

천연 항균물질 루틴을 함유하는 PHBV 나노섬유의 제조 및 생체적합성

채원표 · 신정차이 · 김영진* · 상희선** · 허만우*** · 강인규†

경북대학교 고분자공학과, *대구가톨릭대학교 의공학과,

경일대학교 소방방재학부, *경일대학교 섬유패션학과

(2010년 10월 25일 접수, 2010년 11월 29일 수정, 2010년 12월 23일 채택)

Fabrication and Biocompatibility of Rutin-containing PHBV Nanofibrous Scaffolds

Won-Pyo Chae, Zhi-Cai Xing, Yong-Jin Kim*,
Hie-Sun Sang**, Man-Woo Huh***, and Inn-Kyu Kang†

Department of Polymer Science & Engineering, Kyungpook National University, Daegu 702–701, Korea

*Department of Biomedical Engineering, Catholic University of Daegu, Gyeongsan 712–702, Korea

**School of Fire-Protecting Technology, Kyungil University, Gyungsan 712–701, Korea

***School of Textile and Fashion Technology, Kyungil University, Gyungsan 712–701, Korea

(Received October 25, 2010; Revised November 29, 2010; Accepted December 23, 2010)

초록: 루틴은 항발암, 소염제, 항바이러스성 기능을 갖는 물질이다. 미생물이 만들어낸 폴리에스테르인 PHBV와 루틴을 전기방사하여 나노섬유 부직포를 얻었다. 나노섬유 부직포의 항균성은 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*)을 사용하여 평가하였고, KB 셀을 이용하여 세포독성을 평가하였다. 그 결과 루틴을 3 wt% 함유할 때 지지체는 우수한 항균성을 보였으며, KB 셀을 이용한 실험결과로부터 루틴을 함유하는 PHBV 지지체는 세포독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다.

Abstract: Rutin(R) exhibits a wide range of biological activities including anticarcinogenic, antiinflammatory and antiviral actions. The purpose of this study is to investigate the effect of rutin concentrations (1 and 3 wt%) on the antibacterial activity of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) scaffolds. Antibacterial activity was evaluated by using *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. Furthermore, the qualitative ongrowth of human KB endothelial cells was done to study *in vitro* cytotoxicity of the scaffolds. As the results, PHBV scaffolds containing 3 wt% rutin completely inhibited the proliferation of *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. In addition, the PHBV/R scaffolds used in this study did not show any cytotoxicity when evaluated them with KB endothelial cells.

Keywords: cytotoxicity, antibacterial, rutin, PHBV, KB cell.

서 론

루틴(rutin)은 과일, 채소, 콩과 식물에 많이 포함되어 있는 플라보놀 배당체(글리코시드)의 하나로 연한 노란색 바늘 모양 결정이다. 또한 모세혈관을 튼튼하게 하고 출혈을 예방하며 혈압을 조절하는 작용을 하여 뇌출혈, 방사선장에, 출혈성 질병 예방에 효과가 있으며 항암, 항균 물질로 알려져 있는 비타민 C의 활동요소인 비타민 P라고 알려져 있다.^{1–4}

최근 생체적합성 고분자를 이용하여 다공성 지지체를 제조하고 필요한 조직 세포를 지지체에 배양시켜 3차원 구조를 가지는 세포/지지체 복합체를 의료분야에 이용하고자 하는 연구가 활발하다. 조직공학에서 가장 중요한 조건은 세포가 지지체에 잘 점착하여 성장 및 분화를 통해

주변 조직과 부작용이 없도록 생체내의 주변 환경과 유사한 조직 환경을 제공해야 한다는 것이다.⁵ 그러나 인공장기나 조직에 이용되는 지지체들은 임상에 적용될 때 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*) 등에 의한 감염으로 환자의 사망률이 높아지는 위험성을 가지고 있다.⁶ 이로 인해 인공장기의 체내 이식 시 세균의 감염을 철저히 막아야 한다는 문제점이 항상 발생하고 있다.

생체고분자로 의학적 응용에 이용되고 있는 poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV)는 이미 뛰어난 생체적합성과 생분해성의 이점으로 많은 연구가 이뤄졌다. PHBV는 미생물에 의해 합성되는 intracellular polyester인 PHAs계 공중합체이며 이를 사용하여 만들어진 이식재료에서는 급성염증이나 농양 등의 현상이 보이지 않는다는 연구 결과도 보고되어 생체재료로서의 가능성이 매우 높다고 할 수 있다.^{7–10}

본 연구에서는 전기방사법으로 루틴 및 PHBV를 이용하여 3차원의

†To whom correspondence should be addressed.

