

조직공학적 바이오토크의 섬유륜 재생을 위한 지지체 특성평가

하현정 · 김순희 · 윤선중 · 박상욱 · 소정원 · 김문석* · 이종문 · 강길선[†] · 이해방*

전북대학교 고분자 BIN 융합 연구팀, *한국화학연구원 융합바이오연구센터

(2007년 8월 1일 접수, 2007년 10월 23일 채택)

Evaluation of Various Scaffolds for Tissue Engineered Biodisc Using Annulus Fibrosus Cells

Hyun Jung Ha, Soon Hee Kim, Sun Jung Yoon, Sang Wook Park,
Jung Won So, John M. Rhee, Moon Suk Kim*, Gilson Khang[†], and Hai Bang Lee*

BK-21 Polymer BIN Fusion Research Team, Chonbuk National University,
644-14, Dukjin, Jeonju 561-756, Korea

*Nanobiomaterials Lab, Korea Research Institute of Chemical Technology,
P.O.Box 107, Yuseong, Daejeon 305-600, Korea

(Received August 1, 2007; Accepted October 23, 2007)

초록 : 추간판 디스크의 섬유륜(AF) 조직 재생에 적합한 다양한 담체를 평가하기 위해 천연재료인 소장점막하조직(SIS)과 탈미네랄화된 골분(DBP)을 폴리(락타이드-글리콜라이드) 공중합체(PLGA)와 혼합하여 담체(PLGA/SIS, PLGA/DBP, PLGA/SIS/DBP)를 제조하였으며, PLGA담체, PGA 메쉬, SIS스폰지와 비교하였다. 제조된 담체의 압축강도 및 AF세포를 담체에 파종하여 콜라겐 양과 DNA량을 측정하였으며, 이를 누드마우스 피하에 이식 후 적출하여 육안관찰과 조직학적인 평가를 수행하였다. 압축강도 측정에서 PLGA와 유사하게 PLGA/SIS, PLGA/DBP 에서도 충분한 강도를 나타내었다. DNA 증가량에 따른 콜라겐 양은 PLGA/SIS 에서 가장 높게 나타났고, 면역화학 염색을 통해 PLGA/SIS, PLGA/SIS/DBP 에서 글라이코사미노글라이칸과 콜라겐 발현량이 높음을 확인하였다.

Abstract : This study was designed to investigate the effect of hybridization of synthetic/natural materials for annulus fibrosus (AF) tissue regeneration *in vitro* and *in vivo*. The synthetic/natural hybrid scaffolds were prepared using PLGA (poly (lactic-co-glycolic) acid), SIS (small intestinal submucosa) and DBP (demineralized bone particles). PLGA, PLGA/SIS(20%), PLGA/DBP(20%) and PLGA/SIS(10%)/DBP(10%) scaffold were manufactured by solvent casting/salt leaching method. Compressive strength was measured. Rabbit AF cells were isolated, cultured and seeded into experimental groups. Hydroxyproline production and DNA quantity of AF cells on each scaffold was measured at 2, 4 and 6 weeks after *in vitro* culture. Cell-scaffold composites were implanted subcutaneously into athymic mice. After 1, 4 and 6 weeks postoperatively, specimens were taken and H&E, Safranin-O and type I collagen staining were carried out concerning formation of cartilagenous tissue. *In vitro* PLGA/SIS scaffold was evaluated for total collagen content(hydroxyproline/DNA content) and PLGA scaffold was evaluated for compressive strength.

Keywords : intervertebral disc regeneration, tissue engineering, natural-synthetic hybrid materials, annulus fibrosus cell, small intestinal submucosa.

서 론

요통은 매우 흔한 증상으로 약 80%의 사람이 일생 동안 한번이라도 요통을 경험하게 된다고 알려져 있는데 이 중 약 5%의 환자는 만성적인 요통에 시달리게 된다. 만성적인 요통은 여러 가지 원인에 의해서 발생할 수 있으며 추간판(IVD)에 의해 발생하는 경우는 약

40%로 요통의 주된 원인으로 알려져 있다.¹⁻⁴ 대부분의 환자는 진통제 및 물리치료 등 보존적인 요법에 의해 호전되지만 이러한 노력에도 호전되지 않고 계속 증상이 지속되거나 악화되는 환자에 대해서는 수술적인 요법이 고려되고 있다. 수술적 요법에는 추간판 절제술, 척추 융합술 및 추간판 치환술 등이 있으나 퇴행성 변화가 심하여 골융합술을 시행하는 경우 주위 분절의 퇴행성 변화를 가중시킬 뿐 아니라 수술로 인한 합병증의 가능성도 높은 것이 사실이다. 이들의 한계를 극복하기 위하여 조직공학적 추간판 재생에 대한 연구가 시작되었다.⁵ 생체조직공학이란 생체에서 완전히 흡수되고 세포와 친

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

화력이 있는 생분해성 고분자 지지체와 세포를 체내에 이식함으로써 새로운 실질적인 조직을 형성하게 하는 일련의 기법이다.

