

돼지의 소장 점막하 조직을 이용한 스폰지의 제조 및 특성 결정

신혜원 · 김선화 · 장지욱* · 김문석* · 조선행* · 이해방* · 강길선†

전북대학교 유기신물질공학과, *한국화학연구원 나노생체재료연구팀
(2003년 12월 4일 접수, 2004년 3월 20일 채택)

Preparation and Characterization of Sponge Using Porcine Small Intestinal Submucosa

Hye Won Shin, Seon Hwa Kim, Ji Wook Jang*, Moon Suk Kim*,
Sun Hang Cho*, Hai Bang Lee*, and Gilson Khang†

Department of Advanced Organic Materials Engineering, Chonbuk National University,
664-14, Duckjin Dong 1Ga, Duckjin Gu, Jeonju 561-756, Korea

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

†e-mail : gskhang@chonbuk.ac.kr

(Received December 4, 2003; accepted March 20, 2004)

초록 : 돼지의 소장 점막하 조직은 면역반응이 없는 재료로 널리 사용되고 있다. 본 연구에서는 소장 점막하 조직을 1-ethyl-(3,3-dimethyl aminopropyl) carboimide hydrochloride (EDC)를 이용하여 경화시켰으며 동시에 스폰지 형태로 제조하여 조직공학적 담체와 상처 드레싱재료로서의 응용 가능성을 검토하였다. 다세포 구성분을 제거한 소장 점막하 조직 분말을 3% 아세트산에 용해하여 일정한 형태의 몰드 내에 붓고 동결건조하였다. 이 소장 점막하 조직 스폰지를 여러 농도의 EDC 용액에 침지하여 가교반응을 실시하였다. 이를 전자주사 현미경, 시차 주사열량계, 적외선 분광분석기, 다공도 테스트 및 흡수성 실험을 수행하여 특성을 결정하였다. 소장 점막하 조직 스폰지는 경화제의 농도가 50 mM 이상에서 물리적 특성이 우수한 것으로 판단되었다. 일련의 실험을 통하여 경화된 소장 점막하 조직 스폰지가 조직공학적 담체와 상처치료 드레싱재료로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

ABSTRACT : Porcine small intestine submucosa (SIS) has been widely used as a biomaterial without immunorejection responses. Crosslinked SIS sponges were characterized for the possibility of the bio-interactive wound dressings and tissue engineered scaffolds. SIS powders were dissolved in 3% acetic acid aqueous solution at 48 hrs followed by pouring into mold and then fabricated by freeze-drying method. SIS sponge was prepared by crosslinked with 1-ethyl-(3-3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) solution (deionized water : ethanol = 5 : 95) with 1 ~ 100 mM concentration for 24 hrs and lyophilized. SIS sponges were characterized by scanning electron microscopy, differential scanning calorimeter, and Fourier transform infrared spectrometer and were tested their porosity and water absorption ability. It was observed that the concentration of EDC might be exceeded 50 mM to get good physical characteristics. In conclusion, it seems that SIS sponge could be very useful for the applications of wound healing and tissue construction.

Keywords : small intestinal submucosa, sponge, collagen, wound dressing, crosslinking.

1. 서론

콜라젠은 생체의료용 재료로 주목받고 있으며, 많은 분야에서 다양한 형태로 응용되고 있다. 이는 콜라젠이 천연재료이며 세포와의 친화력이 매우 우수하고, 생체내 거부반응이 적기 때문이다. 콜라젠은 화장품의 원료뿐

만 아니라 상처치유제, 화상치유제, 약물전달체 및 조직공학용 지지체 등에 널리 응용되고 있다. 콜라젠이란 피부나 뼈, 이, 연골, 건 등을 구성하는 당단백질이며 당지질로써 구조적으로 세포 등의 부착이 가능하며, 산소전달 및 세포 이동에 관여하는 섬유성으로 신축성을 가지는 물성을 지니고 있다. 이러한 특성을 가진 콜라젠은 3

차원적 담체로 제조하여 인체 내에서 적절한 지지체로서의 역할을 수행할 수 있다. 따라서 콜라젠은 세포 점착 및 성장, 이동, 분화까지 관여함으로써 콜라젠의 중요성이 점차 고조되고 있고 그 응용이 활발히 진행되고 있다.^{1,3}

