

헤스페리딘을 함유한 락타이드 글리콜라이드 공중합체 지지체에서 섬유륜 세포의 증식과 거동 평가

장나금 · 고현아 · 차세롬 · 이선의 · 정현기 · 김수영 · 신재훈 · 김은영 · 송정은 · 강길선[†]

전북대학교, BIN융합공학과, 고분자나노공학과, 고분자융합소재연구소

(2015년 3월 5일 접수, 2015년 3월 25일 수정, 2015년 3월 31일 채택)

Proliferation and Growth Behavior of Annulus Fibrosus Cells on Hesperidin Loaded Poly(lactide-co-glycolic acid) Scaffold

Na Keum Jang, Hyun Ah Ko, Se Rom Cha, Seon Eui Lee, Hyun Ki Jeong, Su Young Kim, Jae Hun Shin,
Eun Young Kim, Jeong Eun Song, and Gilson Khang[†]

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

(Received March 5, 2015; Revised March 25, 2015; Accepted March 31, 2015)

초록: 항산화와 항염증으로 잘 알려진 헤스페리딘은 디스크 재생을 위해 효과적인 지지체로 제작하기 위해 사용하였다. 지지체는 poly(lactide-co-glycolic acid) (PLGA)에 헤스페리딘(0, 3, 5, 10%)을 첨가하여 염 침출법으로 제작하였고, 섬유륜 세포(AF)를 파종한 후 세포의 변화를 연구하였다. SEM, WST 그리고 RT-PCR 분석을 통해 세포의 부착과 증식, 세포의 표현형 분석을 실시하였다. 또한 면역조직화학염색을 통하여 AF세포의 생체 내 거동을 확인하였다. 그 결과, 5% 헤스페리딘이 함유된 PLGA 지지체가 가장 좋은 세포의 형태와 생체 적합성을 보여, 디스크 재생을 위한 지지체로서의 활용 가능성을 확인하였다.

Abstract: Hesperidin, a well-known antioxidant and anti-inflammatory agent, was smartly used for designing efficient scaffolds for disc regeneration. The scaffolds were synthesized via a salt-leaching method by adding hesperidin (0, 3, 5, & 10%) to poly(lactide-co-glycolic acid) (PLGA) followed by a cellular behaviors study by seeding annulus fibrosus (AF) cells. The cellular adhesion, proliferation and phenotypes were further evaluated by SEM, WST and RT-PCR, respectively. Additionally, AF cell behavior was studied by immunohisto-chemical staining *in vivo*. Results showed that PLGA scaffold with 5% hesperidin are best suited for disc regeneration, showing good cellular morphology and biocompatibility.

Keywords: hesperidin, PLGA, annulus fibrosus, scaffold.

서 론

추간판 디스크는 섬유륜(annulus fibrosus, AF)이 수핵(nucleus pulposus, NP)을 둘러싸고 있는 구조로, NP는 젤과 같은 조직으로 수분을 함유하여 내부 팽창 역할을 하고, AF는 척추의 하중을 분산시키는 역할을 함으로써 몸의 유연성과 하중을 지지하는 기능을 담당한다. 특히 AF는 제I형 콜라겐으로 대부분 이루어져 인장강도를 가진다.¹⁻³

하지만, 현대인들의 잘못된 자세와 외상으로 인하여, AF가 손상되면 NP가 척추 쪽으로 밀려나와 신경을 자극해 통증을

일으키는 추간판 탈출 증상이 많이 발병된다.^{4,5} 이러한 허리 디스크는 아주 미량의 AF가 신경을 자극할 때에만 추간판 디스크 절제술로 그 통증을 완화시킬 수 있다.^{6,7}

그러나 추간판 디스크 절제술은 직접적인 치료가 아니며, 가지고 있는 디스크 손상보다 더 심한 손상을 야기한다.^{8,9} 따라서 AF 재생을 위한 재생 연구가 필요하다.^{10,11}

조직공학은 생명과학과 공학의 두 지식과 기술이 융합되어 손상된 장기 재생을 연구하는 학문이라 말할 수 있다.^{12,13} 이러한 연구를 위해서는 세포가 세포의 기질과의 특이적 결합으로 3차원 공간 안에서 부착, 성장하며 세포가 가진 고유의 성질을 유지 및 발현을 하게 해주는 성장인자나 사이토카인 등의 요소, 그리고 세포가 자라는 환경을 제공해주는 지지체가 필요하다.¹⁴⁻¹⁶ 따라서 기본적으로 세 가지의 요소가 필요한데, 그것은 세포, 성장인자와 사이토카인과 같은 인자, 그