E-mail: ikkang@knu.ac.kr

항균성 나노섬유 지지체를 개발하고자 한다. 전기방사법을 이용한 나노섬유의 제조법에 대해서는 많은 연구가 이뤄졌다.¹¹⁻¹⁴ 나노섬유는 높은 비표면적과 기공도를 가지고 있어 의료재료, 인공혈관, 나노 복합재료 등으로 다양한 응용이 가능하다.^{15,16} 또한, 나노섬유로 만들어진 부직포는 세포의 점착과 성장을 촉진시키며 큰 비표면적으로 인해 상처부위와의 접촉면이 넓어져 상처치유 속도가 빠르며 상처에서 배출되는 체액의 흡수능력, 산소투과성의 우수함으로 인해 창상피복제나 혈관 이식 및 조직공학용 지지체 등의 응용에 많은 연구가 이뤄지고 있다.¹⁷⁻²¹

본 연구에서는 인공장기의 이식시 생길 수 있는 감염을 막기 위해 천연 항균물질인 루틴과 생체적합성이 뛰어난 PHBV를 이용하여 전기방사하드로써 항균성과 생체적합성을 동시에 만족시키는 나노섬유 부직포를 개발하고자 하였다.

실 험

시약 및 재료. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-valerate) (PHBV), 루틴은 Sigma-Aldrich Co. 제품을 구입하여 사용하였다. 항균성 평가를 위해 사용된 미생물인 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*) 및 KB 셀은 Human primary umbilical vein endothelial cells로 ATCC에서 구입하여 사용하였고, 배지의 제조에 사용한 Nutrient broth는 Sigma사의 제품을 사용하였다.

방사용액 제조. PHBV를 trifluoroethanol(TFE)에 용해하여 6 wt%의 방사용액을 제조하였다. 방사용액에 루틴의 농도에 따른 항균성을 알아보고자 루틴(R)을 1, 3 wt%로 녹여 혼합하였다.

전기방사. 나노 섬유를 제조하기 위해 전기방사 시스템을 0~40 kV의 전압공급이 가능한 고전압 공급장치(high voltage DC power supply unit, 청파 EMT), 집전판(collector), 주사기 펌프(syringe pump, KDS100), 주사기(gastight and needle lock type 10 mL, Hamilton), 금속주사기바늘(20 G) 등으로 구성하였다. 나노섬유 제조조건은 유체주입속도 2.0 mL/h, 방사거리 12 cm, 전압 7 kV, PHBV 농도 6 wt%로 고정시키고 루틴의 농도를 변화시켜 나노섬유를 제조하였다.

나노섬유의 형태 및 미세구조 관찰. PHBV 및 PHBV/R 나노섬유의 모폴로지는 전계형 주사전자현미경(FE-SEM, S-4300 HITACHI)을 이용하여 관찰하였다. 나노섬유에 함유된 루틴을 확인하기 위해 fluorescent microscope(ECLIPSE E600 POL, Nikon)을 이용하였다.

루틴의 방출 분석. 루틴이 369 nm 파장의 빛을 흡수한다는 특징을 이용하여 루틴을 함유하는 PHBV 나노섬유 부직포를 α -MEM에서 방출되는 정도를 확인하였다. 위의 결과를 이용하여 PHBV/R(3 wt%) 나노섬유 부직포를 α -MEM에 담귀두고 4, 12 h, 1, 3, 5, 7 day의 시간이 지난 후에 α -MEM를 제거하였다. 제거된 α -MEM은 UV-visible(JACSO V-650)을 사용하여 루틴에 대한 UV 흡수도를 측정하였다.

항균특성 실험.

Growth Inhibition Test: 항균성 평가는 직물의 항균도 시험 방법인 KS K 0693 : 2001에 의거하여 나노섬유의 항균도를 평가하였다. 항균성의 평가를 위하여 전기방사법으로 제조한 PHBV, PHBV/R 나