돼지의 소장 점막하 조직 (small intestine submucosa; SIS)은 세포가 존재하지 않은 조직으로 면역반응이 거의 일어나지 않으며 90% 이상이 피부에 있는 콜라젠 I, II형으로 구성되어 있고, 그 외에는 소량의 콜라젠 V, VI형 등이 다양하게 존재한다. 또한 SIS는 약 60~90 일간의 생체 분해능을 가지며 수분흡수율이 높고 SIS 자체의 기계적 물성도 비교적 양호하다. 또한 SIS는 세포외 기질 (extracellular matrix; ECM)로서 글리코사미노글리칸 및 피브로넥틴, 콘드로이틴 설페이트, 헤파린, 헤파린 설페이트, 하이아루론산과 염기성 섬유아세포 성장인자-2 (base fibroblast growth factor - 2; FGF-2), 신경성장인자 (nerve growth factor; NGF), 변환성장인자-β (transforming growth factor-β; TGF-β), 상피세포 성장인자 (epidermal growth factor; EGF), 혈관 내피세포 성장인자 (vascular endothelial growth factor; VEGF) 및 인슐린 성장인자 (insulin-like growth factor-1; IGF-1) 등의 다양한 사이토카인을 다량 함유하고 있다. 이러한 SIS 내의 ECM 및 사이토카인의 존재는 세포의 점착이나 성장, 이동, 분화 등의 세포의 기능적인 면에 관여하며 조직재생이나 상처 치유에 매우 유용하게 작용할 수 있다.^{4,9}

이러한 특성을 가지고 있는 SIS는 동맥이나¹⁰⁻¹⁵ 정맥의¹⁶ 혈관과 진피, 상피, 뼈 등의 이식물,¹⁷ 담즙관의 재생,¹⁸ 요실금 환자의 방광을 조여 주는 이식물¹⁹ 등으로 연구되고 있다.⁵ 그러므로 SIS는 여러 가지 생체 대체물로서 다양하게 응용가능하며 생체적합성 재료로 앞으로 많은 연구가 기대된다. 그러나 천연재료로서의 응용에는 한계가 있고 기계적 물성의 증가 및 여러 기하학적 형태의 가

공이 화학적 처리에 의하여 물성을 증진시켜야만 한다.

본 연구에서는 선행 연구를 바탕으로 SIS를 이용하여 스폰지 형태를 제조하고 이를 조직공학적 담체와 창상 드레싱 재료로의 응용을 타진하고자 하였다.^{1,6,8} 드레싱이란 상처치유를 촉진하고 상처면의 삼출액을 조절함으로써 증발로 인한 수분 손실과 상처의 오염방지를 위해 일시적으로 상처를 덮는 것을 말하는 것으로 드레싱재의 궁극적인 목표는 반흔이 생기지 않게 치유하는 능력 및 미적 효과를 달성하는 데에 그 목적을 두고 있다.²⁰ 즉, 반흔을 최소화하면서 가능한 한 초기에 창상이 닫히도록 하는 것이다. 또한 SIS 스폰지는 드레싱 외에 조직공학 적 지지체로도 응용 가능성을 가지며 이는 세포의 점착이 우수하고 세포가 성장하기 좋은 조건을 가지기 때문이며 이 외에도 많은 분야에 응용될 수 있다.²¹

본 연구는 SIS를 생체재료에 널리 사용되는 경화제인 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC)를 이용하여 스폰지 형태로서 화학적 가교결합을 시행하였다. 제조된 스폰지의 특성결정을 위해 전자주사 현미경으로 다공도 형태를 관찰하였으며, 경화도는 시차 주사열량계 및 적외선 분광분석기로 측정하였다.²²⁻²⁵ 또한 다공도 측정기로 다공의 크기 및 다공 분포도 측정과 물 흡수성 실험을 하였다. 따라서 EDC로 가교시킨 SIS의 다양한 분석을 통하여 SIS 스폰지의 기계적 물성과 경화성의 관계 및 화학적 및 물리적 및 형태학적 특성을 규명하고자 하였다.

