

인슐린을 함유한 키토산-폴리카프로락톤 복합 나노섬유 시트형 창상피복재의 특성평가

전가영 · 고영광 · 김동진 · 권오경* · 김원일** · 정호윤*** · 권오형†^{ORCID}

금오공과대학교 고분자공학과, *칠곡경북대학교병원 위암센터, **(주)원바이오젠,
***경북대학교 의과대학 성형외과, 세포외기질연구소
(2020년 3월 23일 접수, 2020년 4월 3일 수정, 2020년 4월 6일 채택)

Characterization of Chitosan-Poly(ϵ -caprolactone) Hybrid Nanofiber Sheets Containing Insulin for Wound Dressings

Ga Young Jun, Young-Gwang Ko, Dongjin Kim, Oh Kyoung Kwon*,
Won Il Kim**, Ho Yun Chung***, and Oh Hyeong Kwon†^{ORCID}

Department of Polymer Science and Engineering, Kumoh National Institute of Technology, Gumi, Gyeongbuk 39177, Korea

*Gastric Cancer Center, Kyungpook National University Chilgok Hospital, Daegu 41404, Korea

**R&D Center, Wonbiogen Co., Ltd., Gumi, Gyeongbuk 39372, Korea

***Department of Plastic and Reconstructive Surgery, CMRI, School of Medicine,
Kyungpook National University, Daegu 41944, Korea

(Received March 23, 2020; Revised April 3, 2020; Accepted April 6, 2020)

초록: 창상피복용 구조체는 생체적합성과 물리적 강도가 보장되고 외부의 감염균으로부터 상처부를 보호하면서, 상피층과 진피층의 재생을 촉진할 수 있도록 설계되어야 한다. 본 연구에서는 키토산과 poly(ϵ -caprolactone)(PCL) 및 인슐린 혼합물의 전기방사를 통해 나노섬유 시트형 창상피복재를 제조하였다. 혼합비율에 따른 각 나노섬유 시트의 미세구조분석, 원소조성분석, 인장시험, 생분해성, *in vitro* 약물방출능, 항균능, 세포증식 거동, *in vivo* 동물실험을 통하여 물리화학적 특성분석 및 창상치유능을 평가하였다. 키토산의 비율이 증가할수록 시트의 변형률이 감소하였고, 생분해성, 약물방출능 및 항균능은 증가하는 경향을 보였다. 동물실험 및 조직분석결과에서 키토산-PCL-인슐린 나노섬유 시트는 다른 나노섬유 시트보다 촉진된 상처회복률을 보였으며 창상피복용 소재로의 활용이 기대된다.

Abstract: The construct for wound dressings should be designed to promote the regeneration of the epidermal and dermal layers while ensuring biocompatibility and physical strength with protecting the wound from external infectious bacteria. In this study, nanofibrous sheet type wound dressings were prepared by electrospinning of a mixture of chitosan, poly(ϵ -caprolactone) (PCL) and insulin. The nanofiber sheets according to the mixing ratio were analyzed for physicochemical properties through structural analysis, elemental composition, tensile test, biodegradability, drug release behavior, antibacterial activity, cell proliferation behavior, and wound healing ability *via in vivo* animal testing. As the content of chitosan increased, the elongation of the nanofiber sheets decreased, and the biodegradability, drug release ability, and antibacterial activity tended to increase. In animal experiments and histological analysis, the accelerated wound healing rate of the chitosan-PCL-insulin nanofibrous sheet was verified when compared to other nanofiber sheets, and thus it is expected to be used as a wound dressing material.

Keywords: chitosan, poly(ϵ -caprolactone), insulin, nanofiber, wound dressing.

서 론

조직공학 및 재생의료기술의 발달은 체외 조직배양을 통한 인공피부, 인공혈관, 인공연골, 인공골 등을 실용화하고 있으며 다양한 의공학적 제품에 관한 연구 및 생산공정을 고도화

단계로 진입시키고 있다.¹⁻³ 인체조직 중에서 피부는 가장 큰 표면적을 차지하면서 방어기능을 담당하는 기관으로^{4,5} 외부의 미생물, 자외선, 화학물질 등 여러 가지 유해환경으로부터 인체를 보호하며 인체의 수분증발을 억제함으로써 탈수를 방지하고 체온을 조절하는 역할을 하고 있어, 물리적 자극에 강해야 하고 투습성이 있어야 한다. 인체는 심한 화상, 외상, 창상, 욕창, 피부질환 등 다양한 원인에 의한 피부손상이 흔하게 일어나고 있는데, 특히, 일차봉합이 불가능한 창상은 피부

†To whom correspondence should be addressed.
ohkwon@kumoh.ac.kr, ORCID[®] 0000-0002-7160-0105
©2020 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

이식이 불가피하여 상기와 같은 기능수행에 심각한 결함을 남기기도 한다. 따라서 손상된 피부조직의 복구는 중요한 문제이며, 이를 위한 방법으로 환자 본인의 피부를 이식하는 자가이식(*autograft*), 타인의 피부를 이식하는 동종이식(*homograft*, *allograft*) 및 동물의 피부를 이식하는 이종이식(*heterograft*, *xenograft*)의 세 가지 방법이 있다. 인공피부는 일시적 피복형, 이른바 창상피복재와 배양피부 또는 체내 이식용인 영구생착형의 두 가지로 대별된다. 창상피복재는 피부손상에 대하여 상처치유, 항균, 흉터조직 형성억제 등의 효능을 갖게 하고, 체내로부터 수분 누출방지, 삼출액의 흡수 및 외부로부터 유해균 침입과 감염방지의 역할을 한다. 현재까지 주로 사용되고 있는 창상피복용 드레싱재는 부직포형, 필름형, 하이드로콜로이드형, 하이드로젤형, 폴리우레탄 폼형 등이 있으며 콜라겐 및 젤라틴이나 천연 다당류인 알지네이트, 카복시메틸셀룰로오스, 히알루론산, 키틴, 키토산을 이용한 다공성 소재나 돈피의 동결건조물 등으로 다양하게 제품화되어 임상학적으로 적용되고 있다.

1962년 G. D. Winter에 의해 피부의 창상치유가 습윤 환경 하에서 탁월한 효과를 보인다는 것이 발표된 이래, 이를 검증하는 많은 결과가 보고되었고, 현재는 창상치유의 방법이 종래의 건조환경의 거즈 방법에서 습윤환경의 드레싱재 방법으로 빠르게 전환되고 있다.⁶ 효율적인 창상치유를 위해서는 폐쇄성 드레싱재를 적용하여야 하며 습윤환경을 유지하는 것이 필수적이므로 적합한 제조방법에 의한 드레싱재의 형태, 물성 및 재료선택은 창상치유를 신속하게 하고 이차적인 각종 부작용을 최소화하기 위해 매우 중요하다. 이렇듯 매년 수 백만명 이상에서 발생하는 창상, 화상, 욕창 및 당뇨 등으로 인한 피부궤양 환자에게 적용할 수 있는 인공피부 제품은 손상피부의 재생 및 회복에 매우 효과적임이 밝혀짐에 따라 인공피부 제품의 지속적인 개발 및 상용화가 촉진되고 있다. 한국에서 인공피부를 연구개발하고 있는 업체로는 (주)바이오솔루션, (주)테고사이언스, (주)한스바이오메드 등이 있고, 키틴을 원료로 하는 키틴 부직포(*Beschitin WTM*)와 키틴 필름(*Tegasorb™*), 키틴의 탈아세틸화물인 키토산과 콜라겐의 혼합 다공성 소재가 개발되어 상업화에 성공한 사례가 있다.^{4,9}