노섬유 부직포를 이용하였다. 제조된 부직포들은 autoclave에서 120 °C로 30분간 멸균하였고, 고압 증기 멸균 후 UV light 하에서 건조시킨 후 시료들을 두께 0.08 mm의 원형 크기로 잘라 항균실험에 이용하였다. 시험균주는 *Staphylococcus aureus*와 *Klebsiella pneumoniae*를 사용하였고, 보존 균주를 한천 배지에 이식하고 incubator에서 하루 동안 배양하였다. 배양된 균을 1백금이 취하여 액체 배지 20 mL에 이식한 후 shaking incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간 배양된 균액을 0.5 mL 취한 후 멸균된 증류수를 이용하여 200배 희석하였고, 이 희석균액을 멸균된 0.4 g의 나노섬유 부직포가 들어있는 vial에 각각 0.2 mL씩 접종하고 incubator에서 배양하였다. 이때 vial 하나는 시료가 들어있지 않은 상태로 균액만 접종하여 control로 사용하였다. 18 시간 동안 배양시킨 후, 각각의 vial에 중화용액 20 mL를 넣고 강하게 흔들어 시료에 붙은 균을 떼어내고 이 액을 1 mL씩 채취하여 생리 식염수로 10배 희석 계열을 만들어 한천 배지에 1 mL씩 접종하였다. 37 °C에서 24시간 배양한 후 생육한 colony수를 측정하고 희석배율을 곱하여 생균수를 산출하였다. 감균율의 산출식은 다음과 같다.

$$\text{Growth inhibition (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

이때, A는 control로 사용된 vial의 균액으로부터 구한 생균수이고, B는 시료가 들어있는 vial에서 구한 생균수이다.¹⁵

Inhibition Zone Test: 시험균주는 *Staphylococcus aureus*와 *Klebsiella pneumoniae*를 사용하였다. 보존 균주를 한천 배지에 이식하고 incubator에서 하루 동안 배양하였다. 배양된 균을 1백금이 취하여 액체배지 20 mL에 이식한 후 shaking incubator에서 24시간 배양하였다. Shaking incubator에서 24시간 길러진 배양액을 고체 배지 위에 도말하고, 균이 배양된 고체 배지 위에 준비된 시료를 지름이 1 cm 정도 되는 원형으로 잘라 얹어 두었다. 시료를 얹어둔 고체 배지를 incubator에서 24시간 동안 배양한 후 incubator에서 꺼내 고체배지의 inhibition zone을 확인하였다.¹⁶

세포점착 실험. 루틴을 함유하는 나노섬유에 KB 셀을 이용하여 시간에 따른 세포의 점착과 성장을 확인하였다. α -MEM와 10% fetal bovine serum(FBS), 1% penicillin G-streptomycin(Gibco, Japan)의 혼합용액에 세포를 담귀 놓았다. 5% CO₂, 37 °C에서 배양시켜 정해진 시간에 나노섬유 위에 세포를 고정화시켜 SEM을 이용하여 세포의 점착과 성장의 정도를 확인하였다.

세포활성 실험. 세포의 증식과 살아있는 세포를 정확하게 측정할 수 있는 기법으로 MTT assay를 이용하였다. 대사과정이 온전한 세포는 미토콘드리아의 탈수소 효소작용에 의하여 노란색 수용성 MTT tetrazolium이 자주색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원된다. MTT formazan의 흡광도는 570 nm 파장에서 최대가 되며, 이 흡광도를 측정하여 분석함으로써 세포의 농도와 활성을 측정하였다. 24-well cell culture plate에서 세포를 seeding한 나노섬유 지지체에 MTT solution 1 mL를 넣고 4시간 배양한 후 0.04 N HCl-iso-propanol 1 mL를 넣어 세포막을 녹여 내었다. 또한 살아있는 세포와 죽은 세포의 형광이미지를 얻을 수 있는 live-dead staining은 24-well에서 배양시킨 세포에 1 mL의 staining buffer에 0.001 mL의 Calcein-AM 용액을 각 well에 0.2 mL씩 넣고 37 °C에서 15분간

염색하는 과정을 거친 후 PBS로 여러 번 세척을 한 다음 공초점 현미경으로 관찰을 하여 결과를 얻어내었다.¹⁵

결과 및 토론

나노섬유의 제조. 조직공학에서의 지지체의 이용은 생체내 결합조직의 세포외기질(extracellular matrix, ECM)을 모방한 것이다. 본 연구에서는 전기방사된 나노섬유가 ECM에 존재하는 콜라겐의 섬유상 구조와 유사한 구조를 취하게 되므로 이상적인 매트릭스가 될 가능성을 가지며, 이들 나노섬유 지지체는 세포의 점착과 성장에도 영향을 준다. 본 연구에서는 항균성을 갖는 루틴을 PHBV-TFE 용액에 각 1, 3 wt% 섞은 후 전기방사를 이용하여 나노섬유를 제조하였다.