2. 실험

SIS 분리. SIS를 분리하기 위하여 돼지의 공장에 있는 지방조직을 우선 제거하고, 물로 깨끗이 공장 안과 밖을 세척한 다음, 공장을 대략 10 cm 정도의 길이로 잘라 다시 식염수에 넣고 세척하였다 (Figure 1(A)). 잘라낸

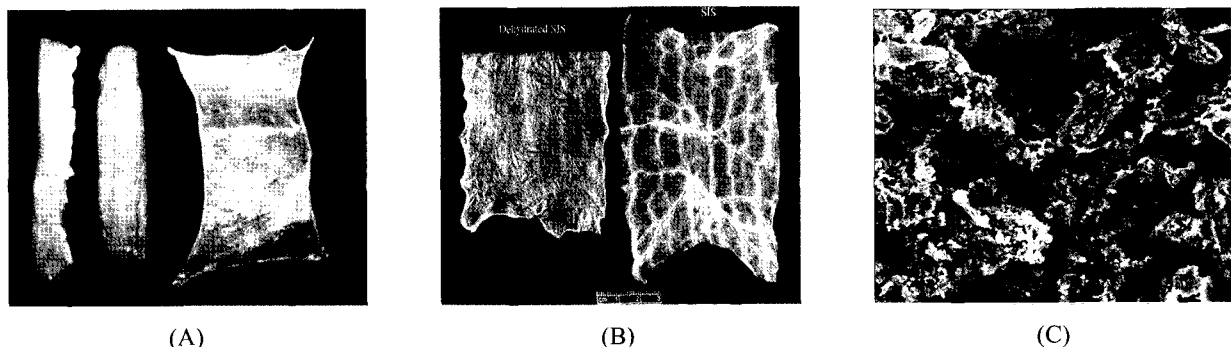


Figure 1. Schematic diagram of the preparation processing of SIS. (A) : Section of porcine jejunum, (B) : SIS, and (C) : SEM microphotographs after freezer-milled SIS powder (original magnification, ×100).

공장을 집게와 손을 이용하여 물리적 힘을 가해서 바깥층에 있는 치밀층을 제거하고 다시 뒤집어서 점막 근육층을 제거하여 SIS 층만을 분리하였다 (Figure 1(B)). 이렇게 얻은 SIS를 마지막으로 다시 식염수로 세척하고, -80 °C 급저온 냉각기에 보관하였다. -80 °C에서 보관한 SIS를 동결건조한 뒤, 믹서기 (태성산업, 후드믹서, E종, Korea)로 분쇄한 SIS를 동결 분쇄기 (6700, SPEX Inc., USA)를 이용하여 대략 20 μm 크기의 고운 분말로 만들었다 (Figure 1(C)).

SIS 스폰지 제조. 3% 아세트산 (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA)에 0.1% 펩신 (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA)을 함유한 용액에 1 wt%의 SIS 분말을 첨가시켜 상온에서 48시간 동안 방치한 후 직경 30 mm의 자체 제작된 원형 몰드에 담고 이를 급랭 후 동결 건조시켜 스폰지 형태의 SIS를 얻었다. 제조된 SIS 스폰지는 각각 95% 에탄올 (deionized water : ethanol = 5 : 95)에 EDC (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA) 용액 1, 5, 10, 50 및 100 mM의 EDC 용액으로 24시간 동안 경화시켰다. 경화 후 40 °C의 증류수에 1시간 동안 세척하고 경화와 세척이 끝난 SIS 스폰지는 급랭 후 재동결 건조하여 최종적으로 경화된 SIS 스폰지를 얻었다. 본 실험 방법은 Figure 2에 도식화하였다.

주사전자 현미경 측정. SIS 스폰지의 경화 전과 각 농도별로 경화된 후의 형태학적 특성을 주사전자 현미경 (Hitachi, S-2250N, Japan)으로 관찰하였다. SIS 스폰지는 표면, 몰드 바닥면을 가로축 및 세로축으로 자른 단면을 관찰하였다. 각 샘플들은 금속판에 고정시키고 아르곤 하에서 2분 동안 플라즈마 스퍼터 (Model SC 500K, Emscope, UK)를 이용하여 백금을 코팅하였다. 관찰된 이미지는 이

미지 분석 프로그램인 P-SEM (Mirero, Korea)을 이용하여 분석하였다.