새우나 게의 껍질로부터 제조되는 키틴은 지구상에서 셀룰로오스 다음으로 많이 존재하는 천연 고분자재료이며, 키토산은 키틴의 탈아세틸화물의 총칭이다. 이러한 키토산은 약산에 용해되며, 분자내 (+)이온을 가지고 있으며, 항균성, 무독성, 환경 친화성, 생분해성 및 생체 적합성이 우수하여 여러 의료용 분야에 많이 활용되고 있는데 특히, 키틴의 구성단위인 *N*-아세틸글루코사민과 키토산의 구성단위인 글루코사민이 상처치유에 관여한다. 키토산을 주성분으로 한 창상치료재는 세균의 감염을 막아 염증 및 흉터발생률이 낮다고 보고되었다.⁹ 실제로 일본에서는 키틴을 활용한 화상 치료용 인공피부를 개발하여 일반 병원이나 화상치료 전문 병원

에서 의료용으로 키토산 인공피부를 입혀서 신생피부조직이 생성될 때까지 적용하고 있다. D. K. Singh는 키틴과 키토산 및 이들을 이용한 화합물을 이용한 상처 치유제, 인공피부, 약전성 재료, 혈액응집제, 인공신장막, 생분해성 수술용 봉합사, 항균성 재료로의 적용 가능성과 우수한 성능을 보고한 바 있으며,¹⁰ 흉터를 예방하고 상처치유를 촉진할 수 있다는 연구결과가 있어 창상피복용 소재로의 응용이 유망하며 키토산이 가지고 있는 생체적합성, 항균성, 생분해성, 양이온성 및 급속이온 흡착능 등의 성능이 밝혀짐에 따라 다양한 의료용 소재분야에서의 제품개발이 활발히 진행 중이다.⁹⁻¹⁵ 다양한 창상피복용 제품의 형태 중에서 부직포형 섬유소재는 높은 비표면적과 유연성을 가지므로 전통적으로 광범위하게 응용된다. 섬유를 제조하는 방법 중 하나인 전기방사는 수 kV 이상의 고전압에 의한 정전기력에 의해서 고분자용액 혹은 고분자 용융체가 저장소의 노즐을 통해 집전판으로 방사되면서 수십~수백의 나노직경 섬유를 제조할 수 있는 기술이다. 전기방사법은 섬유의 직경, 표면특성, 물성, 기공 구조 및 분포, 다공도, 제품의 두께, 복합화 등의 설계가 용이하여 다양한 소재산업에 적용되고 있다.¹⁶⁻²⁷ 그러므로 키토산 기반의 부직포 나노섬유 시트형 창상피복재의 연구개발은 필수적이라고 할 수 있다.

더불어 상처의 자가치유 임계 결손면적을 초과한 창상조직은 일차봉합이 불가능하므로 기존의 창상피복재가 가지는 습윤환경 조성 및 방오기능과 더불어 창상부위에서의 상피 및 진피층의 재생을 촉진시킬 수 있는 기능이 추가되어야만 피부조직의 흉터, 수축 및 후유증을 최소화할 수 있다. 당뇨병의 치료에서 혈당을 낮추는 물질로 잘 알려진 인슐린은 이자의 랑게르한스섬에서 분비되는 생리활성 호르몬으로 세포의 성장을 촉진할 수 있는 기능성 약제로서 조직공학분야에서 자주 적용되고 있으며, 나노섬유 시트형 창상피복재에 용이하게 복합화할 수 있다.²⁸ 고기능성 창상피복재 및 인공피부를 통한 손상피부 치료법은 현재까지 사용되고 있는 기본적인 치료법에 비해 창상의 완전한 치유에 요구되는 공여부 면적의 감소, 수술과정 및 입원기간 감소, 흉터감소 등 환자의 편의 및 의료비 면에서 많은 이점을 가질 수 있다. 특히 자가 혹은 타가 각질세포, 진피의 섬유아세포와 콜라겐, 히알루론산과 같은 생물학적 매트릭스 등을 이용하여 제조되는 조직공학적인 인공피부는 넓은 부위의 피부손상을 치료해줄 수 있기 때문에 광범위하게 연구되고 있다.

본 연구에서는 천연고분자인 키토산의 분자량, 탈아세틸화도에 따른 나노섬유 시트의 대량방사 공정상 불안정한 재현성 및 물리적 취약점을 생분해성 합성고분자인 폴리ε-카프로락톤(*poly(ε-caprolactone)*, *PCL*)을 도입함으로써 해결하고자 하였고,²⁹ 이로 인해 천연고분자가 가지는 약한 기계적 물성을 극복하고, 세포성장인자인 인슐린을 첨가하여 창상치료 효율을 향상시키고자 하였다. 더불어, 동물모델실험의 창상회복률

평가를 통해 키토산-PCL-인슐린 나노섬유 시트의 창상치료 재료의 성능을 확인하고, 키토산-PCL 나노섬유 시트의 인공 피부배양용 지지체로의 응용가능성을 제시하고자 한다.^{28,33}

실 험

키토산-PCL-인슐린 혼합용액 및 나노섬유 시트의 제조. 나노섬유의 주재료인 키토산(9.8 cPs, 탈아세틸화도: 96.58%)은 삼성키토피아(Korea)에서 구입하였고, 폴리카프로락톤(poly(ϵ -caprolactone), PCL, M_n 80000 g/mol)은 Sigma Aldrich(USA)에서 구입하였다. 키토산-PCL 혼합용액의 제조에는 각각의 물질에 대한 용해성이 우수하고, 두 용액과의 혼화성 용매로 키토산의 높은 용해성을 지닌 90 v/v% 아세트산 수용액과 PCL의 용매로 2,2,2-trifluoroethanol(TFE)를 선택하였다. 창상치료제의 세포재생능을 향상시키고자 도입한 인슐린(insulin powder, bovine pancreas, BioReagent)과 정량분석용 Bradford reagent는 Sigma Aldrich(USA)에서 구입하여 사용하였다.

전기방사에 있어서는 다양한 공정인자 중 섬유형태에 중요한 영향을 주는 용액의 농도, 인가전압, 방사거리, 유체속도, 집전판의 형태, 온도 및 습도에 따른 각각의 나노섬유를 제조하여 미세구조를 분석한 후, 재현성이 높은 방사조건을 검토하고 대량방사하여 회수하는 방법으로 진행하였다. 사용한 장치의 구성은 0~40 kV의 전압공급이 가능한 직류 고전압 발생장치(DC high voltage generator(40 kV/3 mA, Chungpa EMT Co., Korea), 평판형태(plate type support jack, 200 × 200 mm, stainless steel)의 집전판(collector), 고분자용액을 일정한 유량(volume)과 토출속도(feeding rate)로 제어하는 주사기펌프(syringe pump, KDS220, KD Scientific Inc., USA), 부피 10.0 mL인 주사기(Hamilton81620 gastight syringe, USA), 금속 바늘(Hamilton91022 metal hub needle, 22 Gauge, length: 50.8 mm, inner diameter: 0.41 mm, USA) 및 디지털 온/습도계(JB913R, Oregon scientific Inc., USA)로 구성하였다. 집전판에는 알루미늄 호일을 부착하여 추후 방사된 섬유를 용이하게 분리해내도록 하였다. 목재챔버 내부는 항온 및 항습조건을 유지하였다. 각각의 키토산-아세트산 수용액 8 wt% 및 PCL-TFE 8 wt% 용액을 제조 후, 3:7, 5:5, 7:3의 3가지 혼합비율로 방사용액을 제조하였고, 인슐린 분말은 키토산과 PCL의 합산 고형중량의 3 wt% 함량으로 첨가하고 완전히 용해시킨 직후 전기방사에 이용하였다. 방사조건은 1 mL/h의 속도로 토출하였고, 주사기 말단과 집전판 사이의 거리는 15 cm로 고정하여 15~25 kV의 전압에서 방사하여 최적의 조건을 검토하였다. 한편, 키토산-PCL 복합 나노섬유와 직경이 유사한 PCL 단독의 나노섬유의 제조는 methylene chloride(MC)/dimethylformamide(DMF)의 비가 6/4인 공용매를 사용하였다. MC가 PCL의 양용매이기 때문에

완전히 용해시킨 후 DMF를 첨가하여 혼합하였다. 방사조건은 토출속도를 1 mL/h로 고정시키고, 전압 20 kV, 방사거리 20 cm로 설정하였다. 습도는 30% 이하로 건조한 조건을 유지하여 5시간 동안 방사된 나노섬유를 수득하고 진공오븐에서 약 4시간 정도 건조하여 잔류용매를 제거한 후, 에탄올을 이용하여 잔류용매를 완전히 중화하여 나노섬유 시트를 회수하였다. 각 시편은 실험군으로 키토산과 PCL의 혼합비율이 3:7, 5:5, 7:3인 나노섬유 시트(C3P7, C5P5, C7P3) 및 인슐린을 함유한 나노섬유 시트(C3P7-i, C7P3-i), 대조군으로 PCL 단독 나노섬유 시트(C0P10)로 설정하여 실험에 사용되기 전까지 냉장보관하였다.