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: gskhang@chonbuk.ac.kr

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

리고 지지체이다. 이 요소들은 조직재생을 위해 필요한 세포를 얻어 지지체를 이용한 세포 배양을 통해 인공장기 또는 조직을 만들어 체내에 이식하는 과정을 통해 재생을 유도하는 과정을 통해 이용된다.^{17,18}

락타이드 글리콜라이드 공중합체 poly(lactide-co-glycolic acid) (PLGA)는 생체적합성, 생분해성과 가공성이 우수한 미국 식품의약품안전청의 승인을 받은 생체재료의 고분자로, 딱딱한 물성을 가지고 있어 높은 기계적 강도를 제공하고,¹⁹ 지속적인 약물 전달 가능성을 가지고 있기 때문에 오랜 임상 실험이 실행되는 가장 많이 쓰이는 고분자이기도 하다.²⁰ 하지만, 체내에 이식되었을 경우, 산성물질로 분해되어, 그로 인해 염증반응이 일어난다고 알려져 있다.²¹⁻²⁵ 때문에 PLGA의 우수한 생체재료적 특성을 이용하기 위해 PLGA 표면의 개질화와 염증반응을 줄이는 연구가 필요하다.

이러한 합성고분자가 분해되면서 일어나는 염증반응을 해결하기 위해 항염증작용을 가진 자연 재료를 찾으려는 연구가 최근 많이 이루어지고 있다. 자연에서 유래되어 생체재료에 쓰여진 재료 중, 식물추출물의 성분들은 항산화작용을 하는 알칼로이드, 페놀화합물, 그리고 플라보노이드 등이 연구되어왔다. 이 중, 플라보노이드는 비질소성 색소로, 대부분의 경우 람노오스, 글리코스, 그리고 루티노스 등의 당류와 결합된 배당체로 존재하며, 항산화 및 항균성을 가진다고 보고되어진다.^{26,27} 플라보노이드의 종류인 헤스페리딘은 감귤류의 과피에 풍부하게 함유되어 혈압 강하, 항산화, 항염증, 금속이온과 착염의 기능으로 인한 활성산소 억제, 이로 인한 세포, 조직, 기관 손상을 억제하는 효과를 가지고 있어, 노화 방지와 항암효과가 있는 것으로 나타났다.²⁸⁻³⁰

전 연구에서 헤스페리딘을 함량별로 첨가한 PLGA 필름들 중 5%의 헤스페리딘이 포함된 PLGA 필름에서 가장 좋은 항산화, 항염증 효과를 나타낸 것을 확인할 수 있었다.³¹ 따라서 본 연구는 항염증 효과가 있는 헤스페리딘을 함량별로 첨가한 PLGA 지지체에 AF세포를 파종하여 조직공학적 디스크 재생을 위한 가장 효과적인 지지체를 찾고자 하였다.

실 험

시약 및 재료. 생분해성 고분자인 PLGA(락타이드/글라이콜라이드 몰비 75/25, Resomer® RG756, Boehringer Ingelheim Chem. Co. Ltd., Germany)는 평균분자량이 90000 g/mol인 것을 사용하였다. 헤스페리딘(Sigma, USA)은 평균분자량 610.56 g/mol인 것을 사용하였다. 메틸렌클로라이드(methylene chloride, MC, Tedia Co. Inc., USA) 및 이외의 모든 화학약품과 유기용매는 HPLC(high performance liquid chromatography) 등급을 사용하였다.

지지체 제조. 함량별 헤스페리딘/PLGA 다공성 지지체는 용매 캐스팅/염 추출법에 의해 제조되었다. 1 g의 PLGA를

Table 1. Preparation of Scaffolds with Different Hesperidin Contents in PLGA

	(unit: g)			
	PLGA	H 3	H 5	H 10
PLGA	1	1	1	1
Hesperidin	0	0.03	0.05	0.1
Salt	9	9	9	9

4 mL의 MC에 용해한 후, PLGA 양의 0, 3, 5, 10%가 되도록 각각 헤스페리딘을 첨가한 후(PLGA, H 3, H 5, H 10), 255~350 μm 의 NaCl 9 g을 첨가하였다(Table 1). 직경 7 mm 및 높이 3 mm의 실리콘 몰드에 넣고 프레스(MH-50Y, C AP 50 tons, Japan)를 이용하여 상온에서 60 kgf/cm²의 압력으로 24시간 동안 가압한 후, 다공형성을 위해 염의 추출을 3차 증류수에서 6시간마다 교체하여 48시간 동안 수행하였다. 5 mTorr, -80 °C의 조건에서 24시간 동안 동결 건조하였다.