다공도 측정. SIS 각 EDC 경화제의 농도별로 경화한 후 SIS 스폰지가 갖고 있는 다공도 분포 및 크기를 확인하기 위하여 수은 다공계 (Instrument Co. Model Auto Pore V 9500 V 1.03, USA)를 사용하여 수은 적심성을 이용한 다공도를 측정하였다.

물 흡수성 실험. 제조된 SIS 스폰지의 물 흡수성을 측정하였다. 일정한 용기에 20 mL의 물을 넣고 용기 무게 및 용기를 뺀 물의 무게를 측정하고 0.05 g의 SIS 스폰지를 물에 넣어 2분간 방치 후 스폰지를 용기에서 꺼내고 용기에 있는 물의 무게를 측정하였다. 무게를 측정한 값들을 이용하여 아래 식 (1)에 대입하여 물 흡수도를 계산하였다.²⁶

$$W(\%) = \frac{A - B}{C} \times 100 \quad (1)$$

여기서 W ; 물 흡수도, A ; 처음 용기에 담긴 물의 무게, B ; 스폰지를 2분 담근 후 뺀 용기에 담긴 물의 무게 및 C ; 스폰지의 무게이다.

시차 주사열량계 측정. SIS 스폰지가 경화제 농도에 따라서 변하는 경화도를 관찰하기 위해 시차 주사열량계 (TA Instrument, DSC 2910, USA)를 측정하였다. 시차 주사열량계는 상온에서부터 250 °C까지 SIS 스폰지의 열적 성질 변화를 측정하였다. 분석 조건으로 승온 속도는 분당 10 °C로 하였으며 질소기류 하에서 측정하였다.

FT-IR 측정. 콜라겐이 주성분인 SIS를 EDC 경화제에 의해 가교하였으며, 가교된 SIS 스폰지에서 아미이드

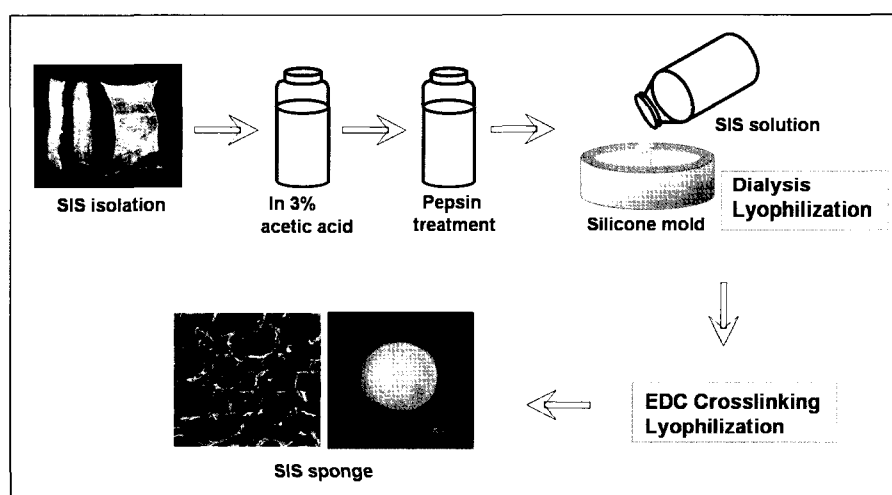


Figure 2. Schematic diagram of SIS sponge making process.

기의 증가를²⁴ FT-IR (Bio-Rad Digilab, FTS-165, Canada)로 측정하였다. 이 분석은 KBr 펠렛법을²⁷ 이용하여 시편을 만들어 측정하였다.

3. 결과 및 토론

SIS 스폰지 제조. 본 연구에서는 천연재료인 SIS를 스폰지 형태로 제조하여 창상 드레싱재에 응용하고자 하였으며 물성을 개량하기 위하여 경화제로써 EDC를 사용하여 경화조건에 따른 특성결정을 수행하였다. 제조된 SIS 스폰지는 주사전자 현미경, 다공도 측정, 물 흡수성 실험, 시차 주사열량계 및 FT-IR 분석을 통하여 특성 결정하였다.

