fast, R. M. Gower, and L. D. Shea, *Biomaterials*, **34**, 5431 (2013).
- T. Natori, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, **10**, 1007 (2016).
- Y. Qian, L. Li, C. Jiang, W. Xu, Y. Lv, L. Zhong, K. Cai, and L. Yang, *Int. J. Biol. Macromol.*, **79**, 133 (2015).
- 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).
- B. M. Moon, D. K. Kim, H. J. Park, H. W. Ju, O. J. Lee, J. H. Kim, J. M. Lee, J. S. Lee, and C. H. Park, *Macromol. Res.*, **22**, 1268 (2014).
- S. R. Caliar, M. A. Ramirez, and B. A. C. Harely, *Biomaterials*, **32**, 8990 (2011).
- T. Song, J. Ma, L. Guo, and P. Yang, *J. Cell. Physiol.*, **10**, 1002 (2017).
- 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).
- K. S. Han, H. Ko, N. Jang, J. Song, and G. Khang, *Macromol. Res.*, **22**, 1253 (2014).
- D. Sakloetsakun, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **14**, 10 (2016).
- B. B. Mandal and S. C. Kundu, *Biomaterials*, **30**, 2956 (2009).
- B. K. Gu, M. S. Kim, S. J. Park, and C. H. Kim, *Inter. J. Tissue Regen.*, **2**, 83 (2011).
- S. Sahoo, S. L. Toh, and J. C. Goh, *Biomaterials*, **31**, 2990 (2010).
- M. Rutgers, D. B. Saris, L. A. Vonk, M. H. Van Rijen, and V. Akrum, *Tissue Eng. Part A*, **19**, 59 (2013).
- V. Perugini, A. L. Guildford, and J. Silva-Correia, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **10**, 1002 (2016).
- M. H. Mahdi and B. R. Conway, *Int. J. Pharm.*, **30**, 515 (2016).
- S. Mobini, B. Hoyer, M. Solati-Hashjin, A. Lode, N. Nosoudi, A. Samadikuchaksaraei, and M. Gelinsky, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **101**, 2392 (2013).
- G. Khang, *Inter. J. Tissue Regen.*, **9**, 265 (2015).
- H. W. Park, *Polym. Korea*, **39**, 1 (2015).