미세구조 및 표면 특성 분석. 전기방사법으로 제조된 나노섬유는 주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM, JSM-6380, JEOL, Japan)을 이용하여 섬유형태 및 직경을 관찰하였다. 모든 시료는 공기 중의 수분에 의한 분해 및 변형을 방지하기 위해 밀봉하여 운반하였으며, 시료표면을 관찰하기 전에 sputter coater(108auto, degree of vacuum: 0.001 mb, Cressington Scientific Instruments Inc., UK)를 이용하여 150 초간 가속전압 10 kV로 gold coating 처리하였다. SEM을 통해 얻어진 나노섬유의 이미지는 영상분석기(IMT i-solution ver 7.6, Image & Microscope Technology Inc., Korea)를 이용하여 250개의 섬유직경을 측정하여 평균직경을 산출하였다.

나노섬유를 구성하는 키토산, PCL 및 인슐린 함유에 따른 각 나노섬유 시트의 원소조성과 분포를 확인하기 위하여 elemental analyzer(EA 1108, Italy)와 energy dispersive X-ray spectroscopy(EDS)를 이용하였고 mapping을 통하여 검출된 원소들을 시료 표면에 점으로 표시하였다.

기계적 물성 분석. 제조한 나노섬유 시트의 기계적 물성을 측정하기 위해 universal testing machine(UTM, Instron 4467, USA)을 이용하여 인장시험을 하였다. 시편제작 및 시험방법은 ASTM D638에 의거하여 100 N의 load cell을 5 mm/min의 extension rate로 5회 이상 측정하였다. 측정수치는 변환하여 영률(Young's modulus)과 인장강도(tensile strength) 및 파단신율(elongation at break)을 산출하였다.

In Vitro 생분해 및 약물방출 거동. 각 나노섬유 시트들의 생분해 거동을 분석하기 위하여 시트를 정사각형 크기(1 × 1 cm)로 재단 후, 24-well tissue culture plate 바닥에 고정시키고 1 mL phosphate buffered saline(PBS) 용액을 투입 후 incubator(MCO-15AC, 37°C, 5% CO₂, SANYO, Japan)에서 시간경과에 따른 섬유의 변형 및 수축을 관찰하였다. 시간에 따라 회수한 시편은 각 vial에 넣고 진공오븐(24시간, 25°C)에서 완전히 건조 후 SEM으로 나노섬유의 형태변화를 분석하였다.

인슐린과 같은 단백질은 20여 가지의 아미노산들이 다양하게 결합되어 단백질의 크기, 구조 그리고 물리화학적 특성의 다양성을 나타내기 때문에 방출거동 분석은 필수적 요소이

다. 본 연구에서는 나노섬유 시트의 표면 및 내부에 도입된 성장인자인 인슐린의 방출거동을 조사하기 위해 제조된 시편 (1×1 cm)을 튜브에 넣고, 1 mL PBS 용액을 투입 후, 항온조 (37°C)에서 시간경과(1, 3, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50일)에 따른 약물방출거동을 분석하였다. 단백질분석법 중 Coomassie Brilliant Blue R-250 염색시약을 이용한 Bradford assay법으로 진행하였으며, 키토산과 PCL 혼합비율이 3:7, 7:3 인 나노섬유에 함유된 인슐린의 방출거동을 조사하였다. Bradford assay법은 반응시간이 짧고 간단하게 단백질을 염색하는 정량법으로, ELISA reader(multi-well microplate reader)를 이용하여 590 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질 농도에 따른 표준보정곡선을 작성하였다. 그리고 측정하고자 하는 시료를 96-well plate에 100 µL를 넣고 blank에는 PBS를 100 µL 넣어 Bradford reagent를 각각 100 µL 넣고 30초간의 진탕 후, 5분 동안 반응시켜 흡광도를 측정하고 인슐린을 정량하였다.

항균성 시험. 키토산의 특성 중의 하나인 항균성의 평가는 시험균주로 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus* strain 209, American Type Culture Collection No.6538, USA)과 폐렴균(*Klebsiella pneumoniae*, American Type Culture Collection No.4352, USA)을 선택하여 KS K0693 시험법에 의거하여 실험을 실시하였다. 각 종류의 균주를 뉴트리언트 한천 평면배지에 이식하고, 37°C에서 24~48시간 진탕 배양하여 $1 \pm 0.3 \times 10^5$ 개/mL가 되도록 시험 균액을 제조하였다. 실험균으로 키토산과 PCL 비가 3:7, 5:5, 7:3인 나노섬유 시트(C3P7, C5P5, C7P3), 대조군으로 PCL 나노섬유 시트(C0P10)를 사용하여 항균성을 확인하였다. 시험균액을 접종한 유리용기를 37°C에서 18시간 배양하고 가능한 한 빨리 접종된 대조편을 담고 있는 유리용기에 0°C의 중화용액 20 mL 투입하고, 진탕 후 각 검체로부터 균액을 추출하고 생리식염수를 이용하여 계속 해서 희석시킨다. 희석액은 100 µL를 뉴트리언트 한천 평판 배지에 이식하여 37°C에서 24시간 배양하여 생성된 균수를 통해 항균성을 산출하였다.

섬유아세포의 증식거동. 나노섬유 시트 표면에서의 세포접착 및 성장을 조사하기 위해 섬유아세포를 파종하여 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay로 세포증식거동을 분석하였다. 5 mg/mL MTT를 PBS(-)에 용해하여 stock solution을 제조하고 4°C에서 냉장보관하였다. 측정방법은 24 well cell culture plate에 섬유아세포가 포함된 나노섬유 시트를 배치하고 MTT stock solution을 1 mL를 넣은 후 4시간 동안 배양한다. MTT stock solution과 남아있는 배지는 제거한 후, dimethyl sulfoxide 1 mL를 투입하여 용출하였다. 그 후 540 nm에서의 흡광도를 microplate reader(Opsys Mr, Dynex Tech.Inc., Korea)로 측정하였다.

SD Rat을 이용한 In Vivo 실험. 인슐린을 함유한 키토산-PCL 나노섬유 시트의 창상치유율을 평가하기 위하여 outbred male Sprague Dawley rat(효창사이언스, 8주령, 230-280 g)을

이용하였고, 실험실에서 일주일간 적응시킨 후 피부 전층 결손 창상모델 *in vivo* 실험을 진행하였다. 동물실험은 경북대학교병원 동물실험윤리위원회의 시행규정 및 승인에 의해 진행하였다(동물윤리 승인번호: 2017-0131). 척추 중앙에서 2 cm 아래에 개체당 4개소의 지름 2.0 cm의 전층창상을 유발 후 대조군으로서 창상피복재로 상처부위를 처치하지 않은 rat과 실험군으로는 창상피복재를 처치한 rat들에 대하여 2일마다 wound area를 측정하고 치료의 경과를 살펴보았다(n=12). 조직염색을 위해 2일, 6일, 10일차에 rat을 diethyl ether로 안락사시키고 창상을 포함한 조직을 채취하였다. 0일차 창상의 표면적과, 각 일차별 측정된 상처의 표면적을 영상분석기(IMT i-solution, ver 7.6, Image & Microscope Technology Inc., Korea)를 이용하여 창상회복율을 산출하였다. 조직을 채취하면서 탈거한 나노섬유 시트의 섬유형태, 수축 및 파단면을 SEM을 통하여 관찰하였다.