전자주사 현미경 특성. SIS 다공체의 미세 형태는 표면과 내부에 균일한 다공을 가지며 다공도가 높게 나타났다. EDC의 농도를 다르게 (1, 5, 10, 50 및 100 mM) 하여 경화시킨 SIS 스폰지의 전자주사 현미경 사진에서 SIS의 내부에서는 다공의 크기 및 형태의 변화는 없었지만 표면의 형태변화가 관찰되었다 (Figure 3). SIS 스폰지의 표면에서 EDC의 농도가 50 mM 이상부터 규칙적인 다공이 관찰되며 EDC 농도가 50 mM 이하로 경화한 SIS 스폰지에서 표면 다공의 변형이 생기는데 그 이유는 1~100 mM 경화 후 세척중에 SIS 스폰지 내에서 뿌옇게 빠져나오는 현상을 관찰할 수 있는데 이는 경화 후 세척 중에 경화가 되지 않는 SIS와 잠재적으로 아세트산이 제거되면서 다공을 지탱하는 상태가 상대적으로 감소하게 되어 팽윤된 SIS가 다공을 닫는 현상을 보여주는 것이다. 따라서 EDC의 농도가 증가할수록 다공의 형태 유지력이 증가하였다. 유사하게 SIS 스폰지의 표면은 경

화제의 농도가 낮을수록 다공도가 감소하며, 경화제의 농도가 증가할수록 다공의 형태를 유지하는 것으로 관찰되었다. 따라서 EDC의 농도가 50 mM 이상부터 표면에 경화 반응시에 일정한 다공이 형성되는 것으로 관찰되었으며 적정경화제 농도는 50 mM 이상 되어야 할 것으로 사료되었다.

다공성 측정. 다공의 크기는 전자주사 현미경에서 측정 한 크기로서 100 μm 이상이 됨을 보였다 (Figure 3). Table 1은 평균 다공도 측정 데이터 값들을 나타낸 것으로 1 mM에서 가장 작은 다공 크기 및 다공 분포를 나타내었고 EDC 경화제의 농도가 증가할수록 다공의 크기와 다공 분포도 90% 이상인 것으로 확인되었다. 다공의 크기는 매우 작은 크기 (0.1 μm 이하)부터 최대 400 μm 정도의 크기까지 존재하였다. 100 μm 이상의 다공 크기는 세포 배양시 세포가 다공에 잘 들어가 자랄 수 있는 환경이 되어 조직공학적 담체로의 응용가능성을 보여주고 있다.

물 흡수성 실험. SIS 스폰지의 물 흡수 속도는 1 mM에서 완전히 젖음 상태에 도달하기까지 2분 이상의 시간이 경과되었으나 5 mM에서는 1분 내외, 10 mM에서는 30 초 내외, 50 mM과 100 mM에서는 10 초 내외로 그

Table 1. Porosity and Mean Pore Diameter of EDC-Crosslinked SIS Sponge

EDC content (mM)	porosity (%)	mean pore diameter (μm)
control	98	142
1	90	53
5	97	101
10	97	124
50	99	118
100	98	142

*Control : non-crosslinked SIS sponge.

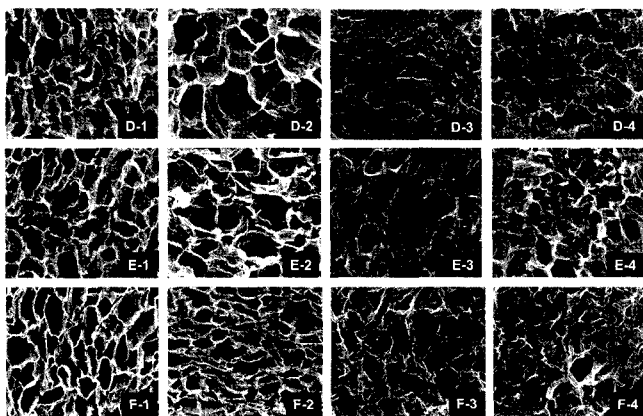


Figure 3. SEM measurements of SIS sponge types. (A) : control (non-crosslinked), (B) : 1 mM, (C) : 5 mM, (D) : 10 mM, (E) : 50 mM, and (F) : 100 mM. 1 : vertical section, 2 : horizontal section, 3 : surface and 4 : bottom.