PHBV를 단독으로 방사한 Figure 1(a)의 경우와 루틴을 함유한 나노섬유(Figure 1(b), (c))의 직경에 변화가 없음을 알 수 있었다. 이는 나노섬유의 형성에 루틴의 영향이 거의 없다는 것을 의미한다.

한편 나노섬유 중의 루틴의 존재를 확인하기 위해 루틴 자신이 띠는 형광특성을 이용할 수 있다. 루틴은 형광물질로 359 nm에서 여기가 일어난다. 이후 바닥상태로 떨어지면서 에너지를 방출하여 450 nm에서 형광을 나타낸다.

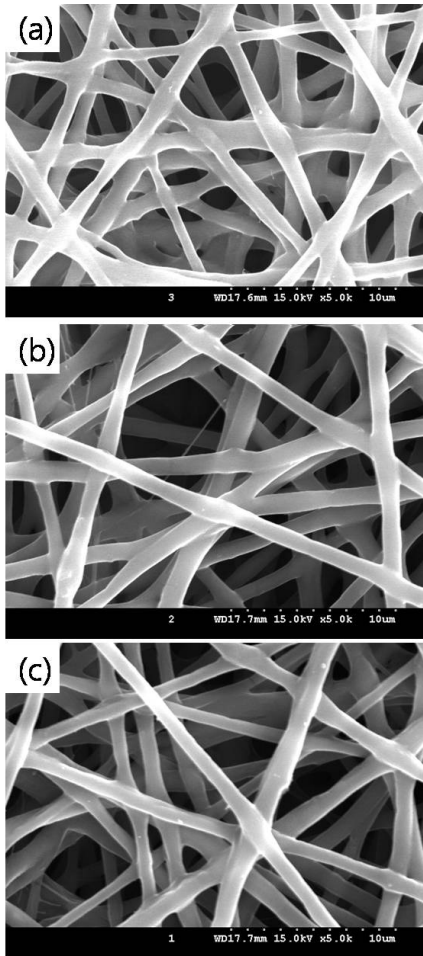


Figure 1. SEM micrographs of electrospun (a) PHBV; (b) PHBV/R 1 wt%; (c) PHBV/R 3 wt% nanofibrous scaffolds.

따라서, 형광현미경을 이용하여 450 nm 부근의 파장을 측정하게 되면 나노섬유 중의 루틴의 존재를 확인할 수 있다. Figure 2는 루틴을 3 wt% 함유하는 PHBV 나노섬유의 형광이미지를 나타낸다. 나노섬유는 전반적으로 초록색을 띠고 있으므로 루틴이 잘 분산되어 있음을 알 수 있다.

루틴의 방출 분석. Figure 3은 PHBV/R(3 wt%) 나노섬유 부직포를 4, 12 h, 1, 3, 5, 7 day의 시간에 따른 루틴의 UV흡수도 측정 결과이다. 2일까지 루틴의 방출량이 많은 것을 볼 수 있는데 이는 나노섬유 부직포의 표면에 존재하는 루틴이 방출되는 것으로 이후에는 방출되는 속도나 양이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다.

나노섬유 부직포에 함유된 루틴은 7일에 걸쳐 약 4%의 무게감소를 보였으며 이는 적절한 루틴의 방출로 인해 항균성이 최대 7일 동안 유지할 수 있다는 결과를 유추해 볼 수 있다.

항균특성. PHBV/R 나노섬유 부직포의 황색포도상구균과 폐렴간균에 대한 항균특성을 조사하였다. Figure 4는 그램양성균 및 음성균에 대한 PHBV/R 나노섬유 부직포의 항균성을 나타낸 결과이다. 루틴 3 wt%를 함유하는 PHBV 나노섬유 부직포의 경우 두 균주에 대하여 100%에 가까운 감균율을 나타내었다. 두 균을 비교해보면 폐렴간균에 대한 항균성은 황색포도상구균에 대한 항균성보다 약간 높았다. Figure 5는 PHBV/R 나노섬유 부직포의 inhibition zone을 나타낸 결과이다. 루틴 1 wt%를 함유하는 경우보다 3 wt% 함유하는 나노섬유 부직포의 경우 inhibition zone이 더 커진 것을 알 수 있었다. 루틴은 세균에 대한

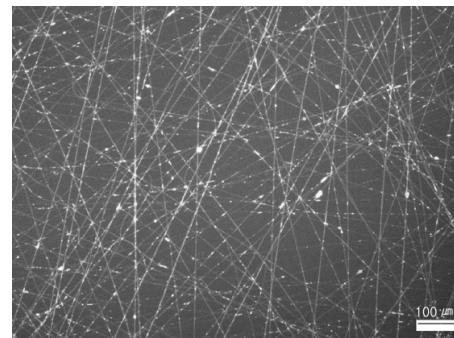


Figure 2. Fluorescence image of PHBV/R 3 wt%.