조직학적 관찰. 채취한 조직의 창상치유 정도와 진피의 형성여부를 평가하기 위하여 hematoxylin-eosin(HE) 염색을 실시하였다. 채취한 조직을 10% 포르말린 용액으로 고정시킨 후 탈수, 파라핀 포매 후 마이크로톰을 이용하여 5 µm 두께로 절편한다. 절편조직을 염색 후 광학현미경(Eclipse TS100, Nikon, Japan)을 통해 관찰하였다.

통계분석. 정량적인 측정수치의 유의성 평가는 통계분석 소프트웨어(KyPlot version 2.0, KyensLab, Inc.)를 사용하여 분석하였다. 각 수치는 평균±표준편차로 표기하였으며 significance level은 parametric Student's t-test와 one-way ANOVA (analysis of variance)의 Tukey's 사후검증법으로 판별하였다. 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 의 값으로 설정하였다.

결과 및 토론

키토산-PCL-인슐린 나노섬유의 미세구조 및 표면 특성. 방사용액의 농도에 따른 점도는 전기방사에 의해 얻어지는 극세섬유의 구조 및 직경에 가장 큰 영향을 준다. 점도가 너무 높을 경우 표면장력의 극대화과 유체의 흐름성이 현저히 낮아져 방사가 어려우며, 굵은 섬유가 형성되고, 너무 낮을 경우 고분자 사슬의 얽힘에 의한 섬유형태가 어려워 미립구가 혼재한 섬유형태가 얻어진다. 본 연구에서의 주재료인 키토산-아세트산 수용액은 농도가 증가할수록 점도는 지속적으로 증가하기 때문에 이를 극복하기 위해 PCL-TFE 용액을 혼합함으로써 전기방사가 가능한 농도를 유지하면서도 점도를 낮추어 원활한 방사가 이루어질 수 있도록 하고, 키토산이 가지는 소재의 고유특성을 유지하면서 PCL이 가지는 우수한 물성의 나노섬유 시트를 제조하고자 하였다. 더불어, 고기능성 창상피복재를 제조하기 위하여 키토산-PCL 나노섬유에 세포의 성장을 촉진하는 성장인자 중 하나인 인슐린을 도입하였다. 각 시편은 실험군으로 키토산과 PCL의 혼합비율이

3:7, 5:5, 7:3인 나노섬유 시트(C3P7, C5P5, C7P3) 및 인슐린을 함유한 나노섬유 시트(C3P7-i, C7P3-i), 대조군으로 PCL 단독 나노섬유 시트(C0P10)로 설정하여 물리화학적 특성 및 창상회복률을 분석하고자 하였다. 전기방사 공정변수는 토출 속도, 전압, 방사거리의 조절을 통하여 재현성있는 나노섬유 시트가 제조되는 조건으로 최적화하였으며, SEM과 영상분석기를 통해 섬유직경이 평균 250~180 nm 범위의 비교적 균일

한 분포를 갖는 나노섬유들이 얻어진 것을 확인할 수 있었다 (Figure 1). 키토산의 비율이 증가할수록 나노섬유의 평균직경이 감소하는 경향을 보였으며, 인슐린을 첨가한 나노섬유에서는 극세한 섬유직경의 비율이 증가하였다(Figure 1(K), 1(L)).

키토산-PCL 나노섬유에 함유된 키토산의 확인과 인슐린이 함유된 키토산-PCL-인슐린 나노섬유에서의 인슐린 함유여부 및 분포를 확인하기 위해 PCL 단독 나노섬유(C0P10)를 제

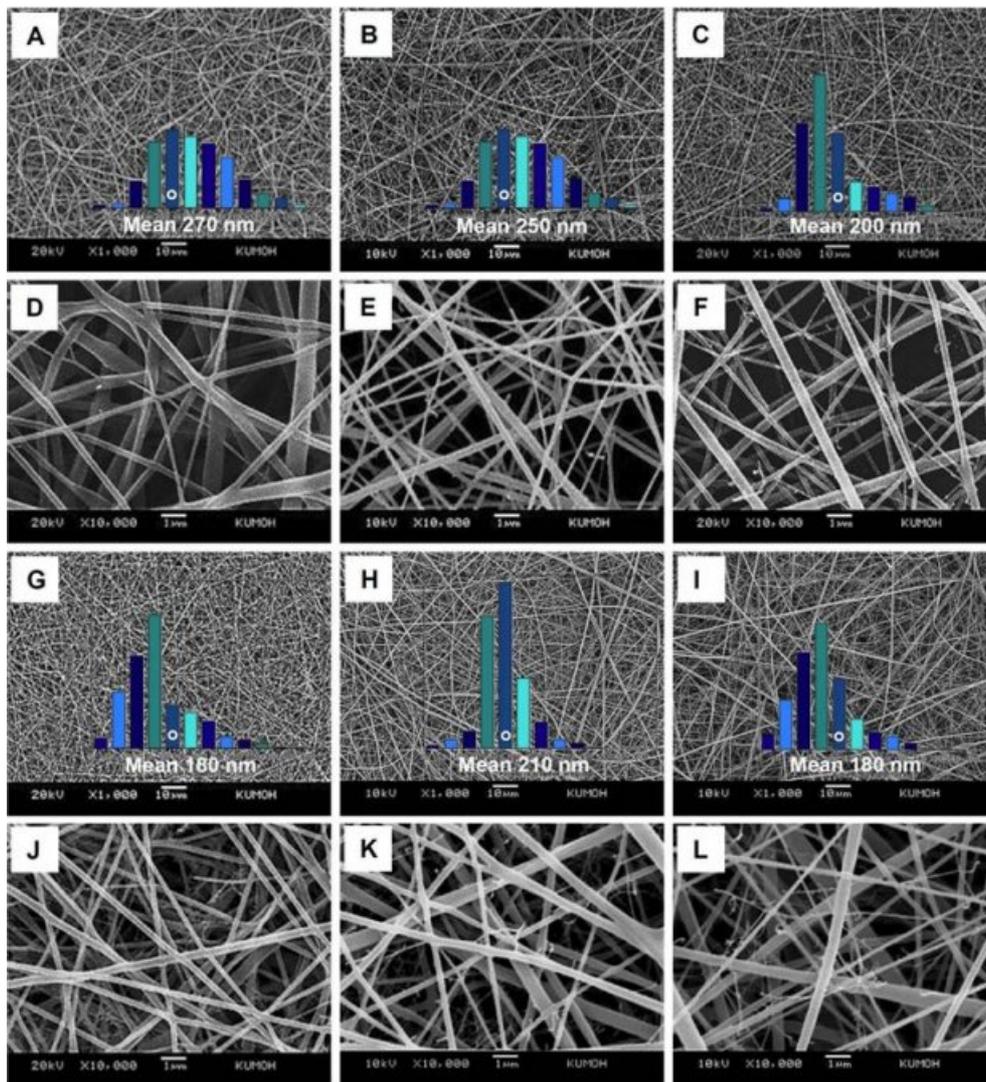


Figure 1. SEM micrographs and fiber diameter distribution of C0P10 (A, D), C3P7 (B, E), C5P5 (C, F), C7P3 (G, J), C3P7-i (H, K), C7P3-i (I, L) nanofiber sheets. The ◦ marks in bar charts indicate 200-250 μm in diameter distribution.