세포 분리 및 배양. AF는 4주된 암컷 뉴질랜드 흰토끼의 척추에서 분리하여 사용하였다. 토끼를 희생시킨 후 등의 털을 제거하고, 멸균된 수술용 가위로 토끼의 척추부분을 절단하여 PBS로 여러번 세척 후 근육을 제거하였다. 멸균된 수술용 칼을 사용하여 AF 조직 분리 후 PBS로 다시 세척하고, 0.25 wt%의 콜라게네이즈 A형(Roche, Indianapolis, USA) 용액으로 섬유류조직을 6시간 동안 처리하였다. 조직이 담긴 용액을 원심분리하고 100 μm 의 나이론 매쉬로 거른 후, 세포를 세어 75 플라스크에 분주하였다. 이때, 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 스트렙토마이신)가 함유된 배양액으로 현탁액을 만든 후 세포배양 플라스크에 분주하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 배양액은 일주일에 세 번 교체해 주었다.

SEM. 함량별 헤스페리딘/PLGA 지지체에 AF세포를 2×10^5 세포/지지체의 농도로 파종하고 1, 2 및 3일 배양한 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척후 2.5% 글루탈알데하이드로 24시간 고정된 후 알코올을 이용하여 탈수하고 동결건조하였다. 각 시료를 잘라 샘플에 고정시킨 후 플라즈마 스퍼터(Emscope, Model SC500K, UK)를 이용하여 200 μm 의 두께로 백금코팅하고 주사전자현미경 Bio-LV SEM(SN-3000 Hitachi, Japan)을 이용하여 헤스페리딘의 함량에 따른 지지체에서의 세포의 부착정도를 관찰하였다.

Water-Soluble Tetrazolium(WST). 분리된 AF세포는 3회 계대 배양한 후 0.05%의 트립신을 이용하여 세포를 수거하여, 제조된 필름에 2×10^5 세포/지지체의 농도로 파종하고 배양액을 공급하여 37 °C의 5% CO₂ 세포 배양기에서 1, 3, 7 및 10일 동안 세포를 배양하였다. 증식률의 확인은 WST 분석법을 이용하여 확인하였으며 1, 3, 7, 및 10일째 Cell

Counting Kit-8(Dojindo, Japan)용액을 100 μ L씩 넣고 4시간 동안 37 $^{\circ}$ C 인큐베이터에서 배양하였다. 그 후 96웰에 샘플을 100 μ L씩 분주하고 ELISA 플레이트리더(E-max, Molecular Device, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Real-time Polymerase Chain Reaction(RT-PCR). 합량별 헤스페리딘/PLGA 지지체에 AF세포의 특성유지를 유전자 측면에서 확인하기 위하여 RT-PCR을 실시하였다. 배양액을 제거한 뒤 Trizol(InvitrogenTM, USA) 1 mL를 넣고 피펫팅하여 세포막을 녹여, EP tube에 넣은 후, 클로로포름(Sigma)을 0.2 mL를 넣고 섞어주었다. 그 다음 4 $^{\circ}$ C, 12000 rpm에 15분 동안 원심분리하였다. 분리 후 상층액 0.5 mL 석션하여 새로운 EP tube에 넣고 이소프로판올(Sigma-Aldrich) 0.5 mL를 넣고 섞어 준 후 폴리아크릴 CarrierTM(molecular rescenter, Inc)를 5 μ L을 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에 10분 보관하였다. 그 다음 4 $^{\circ}$ C, 12000 rpm에 10분간 원심분리하여 RNA를 얻었다. 이렇게 얻은 RNA는 one step PCR 키트(TOPscriptTM One-step RT PCR DryMIX(+Dye))를 이용하여 각각의 프라이머(β -actin, collagne-I)를 신장시켜 DNA 영역을 증폭시켰다. 증폭된 DNA를 1%(w/v) 아가로스겔에 전기영동을 하여 300 nm 자외선 투과조사기(Vilber Lourmat ETX-20,M, France)로 촬영, 밴드의 발현정도를 관찰하였다. 프라이머는 제노텍(Korea)으로부터 구입하였다.