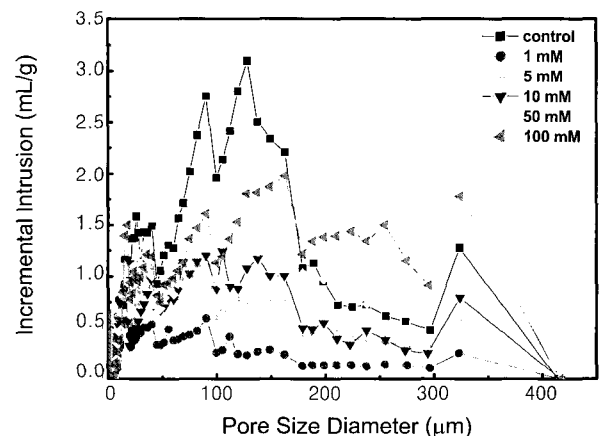


Figure 4. Porosity of SIS sponge (control (non-crosslinked), 1, 5, 10, 50, and 100 mM of EDC).

젖음 속도 또한 빨라짐을 관찰하였다. 그 이유는 경화제의 농도가 증가함으로 표면의 다공이 열려있는 상태가 되기 때문에 그 흡수가 증가하는 것이라 사료된다.

Figure 5는 SIS 스폰지의 물 흡수율에 대하여 나타낸 것으로서 EDC 경화제 농도가 증가할수록 물 흡수율도 증가해지는 것을 나타내고 있다. EDC 농도가 100 mM 일 때 흡수율은 8216%로 비교적 높게 나타남을 알 수 있다. 그러나 경화하지 않은 SIS 스폰지는 물에 넣었을 때 바로 풀어지는 현상을 보여주어 물 흡수도를 측정하지 못하였다. 전자주사 현미경 사진에서 보는 바와 같이 EDC의 농도가 증가할수록 다공이 형성되며, 물성이 증가하는 것과 같이 다공에 물을 흡수함으로써 다공의 형태를 강하게 유지하는 동시에 물을 포함하고 저장함으로써 경화제의 농도가 증가할수록 물 흡수율도 우수함을 관찰하였다. 이러한 특징은 상처 드레싱재료의 응용에서 상처에 분비되는 삼출액의 흡수가 아주 뛰어나는 것이며 화상, 욕창 및 수술창 등 삼출액이 많이 분비되는 상처에 매우 유용하게 쓰여 질 것이라고 사료된다.

시차 주사열량계 분석. Figure 6에는 경화제의 농도가 증가할수록 SIS 스폰지에 미치는 경화량에 대해 알고자 시차 주사열량계 분석을 나타내었다. SIS 스폰지에 EDC 경화제 농도가 증가할수록 경화도가 증가하는 것을 약 170 °C 부근에서 나타나는 피크로 확인하였으며 경화 피크의 열량 값은 Table 2에 정리하였다. EDC의 농도가 100 mM일 때 가장 큰 열량 값 (18.22 J/g)을 보여주었다. 즉 EDC의 농도가 증가할수록 경화도가 증가하는 것을 관찰 할 수 있었다.

FT-IR 분석. FT-IR 분석을 통하여 스폰지의 화학적 경화 메커니즘을 추론할 수 있었다. 측정 결과 경화도가 증가할수록 상대적으로 아마이드 I (1653 cm⁻¹), 아마

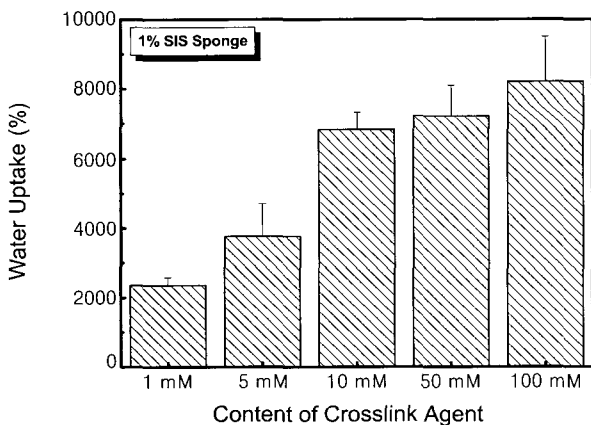


Figure 5. Water-uptake experiments of SIS sponge types (1, 5, 10, 50, and 100 mM of EDC).