Table 1. Atomic Compositions of PCL, Chitosan-PCL, and Chitosan-PCL-Insulin Nanofiber Sheets

Atom	C0P10	C3P7	C5P5	C7P3	C3P7-i	C7P3-i
C (%)	63.05	56.02	51.50	45.96	55.80	46.34
H (%)	9.27	8.56	8.11	7.72	8.55	7.75
N (%)	0.00	2.25	3.45	4.78	2.75	5.27

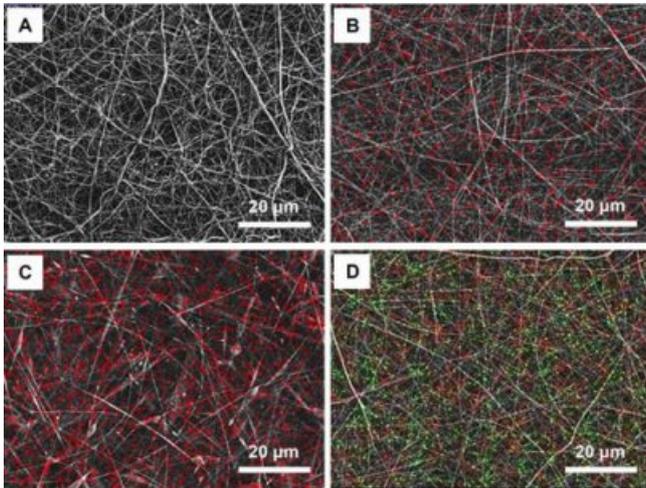


Figure 2. Photomicrographs, fiber diameter distribution and energy dispersive spectroscopy (EDS) mapping of C0P10 (A); C3P7 (B); C7P3 (C); C7P3-i (D) nanofiber sheets. (red dots: Nitrogen, green dots: Sulfur).

조하여 구성하는 원소(C, H, O, N)의 함량을 정량함으로써 키토산 및 인슐린 함유에 따른 원소조성을 확인하였다. PCL 단독 나노섬유에서 나타나지 않는 질소가 키토산이 함유된 키토산-PCL 나노섬유에서 그 함량이 증가할수록 질소의 함량 또한 미량 증가함을 확인할 수 있었다(Table 1). 또한 인슐린을 함유한 나노섬유의 경우 함유하지 않은 나노섬유와 비교하여 질소의 함량이 미량이지만 증가함을 알 수 있는데 이는 인슐린 내의 아마이드결합에 의한 결과라고 예측된다.

한편, 키토산과 인슐린이 나노섬유 상에 어떻게 분포되어 있는지를 확인하기 위해 SEM의 이미지를 EDS를 통해 측정하고 원소 mapping을 통해 관찰하였다. 각 원소의 mapping을 통해 키토산이 가지고 있는 질소(N) 원소와 인슐린이 가지고 있는 소량의 황(S) 원소를 확인하였다(Figure 2). EDS를 통해 확인된 원소분포분석 결과와 원소조성분석의 결과와 종합하여 인슐린이 나노섬유 상에 함유되어 있으며, 나노섬유 전체에 키토산과 인슐린이 균일하게 분포되어 있음을 확인할 수 있었다.

나노섬유 시트의 기계적 물성 분석. 키토산과 PCL의 혼합 비율에 따른 나노섬유를 대량방사하여 기계적 물성을 측정하고 인장응력과 변형(stress-strain)에 관한 결과값을 수록하였다. 각 그룹당 측정된 시편의 영률(Young's modulus)과 인장

강도(tensile strength) 및 파단신율(elongation at break)을 산출하여 Table 2에 나타내었다. 나노섬유 시트에서 PCL의 비율이 증가할수록 파단신율은 증가되지만 인장강도와 영률은 감소하는 경향을 보였다. 반면, 키토산의 비율이 증가할수록 파단신율은 감소하고, 탄성률과 인장강도는 증가하였다. 키토산은 천연고분자들 중에서도 기계적 물성은 우수한 편이나 합성고분자에는 미치지 못한다. 생체적합성, 생분해성이 우수한 PCL은 합성고분자 중에서도 특히 파단신율이 우수한 고분자이다. PCL의 도입은 기계적 물성을 보완해주는 역할을 함으로써 나노섬유 시트의 핸들링을 용이하게 해주어 생의학적으로 다양한 응용이 가능하고 반복적인 마찰 및 접힘에 의한 물리적 파절로부터 창상부를 안전하게 보호해줄 수 있다.

In Vitro 생분해 거동. 대부분의 생의학용 소재는 일정한 기간 경과에 따라 가수분해가 진행된다. PCL은 생분해성 합성고분자로 다른 생체고분자에 비해 분해속도가 느리나, 표면적이 극대화된 나노섬유 형태에서는 분해기간이 단축될 수 있다. 따라서 키토산과 PCL의 혼합비율 및 인슐린 함유에 따른 나노섬유 시트의 생분해 거동의 분석이 필요하다. Figure 3에서와 같이 키토산의 함량이 높은 C7P3 및 C7P3-i 나노섬유 시트군에서 3일차에 나노섬유의 팽윤거동이 시작되어 섬유형태를 확인할 수 없을 정도의 생분해가 일어나기까지 약 30일 정도가 소요되는 것으로 관찰되었다. 생분해는 아주 서서히 일어나며 섬유가 파단되는 현상과 섬유의 형태가 붕괴되는 현상, 빈공간이 생성되는 현상이 복합적으로 발생하면서 진행되었다. 한편, 인슐린이 함유된 C7P3-i 나노섬유 시트군의 20일차 사진에서는 나노섬유의 형태가 사라지고 분해물 형성이 관찰되었다. 이는 인슐린에 의한 나노섬유 표면의 친수성 증가로 인해 가수분해가 촉진된 것으로 사료된다.

In Vitro 인슐린 방출거동. 의약품 소재의 용도와 치료기간에 따른 약물의 초기 방출속도와 지속시간은 생체조직의 재생 메커니즘에서의 창상회복단계별 세포증식 속도와 맞물려서 고려해야 하는 요소이다. 당뇨병 치료제로 혈당을 낮추는 물질인 인슐린은 피부조직 세포들의 성장과 증식에 관여한다.²⁸ 본 연구에서는 Bradford assay를 이용하여 나노섬유 시트에서 방출된 인슐린을 정량하였으며, Figure 4에서와 같이, 7일차까지는 20% 이하의 인슐린이 방출되었으나, 10일차에는 C7P3-i 그룹에서 60% 이상의 급격한 방출이 확인되었다. 전반적으로 C7P3-i 그룹이 C3P7-i 그룹에 비해 방출속도가 빠른 것을 확인할 수 있으며 이는 키토산의 함유량이 증가함

Table 2. Mechanical Properties of PCL and Chitosan-PCL Nanofiber Sheets

Property	C0P10	C3P7	C5P5	C7P3
Young's modulus (MPa)	23.89 ± 10.97	147.90 ± 16.87	252.10 ± 10.70	399.20 ± 9.02
Tensile strength (MPa)	3.44 ± 0.98	7.17 ± 0.13	7.29 ± 0.36	9.64 ± 0.37
Elongation at break (%)	91.98 ± 0.16	17.02 ± 0.54	6.27 ± 0.40	4.38 ± 0.39

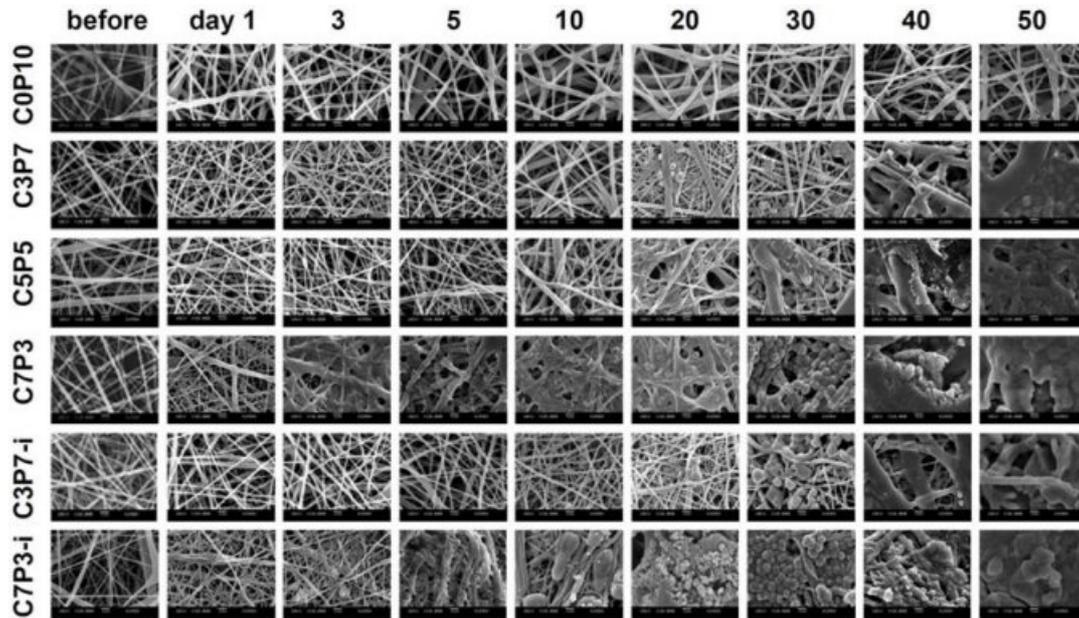


Figure 3. Photomicrographs of biodegraded hybrid nanofiber sheets as function of incubation time.