조직학적 평가. Safranin-O, 제I형 콜라겐 염색을 통한 조직학적 평가는 *in vivo* 환경에서 지지체의 다공 속에서 세포 증식 및 ECM 분포 정도를 확인하기 위하여 실시하였다. T 세포가 결여된 4주령 암컷 balb-c/nude(25~30 g, 중앙실험동물, Korea)를 zoletil 50과 domitor를 2:1로 혼합한 용액을 PBS로 희석하여 복강주사를 통한 전신 마취 하에 시행되었다. Balb-c/nude 피하에 이식되는 지지체는 이식 전 2세대제 AF를 2×10^5 세포/지지체의 농도로 파종하여 생체 외 환경에서 7일간 배양한 뒤 balb-c/nude 피하에 파종하여 1, 6 주 후 적출한 후, 4% 포르말린(Sigma)용액에 고정시킨 후 파라핀 블록을 제조하였다. 블록은 4 μ m의 두께로 박절하여 PLL 코팅 슬라이드에 고정한 후, 탈 파라핀 과정을 거쳐 Safranin-O, 제I형 콜라겐 염색을 실시하였다.

결과 및 토론

지지체 제조. 완성된 지지체의 육안관찰 결과는 Figure 1에 나타났다. 헤스페리딘 함량이 높은 지지체일수록 헤스페리딘의 색과 같은 주황빛이 나타났다. 또한 지지체를 가로로 절단하여 SEM으로 관찰한 결과(Figure 2) 지지체의 다공이 소금의 모양과 같이 일정하게 형성된 것을 확인할 수 있었다. 이 결과로 용매 캐스팅/염 추출법으로 제작한 지지체의 다공은 일정하게 형성되는 것을 확인할 수 있었다.

SEM. AF세포의 각 지지체 표면의 부착 형태를 확인하기

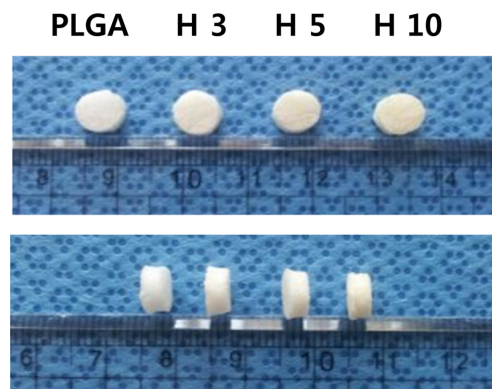


Figure 1. Gross morphology of PLGA, H3, H5, and H10 scaffolds.

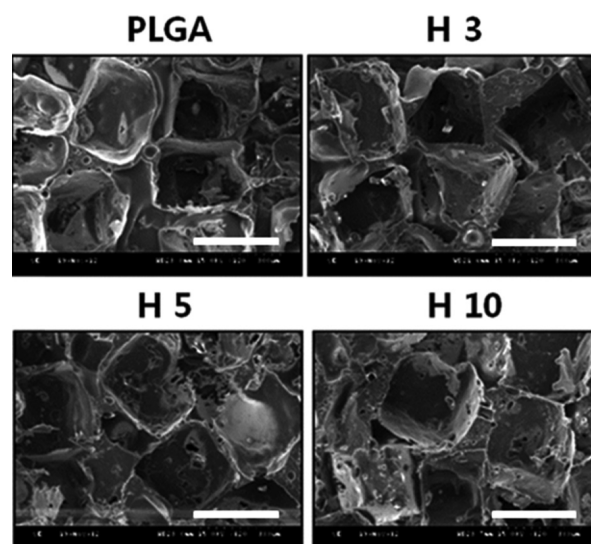


Figure 2. Observation of scaffolds by SEM (magnification $\times 120$, scale bar=500 μ m).

위해 SEM 분석을 실시하였다. 1일과 10일차에 확인한 결과, 1일차에는 모든 AF세포의 형태가 구형으로 나타났다. 또한 10일차에 확인한 각각의 지지체 표면에서 AF세포는 증식에 의해 세포의 집단이 이루어졌으며, 그 모폴로지 또한 세포의 뻗음을 확인할 수 있었다. 특히, H5 지지체의 표면은 세포의 증식으로 인해 포도송이 같은 모양을 나타내었고, 그 크기와 수 또한 다른 지지체에 비하여 크고 많았다. 이러한 결과는 소수성의 PLGA가 친수성의 헤스페리딘이 첨가되어 지지체 표면에 세포가 부착하는데 더 이로운 환경인 친수성과 습윤성을 제공하고 세포외기질이 표면에 흡착하는데 영향을 준 것으로 사료된다. 이로써, H5 지지체가 AF세포의 부착과 증식에 도움을 준다는 것을 확인하였다(Figure 3).