추간관 재생을 위한 지지체의 재료로는 폴리글리콜산(PGA), 폴리락트산(PLA), 그리고 이들의 락타이드 글리콜라이드 공중합체(PLGA)와 같은 α -hydroxy acid 류가 쓰이는데 이들은 미국식품의약품안전국에 의해 임상용으로 승인된 유일한 합성 고분자이며, 생체 내에서 분해되는 물질로서 뛰어난 생체적합성을 가지며 분해속도를 조절할 수 있는 장점을 가지기 때문에 생분해성 다공성 지지체로 사용된다. 그러나 PLGA가 조직공학적인 추간관 제조에 이용되기 위해서는 PLGA에 새로운 기능이 좀 더 부여되어야 한다. PLGA의 소수성은 세포, 조직, 그리고 혈액 적합성에 좋지 않은 영향을 끼치게 되며 PLGA 자체만으로는 특정세포를 원하는 조직으로 분화시킬 수 없다. 따라서 이러한 PLGA에 친수성을 가지고 신경성장인자, 변환성장인자 등과 같은 사이토카인을 함유하고 있는 천연재료를 적용함으로써 세포의 증식과 분화를 유도하고 조직합성을 증가시킬 수 있다.⁶⁻⁸

이러한 세포 적합성 및 조직 적합성을 개선할 생체재료로서 돼지 유래 소장 점막하 조직(small intestinal submucosa, SIS)은 다량의 신생혈관 성장을 지원하고 근육적 구조체, 피부, 인체벽, 뇌경막, 방광, 그리고 혈관을 포함하는 여러 신체조직의 구조적 재형성을 위한 담체로 유용하며 파이프로텍틴, 헤파린, 콜라겐(I, III, IV, V, 및 VI형), 섬유아세포 성장인자(bFGF)와 혈관내피세포 성장인자(VEGF)를 포함하는 세포외기질로 구성되어 있다.^{9,10} 천연유래 생체활성물질인 탈미네랄화된 골분(demineralized bone particle, DBP)은 새로운 뼈의 성장에 강력한 유도체로 작용한다. DBP는 뼈형성 단백질(BMP)과 같은 골 및 연골형성 사이토카인을 함유하고 있으며 골 결손 부위에 충전제로서 임상적으로 널리 사용되고 있다.

본 연구에서는 조직공학적인 방법으로 조직 적합성을 향상시킬 수 있도록 상기의 생체재료가 포함된 PLGA/SIS, PLGA/DBP, PLGA/SIS/DBP, SIS 스폰지 및 PGA 부직포에 토끼의 AF3 세포를 이식하였으며 지지체에 대한 평가는 *in vitro*에서 생화학적 평가와 기계적 물성평가를 실시하였고, *in vivo*에서 조직학적 평가를 실시하여 제조된 지지체 내에서 디스크 AF 조직의 재생 가능성을 평가하였다.^{11,12}

실 험

시약 및 재료. PLGA(락타이드/글리콜라이드 몰비, 75/25, Resomer RG 756, Boehringer Ingelheim Chem. Co. Ltd., Germany)는 평균분자량이 90000 g/mole인 것을 사용하였다. 또한 염화나트륨(NaCl, Orient Chem. Co. Ltd., Korea)은 다공 생성 물질로 사용하였는데, 분자체를 사용하여 입자 크기를 180~250 μm 으로 조절하였다. DBP는 Urist 방법, SIS는 Badylak 방법으로 분리하였으며 동결건조 후 동결분쇄기(Metuchen, USA)를 이용하여 입자의 크기가 180 μm 이하가 되도록 동결 분쇄하였다.^{13,14} 메틸렌클로라이드(MC, Tedia Co. Inc., USA) 및 이외의 모든 유기 용매류는 HPLC 등급을 사용하였다. PGA는 밀도 53.3 mg/cc, 두께 3.1 mm의 상용화된 제품(Albany International Research Co., NY, USA)을 구입하여 가로 5 mm, 세로 5 mm의 부직포로 잘라서 사용하였다.