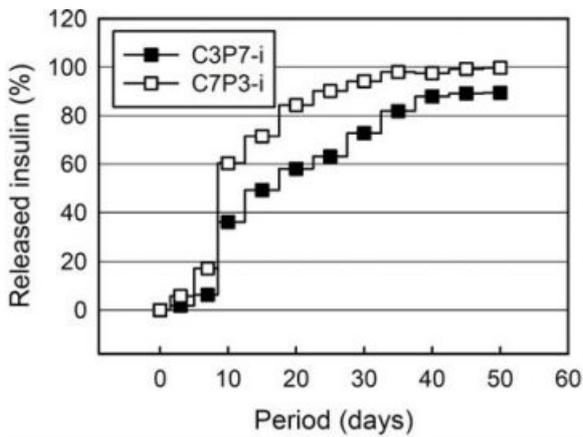


Figure 4. Insulin release profile from chitosan-PCL-insulin hybrid nanofiber sheets determined by Bradford method.

에 따라 생분해에 의한 인슐린의 방출량이 증가한 것으로 사료된다. 이로써 초기에 방출되는 인슐린은 세포의 초기접착에 유리하게 작용하며 이후의 분해에 따른 인슐린의 누적방출량은 세포증식에 지속적인 자극제로 작용할 것으로 사료된다. 또한 창상치료용 키토산-PCL-인슐린 나노섬유 시트로부터 인슐린의 지속적인 서방은 진피세포에 효과적 성장인자로 작용할 수 있을 것으로 사료된다.

항균성 테스트. 나노섬유 시트에 포함된 키토산의 항균능을 분석하기 위하여 시험균주로 황색포도상구균과 폐렴균을 이용하였다. PCL 단독 나노섬유는 두 가지 시험균주에서 각 60% 및 12%의 저조한 항균능을 보였으나, 키토산을 함유한

Table 3. Antimicrobial Activity of PCL and Chitosan-PCL Nanofiber Sheets

Strain	C0P10	C3P7	C5P5	C7P3
<i>Staphylococcus aureus</i> (%)	60.00	99.80	99.93	99.99
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (%)	16.22	89.40	95.79	99.47

나노섬유에서 황색포도상구균과 폐렴균 모두 약 90% 이상의 높은 항균성을 보였으며, 키토산의 함유량이 30%에서 70%로 증가할수록 폐렴균에 대한 항균능이 10% 정도 향상됨을 확인할 수 있었다(Table 3). 이는 본 연구의 키토산 분자량이 9900~53000 g/mol로 고유 항균능도 보유하지만 극대화된 비표면적을 가진 나노섬유의 형태학적 특성에 의해 소재의 항균능이 증폭되었다고 사료된다.

세포의 증식거동 분석. 본 연구에서 제조된 키토산-PCL 또는 인슐린을 함유한 키토산-PCL 나노섬유 시트의 세포접착 및 증식거동을 조사하기 위해 섬유아세포를 배양하여 분석하였고, 대조군으로는 단독으로 PCL을 방사한 나노섬유 시트를 사용하였다(Figure 5). PCL 대조군(C0P10)에서도 우수한 세포접착성을 가짐을 확인하였으나 C3P7 나노섬유 시트의 경우 C0P10 나노섬유 시트보다 일관적으로 우수한 세포접착 및 증식거동을 보였다. 이는 키토산의 생체적합성 뿐만 아니라 소수성 고분자인 PCL에 친수성 고분자인 키토산이 혼합되면서 상대적으로 친수화되어 세포접착에 유리한 표면형성에 의한 결과로 사료된다. 반면, C7P3 나노섬유 시트의 경우

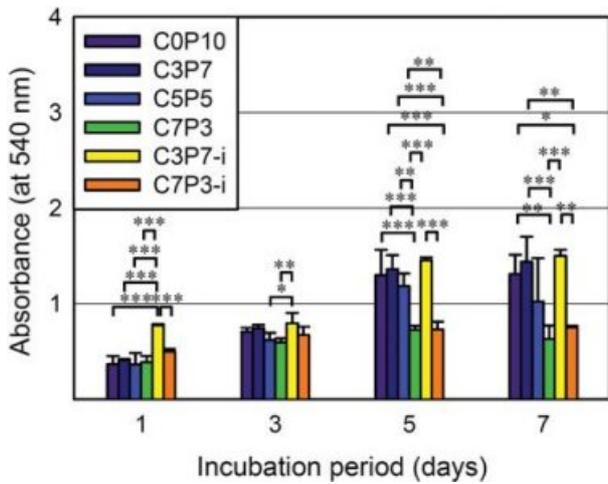


Figure 5. Cell proliferation on the chitosan-PCL-insulin hybrid nanofiber sheets as function of incubation period (n=5) (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

다른 실험군보다 현저히 낮은 세포증식 거동을 보이는데 이는 친수성인 키토산이 다량 함유됨으로써 세포배양액을 흡수하여 수화젤과 유사한 부드러운 막 형태로 변하기 때문에 세포배양 지지체 표면으로서 형태를 충분히 제공하지 못하기 때문으로 사료된다. 키토산의 함유량에 상관없이 동일한 키토산과 PCL의 비율에서 인슐린이 함유되었을 때 함유하지 않은 나노섬유 시트에 비해 다소 증가한 성장거동을 보였다. 당뇨병의 치료제로 혈당을 낮추는 물질로 잘 알려진 인슐린은 배양세포에서 증식을 유도하고 생체 내에서 성장조절에 관여하는 역할을 하는데 키토산-PCL 나노섬유 시트에 함유된 소량의 인슐린이 세포의 성장에 도움을 주는 성장인자로서 작용하여 세포배양 중 세포의 활성이 촉진되었기 때문인 것으로 사료된다.

In Vivo 창상회복률. 본 연구의 목적은 피복형 창상치료제로 키토산을 함유하는 나노섬유 시트를 제조하고 특성을 분석하는 것이며, 차후 체내 이식용인 영구 생착형 배양피부를 위한 조직공학용 지지체로 적용가능성을 제시하는 것이다. 이와 같은 목적을 검토하기 위해 거즈 및 5종류의 나노섬유 시트 시료를 이용하여 SD rat 전측 창상결손 모델에 대한 창상회복률 분석을 시행하였다. 초기 wound area를 측정해두고 2일마다 wound area를 측정하여 그 변화를 관찰한 결과를 Figure 6에 나타내었다. 거즈보다는 모든 나노섬유 시트군에서 신속한 창상치유를 확인하였고, 세포증식 거동 결과와는 달리 키토산의 함량이 증가할수록 모든 일차에서 일관적으로 높은 치유속도를 나타내었다. 이는 친수성 고분자인 키토산이 상처에서 분비되는 삼출물을 흡수하고, 상처부위를 보호함으로써 습윤환경을 조성하여 상처치유에 효율적으로 작용했기 때문으로 사료된다. 특히, 상처치유단계 초기인 2일차와 4일차에서의 창상회복률 결과에서 인슐린이 함유된 키토산-

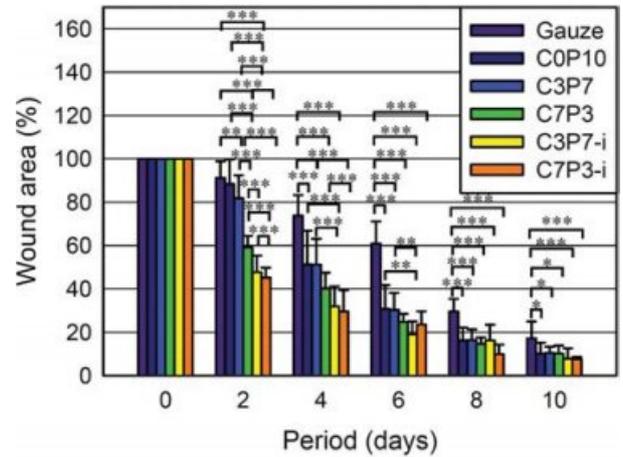


Figure 6. Wound healing rate of gauze, chitosan-PCL-insulin hybrid nanofiber sheets groups (n=12) (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

PCL 나노섬유 시트는 인슐린이 함유되지 않은 나노섬유 시트에 비해 통계적으로 신속한 치유능을 보였다. 이는 키토산-PCL 나노섬유 시트가 창상부위의 삼출물을 흡수하고 습윤 상태를 유지함과 동시에 생분해가 시작되면서 초기에 방출된 인슐린이 상처치유에 도움을 준 것으로 사료된다.