WST. PLGA 지지체와 헤스페리딘을 첨가한 지지체에 따른 세포의 증식을 확인하기 위해 AF세포를 2×10^5 세포/지지체로 파종하여 WST 분석을 실시하였다. 그 결과, H5 지지

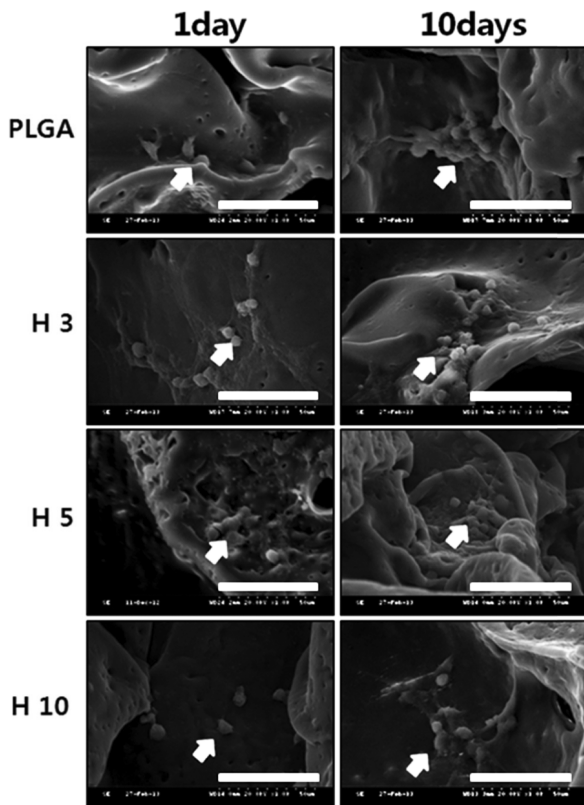


Figure 3. SEM microphotographs of AF cell morphology on PLGA, H 3, H 5, and H 10 scaffolds after 1, and 10 days (magnification $\times 1000$, scale bar=50 μm). The white arrows point the AF cells.

체에서의 세포 증식이 모든 측정 일에서 다른 지지체에 비교하여 우수하였다. 1일차부터 1.50로 1.45와 1.42 값의 H 3과 H 10 지지체 값보다 높게 나타났고, 나머지 측정일에도 다른 지지체 값보다 높게 나타났다. 10일차에서는 모든 지지체의 증식률이 감소치를 나타내었지만, H 5 지지체의 증식률만이 1.93으로 그 전 측정일의 값인 1.97과 비교하여, 감소된 값은 다른 지지체에 비교했을 때 현저히 낮게 나타났고, 다른 군에 비해 가장 높은 값을 나타내었다. 한편, H 10 지지체는 헤스페리딘을 함유하지 않은 PLGA 지지체의 세포 증식 측정값과 비슷하게 나타났는데, 이는 이전 연구와 같이 헤스페리딘이 10 wt% 이상 첨가하면 세포증식이 감소하는 결과와 일치한다.^{31,32} 따라서 PLGA에 헤스페리딘이 10 wt% 이상 포함하면, AF세포의 증식에 도움을 주지 않는다는 것으로 사료된다(Figure 4).

RT-PCR. 함량별 헤스페리딘 지지체에서 AF의 mRNA 발현에 주는 영향을 확인하기 위해 각각의 지지체에 세포를 파종한 후 3일과 10일 차에 RNA 분리 및 RT-PCR을 수행하였다. 모든 실험군에서 housekeeping gene인 β -actin과 AF의 특이적 발현 마커인 collagen-I을 확인해 본 결과 실험군 모두

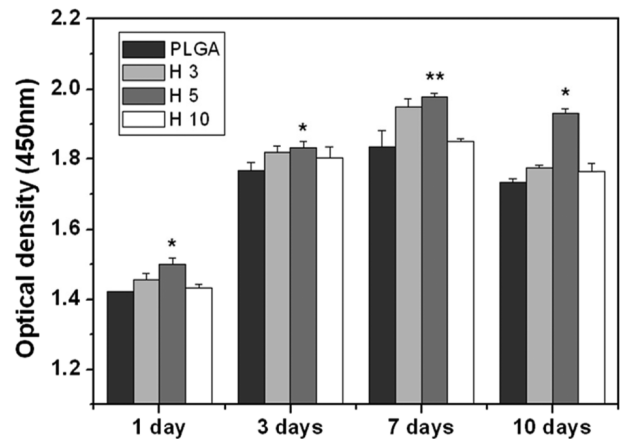


Figure 4. Cell proliferation of AF on PLGA, H 3, H 5, and H 10 scaffolds on 1, 3, 7 and 10 days after cell culture (* $P < 0.5$, ** $P < 0.01$).