용매캐스팅/염추출법을 이용한 지지체의 제조. 본 실험에 사용한

Table 1. Various Scaffolds by means of the Solvent Casting/Salt Leaching

Scaffolds	Size of NaCl	Volume of PLGA to NaCl (w/w)	Content of SIS (wt%)	Content of DBP(wt%)
PL	180~250 μm	10	-	-
PS		10	20	-
PD		10	-	20
PDS		10	10	10

천연/합성 하이브리드 담체는 용매 캐스팅/염 추출법을 이용하여 제조하였다.¹⁵ 이를 간단히 설명하면 1 g의 PLGA를 4 mL의 MC에 용해하고 실험에 사용한 생체재료인 SIS 및 DBP는 각 실험군마다 PLGA 양의 20 wt%가 되도록 첨가하여 혼합용액을 제조하였으며 여기에 다공형성 물질인 NaCl을 PLGA의 10배가 되는 양을 첨가하였다(Table 1). 직경 5 mm, 높이 5 mm 크기의 실리콘 몰드에 넣은 후 프레스를 이용하여 상온에서 60 kgf/cm²의 압력으로 24 시간 동안 가압하였다. 제조된 지지체는 3차 증류수에서 48시간 동안 6시간마다 교체함으로써 NaCl을 추출하였으며 8 mm Torr, -80 °C 조건에서 48시간 동안 동결 건조하였다. 여기서 SIS가 함유된 PLGA 지지체를 PLGA/SIS, DBP가 함유된 것을 PLGA/DBP 그리고 SIS와 DBP가 함유된 것을 PLGA/SIS/DBP로 명칭하였다.

기계적 강도 측정. 지지체의 압축강도를 측정하기 위하여 universal testing machine(Instron, model 8872, Darmstadt, Germany)을 사용하였다. 압축강도는 0.5 mm/min의 속도로 측정하였다.^{16,17}

섬유를 세포의 분리 및 배양. 초대배양 AF 세포는 생후 6주된 뉴질랜드 화이트 토끼의 L1~L5 척추마디로부터 분리하였다. 무균술식을 통하여 추간관으로부터 NP(수핵) 조직과 AF(수륜) 조직을 따로 분리하였다. 분리한 AF 조직은 인산완충식염수로 수회 세척하였고, 이를 0.25 wt%의 콜라게네이즈 A(Roche, Indianapolis, USA)로 6시간 인큐베이션 하였다. 콜라게네이즈를 처리한 조직은 100 μm 메쉬(Falcon, USA)를 이용하여 거르고, 이를 Ham's F12(Gibco BRL USA) 45%, Dulbecco's Modified Eagles Medium(Gibco BRL) 45%, FBS(Gibco BRL) 10% 및 페니실린-스트렙토마이신 1%(Gibco BRL)이 함유된 배양액으로 현탁액을 만든 후 세포배양 플라스크에 분주하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 이때 2 일에 한 번 새로운 배양액으로 교체시켜 주었다. AF 세포를 계대 배양 3회째까지 실시하여 충분한 세포수를 확보하였다.

생화학적 분석. *In vitro* 상에서 AF 세포가 파종된 여섯가지 지지체의 히드록시프로틴의 농도와 DNA의 양을 측정하기 위해서 AF3 세포를 2×10⁵ 세포/지지체 농도로 분주하였고 이들에 한번씩 새로운 배양액으로 교체하였다. 히드록시프로틴의 농도를 측정하기 위하여 2주, 4주 및 6주 후에 지지체를 획득하여 4N HCl을 400 μL 를 넣고 120 °C로 가열하여 수화시킨 후 최종농도가 4 N이 되도록 동량의 수산화나트륨을 넣고 120 °C로 반응시켰다. Chloraminet T Reagent(Sigma) 400 μL 를 첨가하고 25분 동안 방치시킨 후 Enrich's reagent(Sigma)를 500 μL 씩 튜브에 넣고 65 °C 오븐에서 20분 동안 반응시켰다. 그 후, 96 웰에 반응액을 100 μL 씩 넣고,

Emax precision 마이크로플레이트리더(Molecular Devices)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포를 파종한 뒤 2주째에 지지체를 채취해 DNA의 양을 측정하기 위하여 axyprep™ multisource genomic DNA miniprep kit(Axygen Scientific, Inc. Union, USA)로 DNA를 분리하였고 spectrophotometer(Biorad USA)로 정량하였다.