실험에 사용된 나노섬유 시트가 손상된 피부조직에서 창상 피복체로 어떻게 작용하는지 확인하기 위해 조직 채취 전 피부조직을 덮었던 나노섬유를 모두 회수하여 SEM을 통해 형태를 확인하였다. PCL 나노섬유의 경우 섬유들이 국소적으로 용해되었지만 섬유형태가 그대로 남아 있었다. 키토산의 비율이 높은 시료일수록 나노섬유 시트표면이 분해되어 필름 형태를 보여주었으며, 단면에서도 비슷한 형상이 관찰되었다. PCL은 비교적 생분해 속도가 느린 소수성 재료이며 10일의 짧은 시간에 충분히 분해가 이루어지지 못하고, 상처에서 분비되는 삼출물을 신속하게 흡수하지 못해서 나노섬유의 형상이 그대로 남아 있는 것으로 사료된다. 반면, 키토산은 친수성 천연고분자로 비교적 생분해 속도가 빠르다. 키토산의 비율이 높아질수록 나노섬유 시트의 분해속도는 증가하며 창상 부위에 적용하였을 경우에도 상당부분 생분해가 일어난 점을 통해 나노섬유 시트가 신속하게 삼출물을 흡수하고 습윤환경을 유지하여 창상피복체로서 역할을 효과적으로 수행한 것으로 사료된다.

조직학적 분석. 창상의 회복경과에 따라 채취된 결손부 조직의 진피, 상피의 재생 및 염증세포의 분포를 염색 후 관찰하여 창상피복체의 성능을 조직학적으로 검증할 수 있다. 창상치유 2일차에는 모든 그룹에서 전측 피부결손부 진피의 하층 및 표면에 염증세포(호중구, 림프구)가 층을 이루며 분포되어 있음이 관찰되었으나, 인슐린을 함유한 나노섬유 시트 그룹(C3P7-i, C7P3-i)에서는 표면부에서의 염증세포가 상대

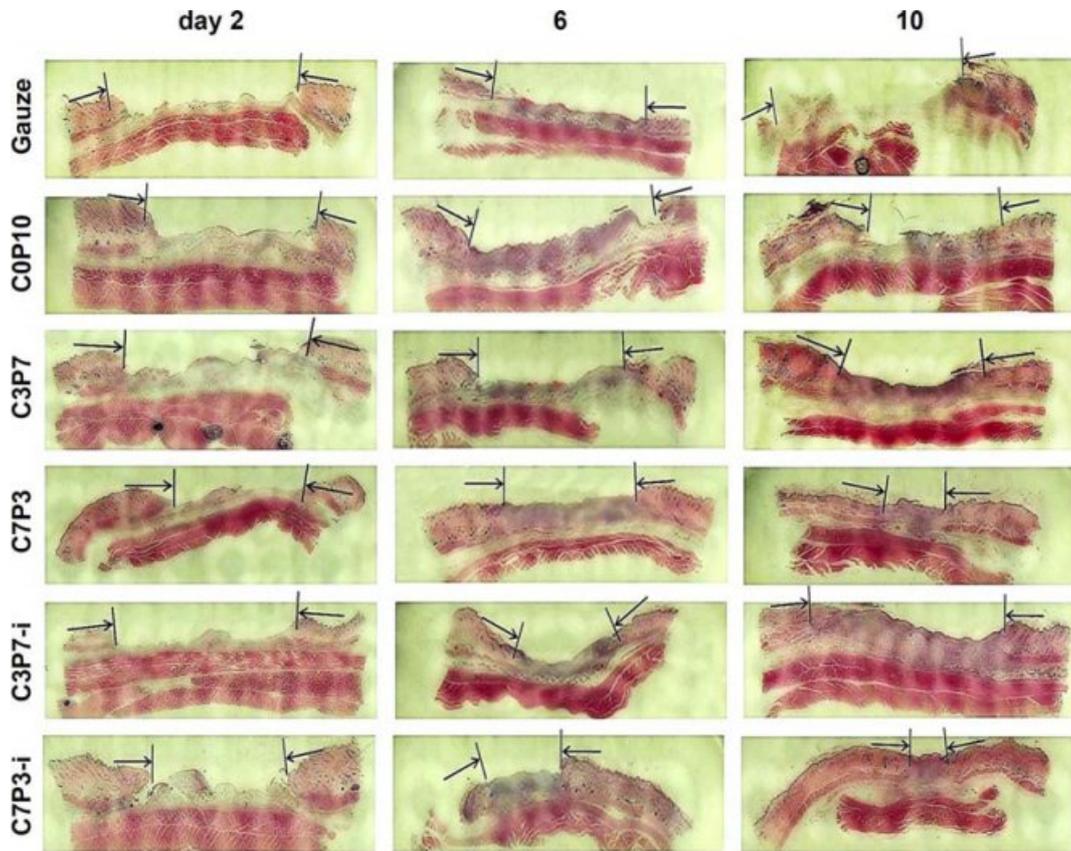


Figure 7. Histological observation of defected skin layers with hematoxylin-eosin staining by treating the gauze, PCL, chitosan-PCL, chitosan-PCL-insulin nanofiber sheets as wound dressings. The arrows indicate boundary of incision sites.

적으로 적게 관찰되었다(Figure 7). 6일차부터는 창상의 경계 부에서 키토산의 비율이 높은 나노섬유 시트(C7P3)와 인슐린이 함유된 나노섬유 시트그룹에서 촉진된 섬유아세포 증식에 의한 다량의 콜라겐 생성 및 창상수복이 관찰되었다. 10일차에는 거즈와 PCL 나노섬유 시트그룹(C0P10)을 제외한 모든 그룹의 조직시편에서 성숙된 진피 및 선명한 상피의 형성을 관찰할 수 있었으며 키토산의 비율이 높고, 인슐린을 함유한 나노섬유 시트그룹에서 신속하고 두터운 진피조직이 형성됨을 확인하였다. 창상의 치유과정은 염증단계, 상피화단계, 증식단계, 성숙단계의 네 단계로 구분될 수 있으나 각 단계는 명확한 구분없이 중첩되면서 연속적으로 진행된다. 창상치유의 네 단계 중에서 염증단계가 임상적으로 가장 중요하다고 할 수 있는데 그 이유는 염증반응이 지속되면 이후의 창상치유과정이 지연되고 파괴된 조직부유물, 괴사된 조직이 급성 및 만성 염증세포의 증식을 유발할 수 있기 때문이다. 따라서 대부분의 창상치유에 적용되는 재료 또는 약제들도 염증단계에 노출된 창상의 지혈을 돕고, 유해한 외부환경으로부터 창상을 차단하여 세균감염을 예방하고, 다음 창상치유단계로 신속히 진행될 수 있도록 설계되고 있다. 본 연구에서 사용된 키토산-PCL-인슐린 복합 나노섬유 시트는 창상

부에 발생할 수 있는 세균감염과 초기의 염증반응을 최소화하고 습윤환경 하에서 섬유아세포의 증식을 촉진시키는 역할을 함으로써 *in vivo* 전층 피부결손 동물모델에서의 두터운 진피조직 및 선명한 상피조직의 재생을 촉진한 것으로 사료된다.