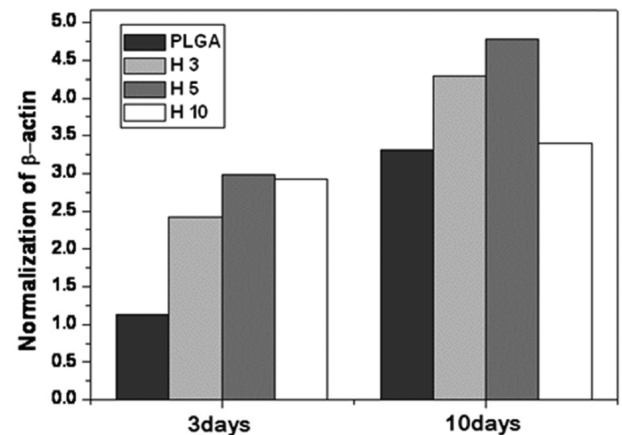


Figure 5. Gene expression of mRNA levels of AF on PLGA, H 3, H 5, and H 10 scaffolds using RT-PCR.

발현됨을 확인할 수 있었다. 측정일 모두 헤스페리딘을 함유한 지지체의 값이 PLGA 지지체 값보다 높게 나타났고, 특히 3일차에 H 5 지지체에서 그 값이 2.98로 가장 높게 나타났다. 마찬가지로 10일차에도, H 5 지지체의 값이 4.78로 다른 지지체와 비교하여 그 값이 월등히 높았다. 하지만, H 10 지지체는 PLGA 지지체와 비교하여 그 값이 거의 차이가 나지 않았다. 이러한 결과는 WST 분석과 마찬가지로 헤스페리딘이 일정 함유량을 넘기면, AF세포의 표현형 유지와 기능이 잘 유지되지 않는 것으로 사료된다. 마찬가지로 모든 측정일에 값이 낮게 나타난 PLGA 지지체도 AF세포의 표현형 유지와 기능을 잘 유지하지 못하는 것으로 나타났다. 따라서 H 5 지지체는 AF세포의 표현형 유지 및 세포의 기능을 잘 유지하는 것으로 사료된다(Figure 5).