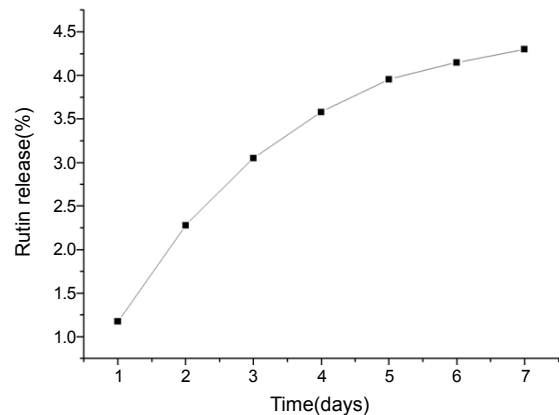


Figure 3. Amount of rutin released from PHBV/R(3 wt%) nanofibrous scaffolds as a function of immersion time.

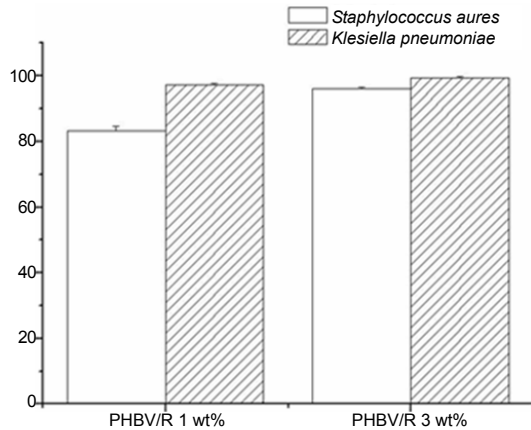


Figure 4. Growth inhibition of PHBV nanofibrous scaffolds with different amounts of rutin against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*.

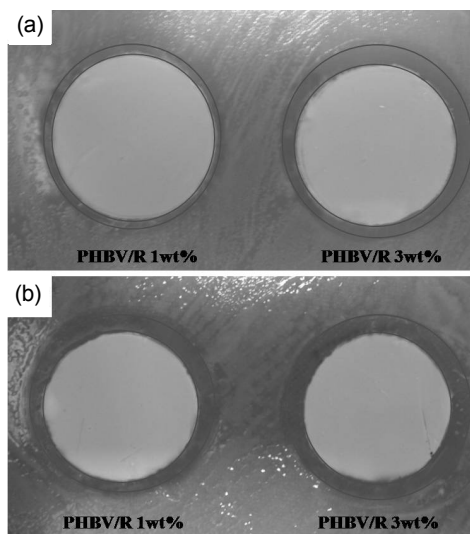


Figure 5. Effect of rutin concentration on the formation of zone inhibition: (a) *Staphylococcus aureus*; (b) *Klebsiella pneumoniae*.

항균성 뿐만 아니라 항바이러스 물질로써도 보고 되어 있다.^{22,23}

세포점착. 본 연구에서는 KB 셀을 이용하여 루틴을 함유하는 PHBV 나노섬유 지지체의 세포독성에 미치는 영향을 조사하였다. 앞선 연구에서 루틴은 그람양성균과 그람음성균에 대한 항균성을 가지고 있다는 것이 밝혀졌다. 항균특성이 세포의 성장과 활성에 영향을 주게 되면 PHBV/R을 조직공학용 지지체로 사용할 수 없게 되므로 실험을 통해 루틴이 세포의 활성에 미치는 영향을 조사하였다.

Figure 6은 나노섬유 부직포 위에서 세포를 4시간 동안 배양한 후 SEM을 통해 세포의 점착상태를 관찰한 결과이다. 세포의 점착은 PHBV와 PHBV/R 지지체 사이에 큰 차이를 나타내지 않았다. 이러한 세포의 점착은 세포-세포간의 점착과 세포-기질간의 점착으로 나눌 수 있다.