육안 관찰. 생후 4주된 면역결핍 쥐(BALB/c-nu mice, female, Jung-Ang Lab. Animal. Co., Korea)의 등쪽 부분을 2~3 cm 절개하고 AF3 세포를 2×10^5 세포/지지체 농도로 파종시킨 지지체를 이식하였다. 이식 후 1, 4 및 6주 후에 지지체를 적출하여 지지체의 형태를 관찰하였다(Canon Powershot G6, Japan).

조직학적 분석. *In vivo*에서 조직 공학적 바이오 디스크로서의 가능성을 관찰하기 위하여 면역결핍 쥐를 이용하여 실험하였다. 이식한 지 1주 및 4주 후에 각각의 다양한 지지체를 적출하여 10%의 포르말린에 고정하였으며, 고정된 지지체를 파라핀 블록으로 제작한 후 4 μ m로 잘라 코팅된 슬라이드에 부착하여 H&E, Safranin-O, Masson's trichrome 염색과 제 I형 교원질의 확인을 위한 면역조직화학적염색을 시행하였다. 현미경 사진(Nikon TE-2000, Japan)은 150배에서 촬영하였다.¹⁸⁻²⁰

통계적 분석. 각 실험군 들의 평균값과 표준편차를 확인하였으며, 통계학적인 분석은 Student's *t*-test를 수행하였다. 결과 값이 $P < 0.05$ 일 때 충분한 유의성을 갖는 것을 기준으로 하였다.

결과 및 토론

제조된 지지체의 기계적 강도 측정. AF 재생을 위한 생분해성 고분자와 천연 재료로 제조된 지지체에 대한 기계적 물성평가를 위하여 압축강도를 측정하였다. 여타의 재료가 포함되지 않은 PLGA 지지체의 압축강도는 4.3 ± 0.84 MPa로써 가장 높은 강도를 보였으며, PLGA/SIS의 압축강도는 3.23 ± 0.92 MPa, PLGA/DBP의 압축강도는 3.7 ± 1.21 MPa, PLGA/SIS/DBP의 압축강도는 2.8 ± 0.04 MPa, SIS 스폰지의 압축강도는 0.09 ± 0.01 MPa 그리고 PGA 부직포의 압축강도는 0.08 ± 0.03 MPa이었다(Figure 1).

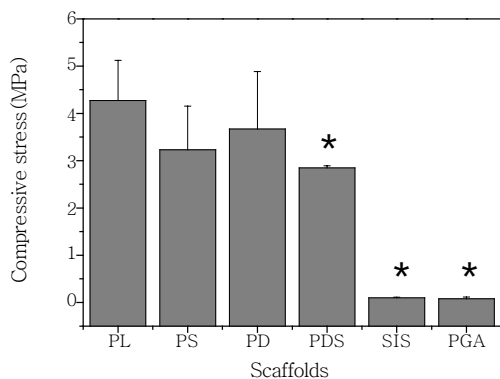


Figure 1. Compressive stress of various type scaffolds *in vitro* (PL; PLGA, PS; PLGA/SIS, PD; PLGA/DBP PDS; PLGA/DBP/SIS, SIS; SIS sponge, PGA; PGA nonwoven mesh, * denotes significant difference with compared with PL, * $P < 0.05$).

AF 조직은 추간판에서 NP 조직을 둘러싸고 있는 구조로 자세에 따라 변하는 추간판 내의 압력을 유지시켜주는 역할을 하게 된다. 사람이 20 kg 무게의 물건을 들어 올릴 때 척추는 물건을 들어 올리는 사람 체중의 약 300%의 압력을 받게 된다. AF 조직의 섬유질은 NP 조직 안의 유체에 의해 발생하는 압력을 지탱하는 것과 동시에 상당한 양의 압축응력을 전달한다.²¹ 본 실험에서 SIS 스폰지와 합성 PGA 부직포 지지체의 강도는 PLGA, PLGA/SIS, PLGA/DBP 그리고 PLGA/SIS/DBP 지지체에 비해 상당히 낮은 결과를 보였으며, PLGA 지지체와 SIS 또는 DBP를 함유한 PLGA 지지체 사이에 통계적으로 유의한 압축강도의 차이는 없었다. 본 실험에서 사용한 SIS 또는 DBP 등의 천연재료를 함유한 PLGA 지지체는 PLGA가 부여하는 압축강도와 천연재료가 부여하는 생체활성도를 동시에 나타내어 여타의 담체보다 바이오디스크로 적합하다고 사료된다.