인공피부는 다른 입체적인 장기나 조직에 비해 단순한 평면상의 지지체에 의해 만들어 질 수 있고, 전기방사를 통해 제조된 나노섬유 시트는 수분 및 통기성이 우수하고 세균으로부터 상처를 보호하고 체액이 스며들지 않는 형태로 인공피부 재생 및 창상피복제에 적합한 구조체이다. 지금까지는 인공피부의 재료로 콜라겐 혹은 합성고분자들이 주로 사용되었으나, 고가인 단점이 있어, 이를 대체할 지지체의 개발이 주요 과제로 대두되고 있으며, 본 연구에서 주성분으로 사용한 키토산은 이를 대체할 수 있는 소재로 많은 연구가 이루어지고 있다. 전층 창상의 치유에 있어서 키토산-PCL 나노섬유 시트는 창상치료 과정에서 생성되는 삼출물로 습윤상태를 유지하고 인슐린은 창상의 상피 육아조직의 면적감소가 신속하게 이루어질 수 있도록 해줄 뿐만 아니라 창상을 수축하는 작용을 유도하여 전체적인 창상치유율이 다른 대조군에 비해서 높아졌다고 생각된다.

결 론

전기방사법을 이용하여 생체적합성, 생분해성을 가지는 키토산과 가공성, 기계적 강도, 생분해 속도를 조정할 수 있는 PCL, 그리고 세포성장을 촉진하는 인슐린이 혼합된 창상치료용 키토산-PCL-인슐린 나노섬유 시트를 제조하였으며, 섬유직경은 평균 180-250 nm 범위의 정구곡선 분포로 나타났다. 키토산의 비율이 증가할수록 나노섬유 시트의 영률과 인장강도는 증가하고 파단신율은 감소하였다. 나노섬유 시트의 키토산 비율 및 인슐린의 혼입에 의한 생분해 및 약물방출 속도의 일관적 우세를 확인하였다. 더불어, 키토산의 혼합비율이 70%인 나노섬유 시트의 황색포도상구균과 폐렴균에 대한 항균능이 99.99% 및 99.47%로 확인되었다. 복합 나노섬유 시트에 키토산의 비율이 증가할수록 세포증식능은 감소하였다. SD rat을 이용한 창상회복률은 키토산의 비율과 인슐린의 함유량에 비례하여 증가한다는 것을 증명해 주었으며, 채취된 조직의 염색을 통하여 창상 경계부와 신생 진피조직에서의 초기 염증반응 억제 및 신속한 상피조직의 수복을 검증하였다. 본 연구에서 제조한 인슐린을 함유한 키토산-PCL 나노섬유 시트의 창상피복용 소재로서 생의학적 활용이 기대된다.

감사의 글: 이 연구는 금오공과대학교 학술연구비에 의하여 지원된 논문임.

참 고 문 헌

1. S. Yang, K. F. Leong, and Z. Du, *Tissue Eng.*, **7**, 679 (2001).
2. C. Helary and M. F. Desimone, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **16**, 635 (2015).
3. R. Langer and J. P. Vacanti, *Science*, **260**, 920 (1993).
4. N. O'Connor, J. Mulliken, S. Banks-Schlegel, O. Kehinde, and H. Green, *Lancet*, **317**, 75 (1981).
5. A. S. Pearson, and W. Wolford, *Prim. Care*, **27**, 475 (2000).
6. G. D. Winter, *Nature*, **193**, 293 (1962).
7. C. D. Hinman and H. Maibach, *Nature*, **200**, 377 (1963).
8. M. Szycher, S. Games, and F. D. Lee, *J. Biomater. Appl.*, **7**, 142 (1992).
9. M. Ishihara, K. Nakanishi, K. Ono, M. Sato, M. Kikuchi, Y. Saito, H. Yura, T. Matsui, H. Hattori, M. Ueono, and A. Kurita, *Biomaterials*, **23**, 833 (2002).
10. D. K. Singh and A. R. Ray, *J. Macromol. Chem. Phys.*, **C49**, 69 (2000).
11. M. Ishigara, K. Ono, M. Sato, K. Nakanishi, Y. Saito, H. Yura, T. Matsui, H. Hattori, M. Fujita, M. Kikuchi, and A. Kurita, *Wound Repair Regen.*, **9**, 513 (2001).
12. A. Ehterami, M. Salehi, S. Farzamfar, A. Vaez, H. Samadian, H. Sahrapeyma, M. Mirzaii, S. Ghorbani, and A. Goodarzi, *Int. J. Biol. Macromol.*, **117**, 601 (2018).
13. G. I. Howling, P. W. Dettmar, P. A. Goddard, F. C. Hampson, M. Dornish, and E. J. Wood, *Biomaterials*, **22**, 2959 (2001).
14. R. G. Goorbandi, M. R. Mohammad, and K. Malekzadeh, *Biomater. Res.*, **24**, 9 (2020).
15. N. V. Smirnova, K. A. Kolbe, E. N. Dresvyanina, S. F. Grebennikov, I. P. Dobrovolskaya, V. E. Yudin, T. Luxbacher, and P. Morganti, *Materials*, **12**, 11 (2019).
16. H. Liu, C. Wang, C. Li, Y. Qin, Z. Wang, F. Yang, Z. Li, and J. Wang, *RSC Adv.*, **8**, 7533 (2018).
17. L. R. Manea, L. Hristian, A. L. Leon, and A. Popa, *Mater. Sci. Eng.*, **145**, 032006 (2016).
18. S. Ramakrishna, K. Fujihara, W. E. Teo, T. C. Lim, and Z. Ma, *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*, World Scientific, Singapore, p. 7 (2005).
19. K. C. Gupta, A. Haider, Y. R. Choi, and I. K. Kang, *Biomater. Res.*, **18**, 5 (2014).
20. X. M. Mo, C. Y. Xu, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, *Biomaterials*, **25**, 1883 (2004).
21. E. D. Boland, *J. Biomed. Mater. Res.*, **71B**, 144 (2004).
22. G. E. Wnek, M. E. Carr, D. G. Simpson, and G. L. Bowlin, *Nano Lett.*, **3**, 213 (2003).
23. K. Ohkawa, D. Cha, H. Kim, A. Nishida, and H. Yamamoto, *Macromol. Rapid Commun.*, **25**, 1600 (2004).
24. W. H. Park, L. Geong, D. I. Yoo, and S. Hudson, *Polymer*, **45**, 7151 (2004).
25. J.-P. Chen, G.-Y. Chang, and J.-K. Chen, *Colloids Surf. A*, **313**, 183 (2007).
26. L. Li and Y.-L. Hsieh, *Carbohydr. Res.*, **341**, 374 (2006).
27. Z. Li, H. R. Ramay, K. D. Hauch, D. Xiao, and M. Zhang, *Biomaterials*, **26**, 3919 (2005).
28. C.-H. Lee, K.-C. Hung, M.-J. Hsieh, S.-H. Chang, J. H. Juang, I.-C. Hsieh, M.-S. Wen, and S.-J. Liu, *Nanomed.-Nanotechnol.*, **24**, 102123 (2020).
29. W. J. Li, K. G. Danielson, P. G. Alexander, and R. S. Tuan, *J. Biomed. Mater. Res.*, **67A**, 1105 (2003).
30. W. J. Li, C. T. Laurencin, E. J. Caterson, R. S. Tuan, and F. K. Ko, *J. Biomed. Mater. Res.*, **60**, 613 (2002).
31. S. Kidoaki, I. K. Kwon, and T. Matsuda, *Biomaterials*, **26**, 37 (2005).
32. I. K. Kwon, S. Kidoaki, and T. Matsuda, *Biomaterials*, **26**, 3929 (2005).
33. Y. Liu, S. Zhou, Y. Gao, and Y. Zhai, *Asian J. Pharm. Sci.*, **14**, 130 (2019).