따라서 인공 재료를 매트릭스로 이용하여 세포-기질 사이의 상호작용을 이해하는 것은 무엇보다도 중요하다. 세포가 기질에 점착하는데에는 두 가지 요인을 생각할 수 있다. 하나는 기질의 구조와 화학적 성질이 세포점착에 중요한 영향을 미친다는 것이고, 두 번째는 배지 중의 단백

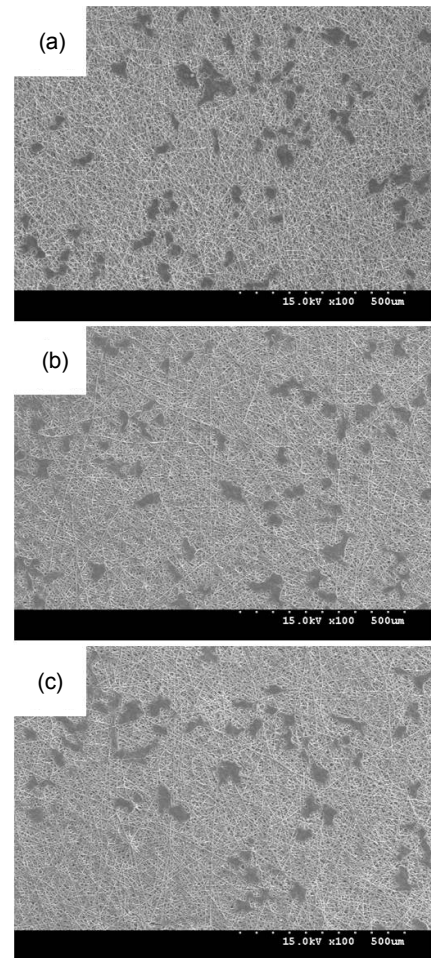


Figure 6. SEM images of KB cells cultured for 4 h on (a) PHBV; (b) PHBV/R 1 wt%; (c) PHBV/R 3 wt%.

질 혹은 세포 자신이 생산한 단백질류가 기질에 흡착함으로써 이들 흡착성분의 화학적 성질에 의해 세포 점착능이 결정되어 진다는 것이다. 일단 세포가 기질에 접촉하여 점착력을 나타내게 되면 단백질이 흡착되지 않은 기질과 세포사이의 결합은 비특이적이라 할 수 있다. 반면에 단백질이 흡착된 기질과 세포사이의 결합은 ligand-receptor와 같은 특이한 상호작용에 의해 영향을 받을 수 있다.^{24,25}

Figure 7은 72시간 동안 세포 배양을 시킨 후 SEM을 통해 세포의 성장을 관찰한 결과이다. 생체 적합성 고분자로 알려진 PHBV는 세포의 성장에 별다른 문제점을 보이지 않았다. 한편, 항균성을 가지는 루틴이 함유된 PHBV의 경우에도 세포의 성장에 별다른 영향이 없는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 루틴이 세포의 성장에 영향을 끼치지 않으면서 세균에 대해서는 항균성질을 나타낸다는 것을 의미한다.

세포활성. Figure 8은 3일 동안 KB 셀을 배양한 후 MTT assay를 이용해 세포의 활성을 측정된 결과이다. PHBV에 루틴을 첨가한 경우 세포활성은 PHBV에 비해 약간 낮아졌다. 그러나 루틴의 함량에 의한 변화는 나타나지 않았다. 유사한 연구로서 항균성 물질인 나노은 입자를 넣어 연구한 결과도 마찬가지로 PHBV 단독으로 있는 경우에 비해 은을 함유한 나노섬유 상에서의 세포활성이 약간 낮아지는 경향이 나타났다.¹⁵ 이 경우 세포가 충분히 활성화되기 전에 항균물질에 의

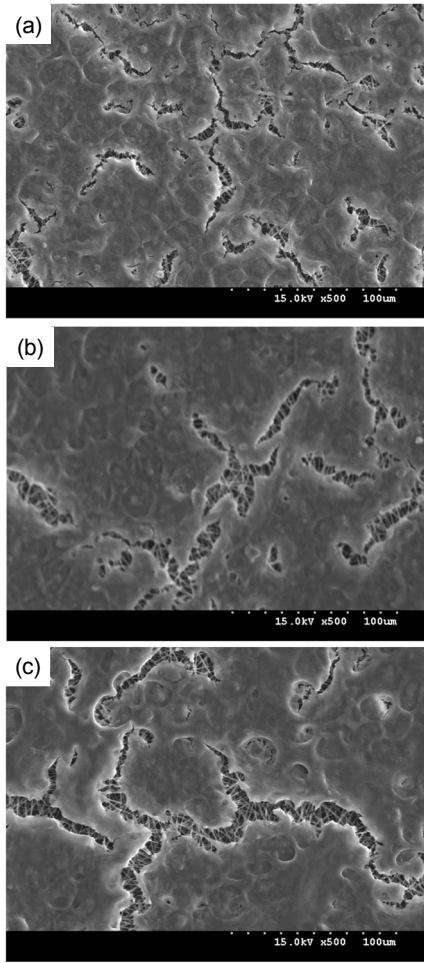


Figure 7. SEM images of KB cells cultured for 72 h on (a) PHBV; (b) PHBV/R 1 wt%; (c) PHBV/R 3 wt%.