생화학적 분석. 각각의 지지체에 AF 세포를 파종하고 *in vitro*에서 2주, 4주 및 6주간 배양 후 콜라겐 합성 시에 생성되는 히드록시프롤린의 양을 측정한 결과 PLGA 지지체, PGA 부직포에 비하여 PLGA/SIS, PLGA/DBP, PLGA/SIS/DBP 지지체 및 SIS 스폰지에서 AF 세포의 히드록시프롤린 합성량이 전 기간에 걸쳐 높게 관찰되었다(Figure 2(a)). 또 배양 6주 후 각각의 지지체의 DNA량을 측정한 결과 DNA 합성량은 PLGA/SIS/DBP (2.75 μ m/mL),

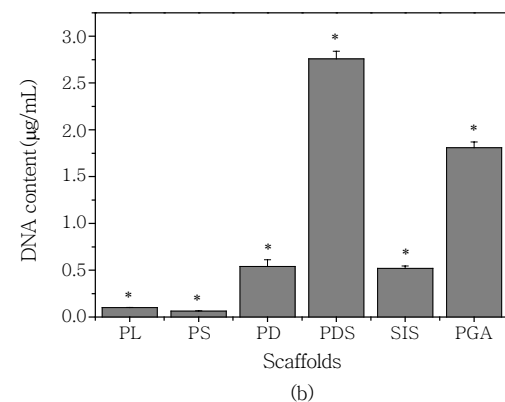
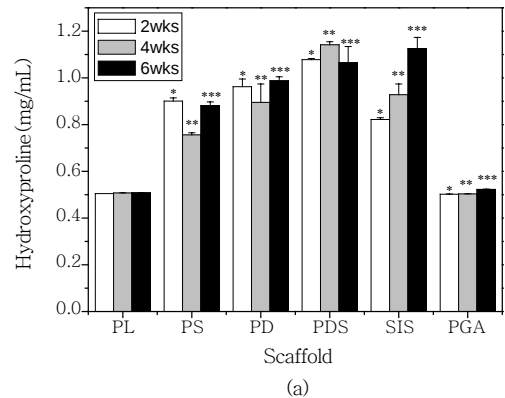


Figure 2. (A) Hydroxyproline concentration of various types of scaffolds after 2, 3 and 4 weeks *in vitro*. (B) DNA quantification of various types of scaffolds after 2 weeks *in vitro* (*denotes significant difference with compared with PL, *, **, *** $P < 0.05$).

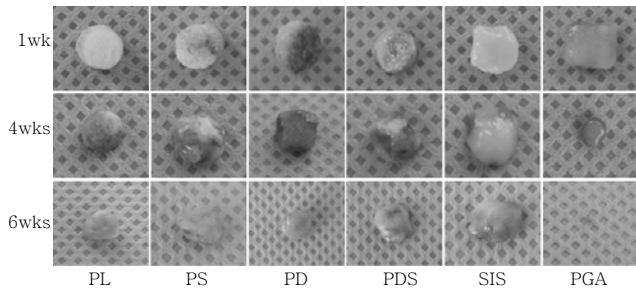


Figure 3. Gross observation of various scaffold *in vivo*.

PGA (1.85 $\mu\text{m/mL}$), PLGA/DBP (0.59 $\mu\text{m/mL}$), SIS (0.53 $\mu\text{m/mL}$), PLGA (0.10 $\mu\text{m/mL}$) 그리고 PLGA/SIS (0.06 $\mu\text{m/mL}$) 순이었다 (Figure 2(b)). 세포의 증식률이 증가함에 따라서 DNA의 합성량이 증가한다.¹⁸ 세포의 증식률을 측정하는 MTT 분석 결과에서 지지체에 따른 AF 세포의 증식률의 정도는 6주에 PLGA/SIS/DBP 지지체에서 가장 높았다(data not shown). 1개의 DNA에서 합성되는 히드록시프로린의 양을 측정한 결과에서는 PLGA/SIS/DBP 지지체에서 가장 높았다. 이는 SIS 또는 DBP가 부여하는 생체활성물질이 지지체 안에서 AF 세포의 증식과 콜라겐의 합성에 도움을 준다고 사료된다.