조직학적 평가. Safranin-O 염색은 세포의 기질의 프로테오글리칸을 확인하는 염색방법으로 그 양이 많을수록 붉은

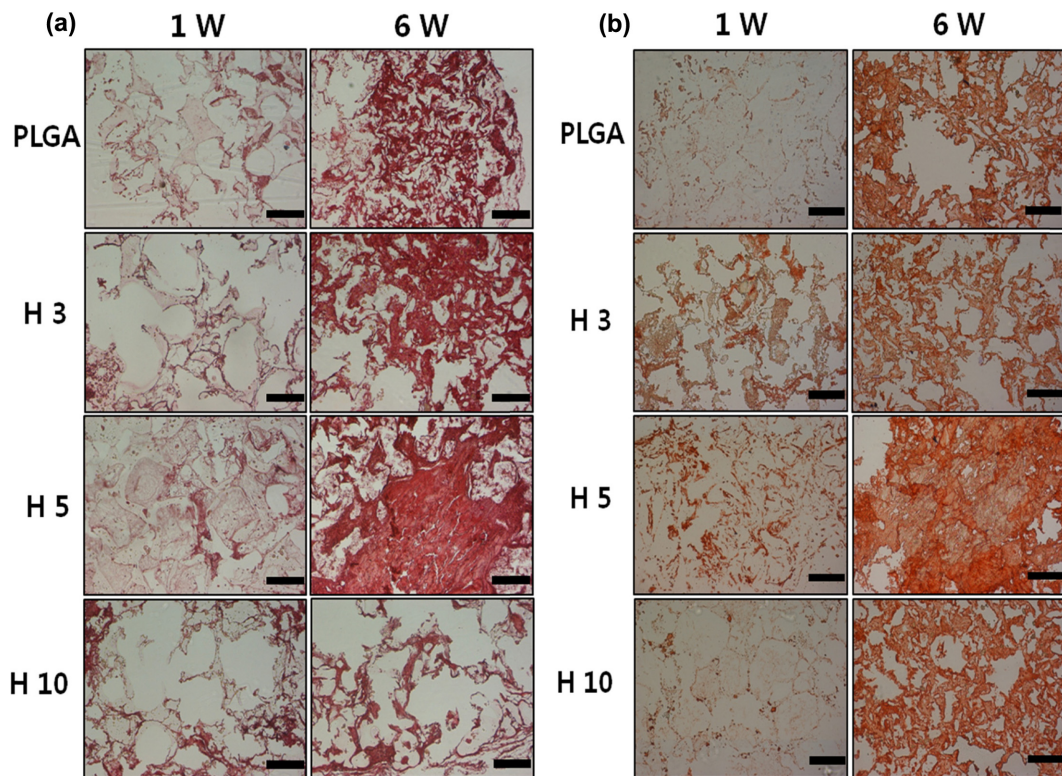


Figure 6. Safranin-O (a) and Collagen-II (b) stained histological section of tissue at PLGA, H 3, H 5, and H 10 scaffolds after 1 and 6 weeks of implantation *in vivo* (scale bar=200 μ m).

색의 진해가 진행되며, 헤마톡실린에 의해 핵이 관찰되어 진다. Safranin-O 염색을 실시한 결과(Figure 6) 지지체 안에서 세포의 기질을 확실하게 확인할 수 있었다. 특히 1주차 H 5 지지체의 경우, 세포의 기질이 지지체 다공 사이를 AF의 세포의 기질로 그물처럼 채워가는 것을 확실하게 보였다. 또한 6주 H 5 지지체 안에서는 완전한 조직화가 되었다는 것을 보여주었다. 하지만, H 10 지지체의 경우 1주와 6주 사이에 별다른 차이점은 발견되지 않았다. 또한 뼈와 피부, 그리고 건과 같은 주요 장기의 구성물질인 Collagen-II 염색을 통해 콜라겐의 생성을 확인하였다. Collagen-II 염색도 Safranin-O 염색 결과와 마찬가지로, 모든 실험군에서 Collagen-II의 발현을 보였으며, 특히 1주차에 H 5 지지체는 다공 안에 콜라겐이 발현되어 조직화가 되어가는 모습을 볼 수 있었고, 지지체의 모양도 잘 유지가 되었다. 또한 6주차에는 지지체 안의 일부가 조직화가 되어 다른 지지체와 비교하였을 때, Collagen-II 합성이 우수하게 나타났다. 이러한 결과로, H 5 지지체는 AF세포의 인공재료 및 세포재생에 효과적일 것으로 사료된다(Figure 6).

결론

본 실험은 신경을 누르는 증상만을 완화시켜 통증을 줄이

는 디스크의 현재의 치료방법을 넘어 완전한 AF의 재생을 위해 항염증 효과가 있는 헤스페리딘을 함량별로 첨가한 PLGA 지지체에 AF세포를 파종하여 조직공학적인 디스크 재생을 위한 가장 효과적인 지지체를 찾고자 하였다. 우수한 기계적 성질을 가진 PLGA에 0, 3, 5, 10%의 헤스페리딘을 첨가하여 용매 캐스팅/염 추출법으로 지지체를 제작, AF세포를 파종하여 SEM, WST, RT-PCR 그리고 *in vivo* 상에서 조직공학적인 평가를 실시하였다. SEM 분석에서는 모든 지지체에서 AF세포가 초기에는 모두 구형으로 나타났지만, 10일차에서는 지지체 안에서 AF세포가 증식하여 포도송이로 나타났고, 세포의 집단 수도 많이 나타났다. 또한 AF 세포의 증식을 위한 WST 분석 결과, 모두 H 5 지지체의 증식이 가장 높게 나타났다. 표현형 분석을 위한 RT-PCR 결과, 10일차에서 H 5 지지체의 mRNA 발현도가 가장 높게 나타났다. 이러한 결과로, AF세포의 증식에 가장 도움을 주는 헤스페리딘의 함량은 5%일 때, 그 효과가 우수하여 디스크의 재생을 위한 지지체로서 긍정적으로 작용할 것으로 사료된다.