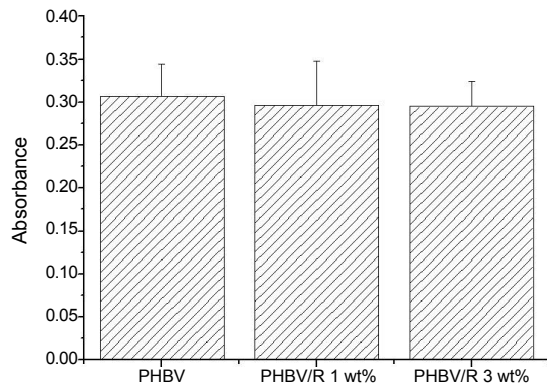


Figure 8. Proliferation of KB cells cultured for 3 days. Data expressed as means $\pm$ SD (n=5) for the specific absorbance.

해 사멸되는 것으로 그 양이 아주 미미하므로 무시할 만한 수준이다.¹⁵

Figure 9는 5일 동안 PHBV 나노섬유 부직포 상에 KB 셀을 배양시켜 세포를 염색한 후 관찰한 live/dead assay의 결과를 나타낸 것이다. 살아있는 세포는 초록색을 띠고 죽은 세포는 붉은색을 띤다. Figure 9에서 알 수 있듯이 PHBV 및 PHBV/R에서 배양한 세포는 대부분 초

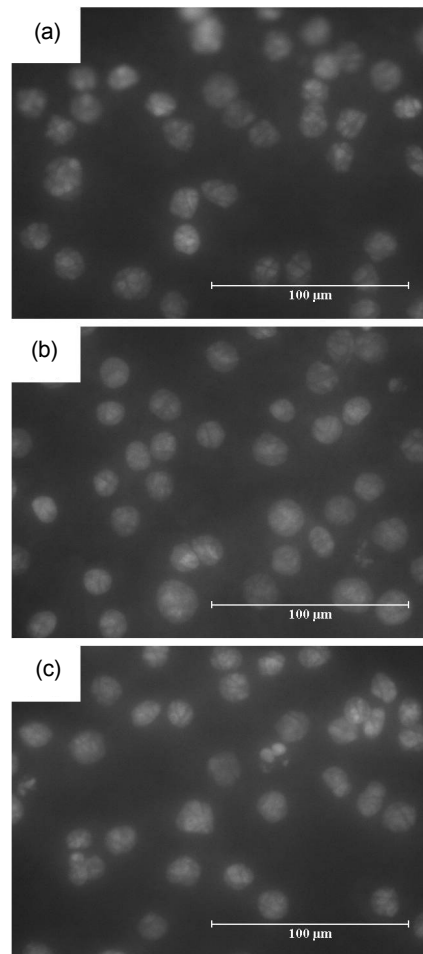


Figure 9. Fluorescence microscopy images of KB cells cultured for 2 days on the (a) PHBV; (b) PHBV/R 1 wt%; (c) PHBV/R 3 wt% nanofibrous scaffolds ($\times 400$).

록색을 띠고 있어 루틴에 의한 세포 독성은 나타나지 않고 있다고 말할 수 있다.

결론

어떠한 재료가 조직공학에 이용되기 위해서는 항균성을 확보하는 것이 매우 중요하다. 본 연구에서는 천연물에서 나오는 대표적인 항균물질로 알려져 있는 루틴을 포함하는 PHBV 나노섬유 지지체를 제조하였다. 이때 얻어진 나노섬유의 직경은 600~900 nm 범위 이었다. PHBV 나노섬유에 함유된 루틴은 형광현미경을 통해 그 존재를 확인할 수 있었다. 직물의 항균성을 평가하기 위해 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)과 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*)에 대한 감균율을 측정하고 inhibition zone test를 실시하였다. 감균률의 측정결과 루틴 3 wt%에서 99% 이상의 우수한 항균성을 보였다. Inhibition zone test에서는 루틴 1 wt% 보다 3 wt%일 때 더욱 진한 존이 형성됨을 알 수 있었다. 또한, KB 셀 배양 결과 루틴이 세포 생존에 미치는 영향이 거의 없음을 알 수 있었다. 따라서 항균성과 세포적합성을 동시에 가지는 폴리에스테르 나노섬유 부직포를 얻을 수 있었다. 이상의 결과로부터 PHBV/R 나노섬유 scaffolds는 조직공학용 지지체로 이용될 수 있는 가능성을 지니고 있는 것으로 사료된다.