생체 내 이식된 세포-지지체 복합체의 육안 관찰. AF 세포를 파종한 PLGA, PLGA/SIS, PLGA/DBP, PLGA/SIS/DBP 지지체, SIS 스폰지 및 PGA 부직포가 생체 내에서 어떠한 형태 변화를 일으키는 지 알아보기 위해 이식 후 1주, 4주 및 6주 후에 세포-지지체 복합체를 적출하여 육안으로 관찰하였다(Figure 3). 1주에서는 모든 지지체가 원래의 크기와 형태를 유지하였으나 PGA 부직포는 시간이 지남에 따라 급격한 부피의 손실을 나타내었다. 이에 비해 PLGA, PLGA/SIS, PLGA/DBP 및 PLGA/SIS/DBP는 관찰 6주까지도 형태 및 모양에 큰 변화가 관찰되지 않았다. 천연재료로만 이루어진 SIS 스폰지 역시 형태 및 크기가 유지되었다. 생체조직공학적 지지체는 완전하게 조직이 재생될 때까지 세포외기질을 합성할 수 있는 공간을 세포에게 제공하고 안정된 속도로 생분해되어야 한다.²² 따라서 빠른 분해속도를 보이는 PGA 부직포의 경우 AF 세포에 의해 조직형성의 시간을 제공하지 못하기 때문에 AF 조직 재생을 위한 지지체로서 적합하지 않다고 사료된다.

조직학적 분석. 본 실험에서 사용한 지지체의 생체 내에서 AF 조직재생 가능성을 평가하기 위하여 AF 세포가 분주된 지지체를 누드 마우스의 피하에 이식한 후 1주 및 4주 후에 적출하였다. 실제 디스크의 주요 구성 성분이 지지체-세포 복합체에서 생성되고 있는지를 조직학적 염색을 통해 확인하였다(Figure 4). 글라이코사미노글라이칸 합성정도를 Safranin-O 염색을 통하여 관찰한 결과 PLGA, PLGA/SIS, PLGA/SIS/DBP 지지체 및 PGA 부직포에서 Safranin-O에 의해 붉은색으로 염색된 부분이 넓게 관찰되었으며 SIS 스폰지에서는 관찰되지 않았다. Masson's trichrome 염색을 통하여 콜라겐의 합성정도를 측정한 결과 PLGA/SIS, PLGA/SIS/DBP 지지체에서 푸른색으로 염색된 콜라겐 부분을 관찰할 수 있었다. PLGA, SIS 스폰지, PGA 부직포에서는 관찰되지 않았다. 제 I 교원질 염색을 통하여 교원질의 증가정도를 관찰한 결과 PLGA/SIS, PLGA/SIS/DBP 지지체에서 PLGA, PLGA/DBP,