감사의 글: 이 논문은 한국연구재단 BK21플러스사업, 농림수산식품부 기술사업화 지원사업(814005-03-1-HD020), 생명산업기술개발사업(112007-05-3-SB010)의 지원을 받아 수행된 연구지원에 의하여 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. J. A. Buckwalter, *Spine*, **20**, 1307 (1995).
2. S. R. Bibby, D. A. Jones, R. B. Lee, J. Yu, and J. P. G. Urban, *Joint Bone Spine*, **68**, 537 (2001).
3. A. G. Hadjipaviou, J. W. Simmons, M. H. Pope, J. T. Necessary, and V. K. Goel, *Am. J. Orthop.*, **28**, 561 (1999).
4. S. H. Kim, S. J. Yun, J. W. Jang, M. S. Kim, G. Khang, and H. B. Lee, *Polym. Korea*, **30**, 14 (2006).
5. E. Hedbom and D. Heinegard, *J. Biol. Chem.*, **264**, 6898 (1989).
6. A. T. Yeung and C. A. Yeung, *Orthop. Clin. North Am.*, **38**, 363 (1989).
7. E. J. Carragee, M. Y. Han, P. W. Suen, and D. Kim, *J. Bone Joint Surg. Am.*, **85**, 102 (2003).
8. D. S. Choy, *J. Clin. Laser Med. Surg.*, **18**, 29 (2000).
9. A. A. Hegewald, J. Ringe, and M. Sittinger, *Thome. C. Front. Biosci.*, **13**, 1507 (2008).
10. S. J. Atlas, R. B. Keller, Y. A. Wu, and R. A. Deyo, *Spine*, **30**, 927 (2005).
11. S. Masato, A. Takashi, I. Masayuki, I. Miya, K. Toshiyuki, K. Makoto, and F. Kyosuke, *Spine*, **28**, 548 (2003).
12. S. Yang, K. F. Leong, Z. Du, and C. K. Chua, *Tissue Eng.*, **7**, 679 (2001).
13. J. H. Lee, E. Y. Kim, C. J. Lee, C. K. Joo, and G. Khang, *Inter. J. Tissue Regen.*, **4**, 53 (2013).
14. K. Nishida and T. Hirano, *Cancer Sci.*, **94**, 1029 (2003).
15. V. Karageorgiou and D. Kaplan, *Biomaterials*, **26**, 5474 (2005).
16. M. J. Whitaker, R. A. Quirk, S. M. Howdle, and K. M. Shakesheff, *J. Pharm. Pharmacology*, **53**, 1427 (2001).
17. K. N. Lowes, E. J. Croager, J. K. Olynyk, J. Abraham, and G. C. T. Yeoh, *J. Gastroent. Hepat.*, **18**, 4 (2003).
18. S. R. Cha, N. K. Jang, H. Kuk, E. Y. Kim, J. E. Song, C. H. Park, and G. Khang, *Inter. J. Tissue Regen.*, **5**, 84 (2014).
19. X. Zheng, F. Yang, S. Wang, S. Lu, W. Zhang, S. Liu, J. Huang, A. Wang, B. Yin, N. Ma, L. Zhang, W. Xu, and Q. Guo, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **22**, 693 (2011).
20. H. K. Makadia and S. J. Siegel, *Polymers*, **3**, 1377 (2011).
21. M. S. Taylor, A. U. Daniels, K. P. Andriano, and J. Heller, *J. Appl. Biomater.*, **5**, 151 (1994).
22. K. Athanasiou, G. G. Niederauer, C. M. Agrawal, K. Athanasiou, G. G. Niederauer, and C. M. Agrawal, *Biomaterials*, **17**, 93 (1996).
23. H. Y. Kim, S. J. Lee, Y. L. Kim, C. H. Park, S. Y. Kwon, J. W. Chung, D. Lee, and G. Khang, *Inter. J. Tissue Regen.*, **4**, 95 (2013).
24. C. C. Verheyen, J. R. Wijn, and C. A. Blitterswijk, *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**, 1115 (1993).
25. J. M. Anderson and M. S. Shive, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **28**, 5 (1997).
26. R. L. Rouseff, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**, 798 (1988).
27. H. S. Son, H. S. Kim, T. B. Kwon, and J. S. Ju, *J. Korea. Soc. Food Nutr.*, **21**, 136 (1992).
28. M. Isabelle, L. Gerard, C. Pascale, S. Odile, P. Nicole, B. Pierre, C. Pierre, and C. Josiane, *Biochem. Pharmacol.*, **45**, 13 (1993).
29. T. Guardia, A. E. Rotelli, A. O. Juarez, and L. E. Pelzer, *Il Farmaco*, **56**, 683 (2001).
30. G. Kaur, N. Tirkey, and K. Chopra, *Toxicology*, **226**, 152 (2006).
31. J. E. Song, C. R. Shim, Y. J. Lee, H. A. Ko, H. Yoon, D. Lee, and G. Khang, *Polym. Korea*, **37**, 323 (2013).
32. S. A. Cho, S. R. Cha, S. M. Park, K. H. Kim, H. G. Lee, E. Y. Kim, D. Lee, and G. Khang, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **25**, 625 (2014).