감사의 글: This work was supported by the Korea Ministry of Education, Science and Technology (Contract No. 2009-0073282).

참 고 문 헌

1. M. F. Abu Bakar, M. Mohamed, A. Rahmat, and J. Fry, *Food Chem.*, **113**, 479 (2009).
2. I. Kreft, N. Fabjan, and M. Germ, *Fagopyrum*, **20**, 7 (2003).
3. C. Wagner, R. Fachinetto, C. L. Corte, V. B. Brito, D. Severo, G. D. O. C. Dias, A. F. Morel, C. W. Nogueira, and, J. B. T. Rocha, *Brain Res.*, **1107**, 192 (2006).
4. J. Yang, J. Guo, and J. Yuan, *LWT-Food Science and Technology*, **41**, 1060 (2008).
5. B. M. Min, G. Lee, S. H. Kim, Y. S. Nam, T. S. Lee, and W. H. Park, *Biomaterials*, **25**, 131 (2004).
6. G. Ginaalska, D. Kowalczyk, and M. Osińska, *Intern. J. Pharm.*, **288**, 131 (2008).
7. C. W. Pouton and S. Akhtar, *Adv. Drug Deliever. Rev.*, **18**, 133 (1996).
8. G. T. Köse, H. Kenar, H. Hasırcı, and V. Hasırcı, *Biomaterials*, **24**, 1949 (2003).
9. S. F. Williams, D. P. Martin, D. M. Horowitz, and O. P. Peoples, *Int. J. Biol. Macromol.*, **25**, 111 (1999).
10. P. J. Hocking, and R. H. Marchessault, *Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers*, Blackie Academic and Professional, New York, 1994.
11. H. Guan, C. Shao, S. Wen, B. Chen, J. Gong, and X. Yang, *Mater. Chem. Phys.*, **82**, 1002 (2003).
12. H. Yoshimoto, Y. M. Shin, H. Terai, and J. P. Vacanti, *Biomaterials*, **24**, 2077 (2003).
13. J. Zeng, X. Xu, X. Chen, Q. Liang, X. Bian, L. Yang, and X. Jing, *J. Control. Release*, **92**, 227 (2003).
14. Z. M. Huang, Y. Z. Zhang, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, *Compos. Sci. Technol.*, **63**, 2223 (2003).
15. Z. C. Xing, W. P. Chae, J. Y. Beak, M. J. Choi, Y. S. Jung, and I. K. Kang, *Biomacromolecules*, **11**, 1248 (2010).
16. H. M. Kim, W. P. Chae, K. W. Chang, S. S. Chun, S. Y. Kim, Y. S. Jeong, and I. K. Kang, *J. Biomed. Mater. Res.*, **94**, 380 (2010).
17. Z. C. Xing, W. P. Chae, M. W. Huh, L. S. Park, S. Y. Park, G. Kwak, K. B. Yoon, and I. K. Kang, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **11**, 61 (2011).
18. L. Huang, R. A. McMillan, R. P. Apkarian, B. Pourdeyhi, V. P. Contocello, and E. L. Chaikof, *Macromolecules*, **33**, 2989 (2000).
19. R. A. Caruso, J. H. Schattka, and A. Greiner, *Adv. Mater.*, **13**, 1577 (2001).
20. Z. Chen, M. D. Forster, W. Zhou, H. Fong, and D. H. Reneker, *Macromolecules*, **34**, 6156 (2001).
21. W. J. Li, T. Laurencin, E. J. Caterson, R. S. Tuan, and F. K. Ko, *J. Biomed. Mater. Res.*, **60**, 613 (2002).
22. H. Arima, H. Ashida, and G. I. Danno, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1009 (2002).
23. M. Alia, R. Mateos, S. Ramos, E. Lecumberri, L. Bravo, and L. Goya, *Eur. J. Nutr.*, **45**, 19 (2006).
24. T. Hoshiba, M. Wakejima, C. S. Cho, G. Shiota, and T. Akaike, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **85**, 228 (2008).
25. T. Akaike, S. Tobe, A. Kobayashi, M. Goto, and K. Kobayashi, *Gastroenterol. Jpn.*, **28**, 45 (1993).