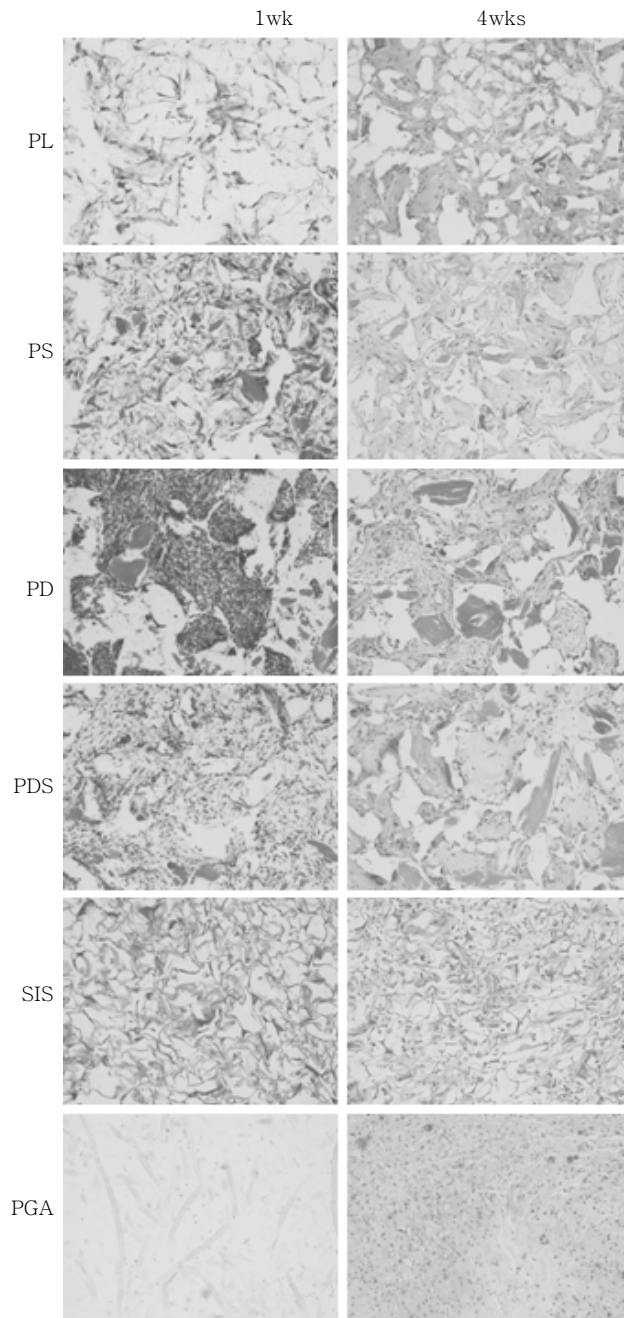


Figure 4. Photomicrographs from H&E histological sections of annulus fibrosus cell seeded various type of scaffolds implanted on the back of nude mice after 1 week and 4 weeks *in vivo*.

SIS 스폰지, PGA 부직포에 비하여 교원질의 증가가 관찰되었다(Figure 5). 또한 *in vitro*에서 히드록시프로린의 양이 PLGA/SIS 지지체에서 가장 높게 형성되었다. 생체 내에 이식하였을 때 SIS 스폰지 형태의 지지체는 SIS가 가지는 충분한 생체활성도를 나타내지 못하였다. 이는 PLGA가 부여하는 압축강도를 SIS 스폰지가 가지지 못하기 때문으로 사료되고 SIS, DBP의 생체활성도에 PLGA의 강도를 가진 PLGA/SIS 또는 PLGA/SIS/DBP 지지체가 AF 조직재생에 적합한 지지체라고 사료된다.^{23,24}

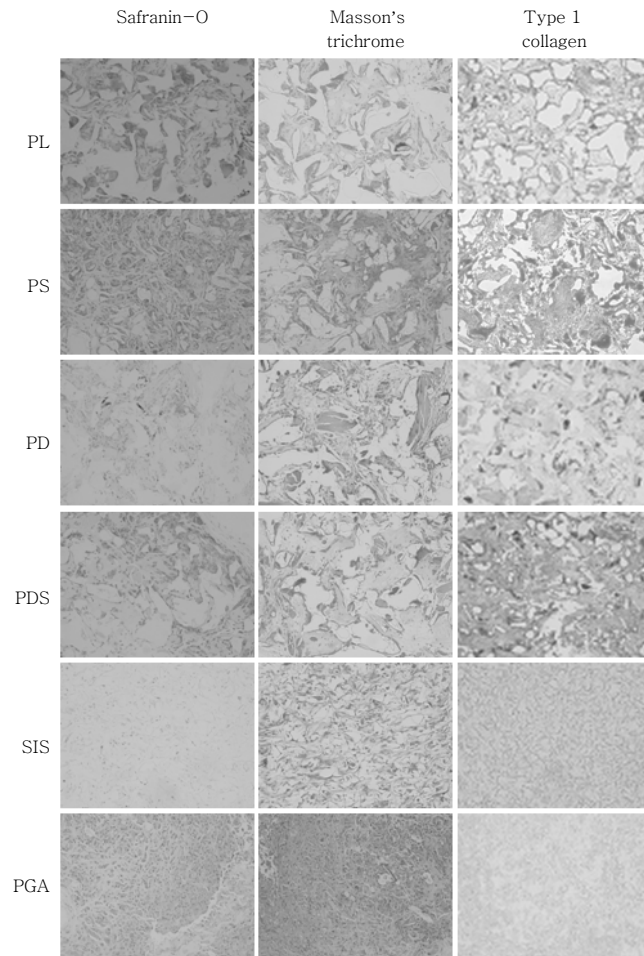


Figure 5. Photomicrographs from Safranin-O, Masson's trichrome and Type I collagen immunohistochemical staining sections of annulus fibrosus cells seeded various types of scaffolds implanted on the back of nude mice after 4 weeks *in vivo*.

결 론

본 연구에서는 생분해성 고분자인 PLGA와 천연재료인 SIS, DBP를 포함한 천연/합성 하이브리드 담체를 제조하여 AF 재생에 적합성을 평가하였다. AF 재생을 위한 바이오 디스크로서 천연재료가 생화학적 조직학적 특징을 증가시키지만 천연재료로만 이루어진 지지체의 경우에는 충분한 압축강도를 가지지 못하여 실제 디스크에 이식하였을 경우에 디스크에 가해지는 압력을 견딜 수 없기 때문에 생화학적 조직학적 특성을 유지하기가 어렵다. 따라서 천연재료의 생체적합성과 PLGA의 압축강도를 가진 천연/합성 하이브리드 담체인 PLGA/SIS, PLGA/SIS/DBP가 AF 조직 재생에 가장 적합한 지지체라 사료되며 현재 디스크의 NP 조직 재생에 적합한 지지체에 대한 평가를 진행중에 있다.

감사의 글 : 본 연구는 세포융용사업단 (SC3100) 지원으로 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. E. J. Carragee and M. Hannibal, *Orthop. Clin. North. Am.*, **35**, 7 (2004).
2. G. Khang, E. J. Kim, S. H. Kim, K. S. Park, C. H. Whan, Y. S. Yang, M. S. Kim, and H. B. Lee, *Tissue. Eng. Regen. Med.*, **2**, 20 (2005).
3. G. Khang, M. S. Kim, B. H. Min, I. W. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue. Eng. Regen. Med.*, **4**, 376 (2006).
4. H. Mizuno, A. K. Roy, C. A. Vacanti, K. Kojima, M. Ueda, and L. J. Bonassar, *Spine*, **29**, 1290 (2004).
5. C. A. Seguin, M. D. Gryn timer, R. M. Pillar, S. D. Walden, and R. A. Kandal, *Spine*, **29**, 1299 (2004).
6. G. Khang, C. S. Park, J. M. Rhee, S. J. Lee, Y. M. Lee, M. K. Choi, and H. B. Lee, *Macromol. Res.*, **9**, 267 (2001).
7. S. J. Lee, G. Khang, Y. M. Lee, and H. B. Lee, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **13**, 197 (2002).
8. E. K. Jeon, G. Khang, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer (Korea)*, **25**, 893 (2001).
9. S. F. Badylak, R. Record, and K. Lindberg, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **9**, 863 (1998).
10. G. Khang, J. M. Lee, P. K. Shin, I. Y. Kim, B. Lee, I. W. Lee, and H. B. Lee, *Macromol. Res.*, **10**, 158 (2002).
11. 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).
12. S. Y. Chuang, R. M. Odone, and T. P. Hedman, *Clinical Biomech.*, **22**, 14 (2007).
13. M. R. Urist, *Science*, **150**, 893 (1965).
14. S. L. Voytik-Harvin, A. O. Brightman, M. R. Kraine, B. Wasiner, and S. F. Badylak, *J. Cell. Biochem.*, **67**, 478 (1997).
15. J. W. Jang, B. Lee, S. H. Kim, C. W. Han, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer (Korea)*, **28**, 382 (2004).
16. H. Mizuno, A. K. Roy, V. Zaporozhan, C. A. Vancanti, M. Ueda, and L. J. Bonassar, *Biomaterials*, **27**, 362 (2006).
17. C. A. Niosi and T. R. Oxland, *Spine*, **4**, 202S (2004).
18. Y. Sun, M. Hurtig, R. M. Pilliar, M. Gryn timer, and R. A. Kandel, *Orthopaedic Res.*, **19**, 1078 (2001).
19. H. J. Ha, S. H. Kim, S. J. Yoon, Y. K. Ko, E. K. Lee, Y. S. Son, M. S. Kim, J. M. Rhee, G. Khang, and H. B. Lee, *Tissue. Eng. Regen. Med.*, **3**, 416 (2006).
20. S. H. Kim, S. J. Yoon, J. W. Jang, M. S. Kim, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer (Korea)*, **30**, 14 (2006).
21. K. S. Park, C. M. Jean, S. J. Yoon, K. D. Hong, S. H. Kim, M. S. Kim, J. M. Rhee, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer (Korea)*, **29**, 501 (2005).
22. L. E. Freed, J. C. Marquis, A. Nohria, J. Emmanuel, A. G. Mikos, and F. Langer, *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**, 11 (1993).
23. B. S. Choi, S. H. Kim, S. J. Yoon, H. J. Ha, M. S. Kim, Y. I. Yang, Y. S. Son, J. M. Rhee, H. B. Lee, and G. Khang, *Tissue. Eng. Regen. Med.*, **3**, 295 (2006).
24. K. S. Kim, M. H. Cho, H. H. Ahn, S. B. Song, S. J. Seo, M. S. Kim, B. Lee, G. Khang, and H. B. Lee, *Tissue. Eng. Regen. Med.*, **4**, 168 (2007).