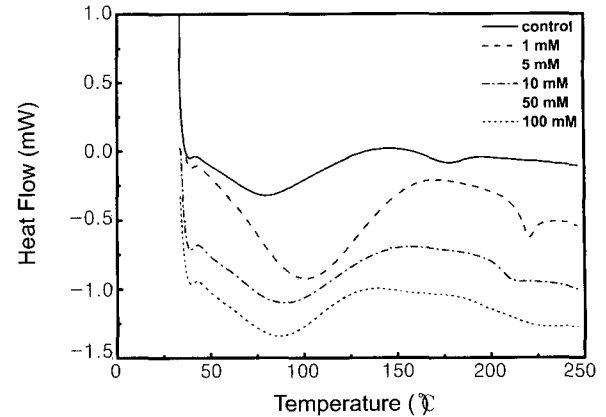


Figure 6. DSC thermogram of SIS sponge of control and various concentration of EDC.

Table 2. Thermal Properties of SIS Sponges according to the Concentration of EDC Crosslink Agent

concentration of EDC	ΔH (J/g)
control	2.11
1 mM	9.73
5 mM	10.63
10 mM	9.66
50 mM	15.10
100 mM	18.22

* Control : non-crosslinked SIS sponge.

이드 II (1543 cm⁻¹), 아마이드 III (1453 cm⁻¹)와 에스터 (1079 cm⁻¹)의 피크가 증가하였고, 반대로 카복시기 (1406 cm⁻¹)는 경화도가 증가할수록 감소하였다. 이러한 결과는 SIS의 주성분인 콜라겐에 존재하는 풍부한 카복시기와 EDC가 결합하여 SIS의 카르복실기 활성으로 인한 아민의 치환반응으로 아마이드를 형성하게 되고 카복시기는 상대적으로 감소하게 되기 때문이라고 사료된다 (Figure 7). 그에 따른 화학적 경화 메커니즘을 Figure 8에 나타내었다.

4. 결론

여러 분석을 통해 관찰한 결과 EDC의 농도가 증가할수록 다공과 다공을 유지하는 현상이 경화 전 상태와 비교하여 증가하였으며 다공 사이에 물을 흡수하여 저장할 수 있는 능력 또한 향상되었다. 경화는 SIS의 콜라겐에 존재하는 카르복실기와 EDC의 결합에 의한 아마이드의 형성으로 EDC의 농도가 증가할수록 아마이드기가 증가하고 카르복실기는 상대적으로 감소하게 되는 경화 메커니즘으로 해석되었다. 이러한 화학적 경화의 증

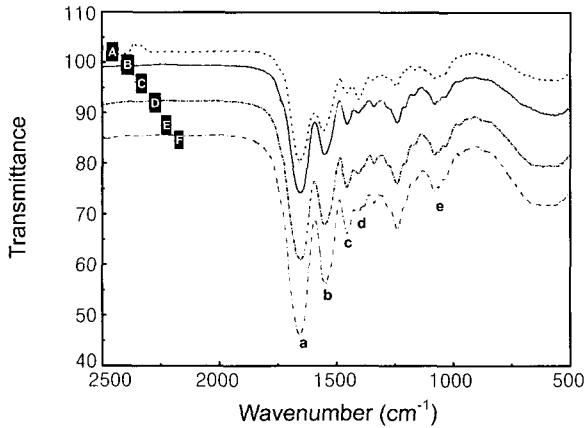


Figure 7. FT-IR spectroscopy of SIS sponge types (control, 1, 5, 10, 50, and 100 mM) at (A) : control (non-crosslinked SIS sponge), (B) : 1 mM, (C) : 5 mM, (D) : 10 mM, (E) : 50 mM and (F) : 100 mM; a : amide I, b : amide II, c : amide III, d : carboxylate salts, and e : ester.

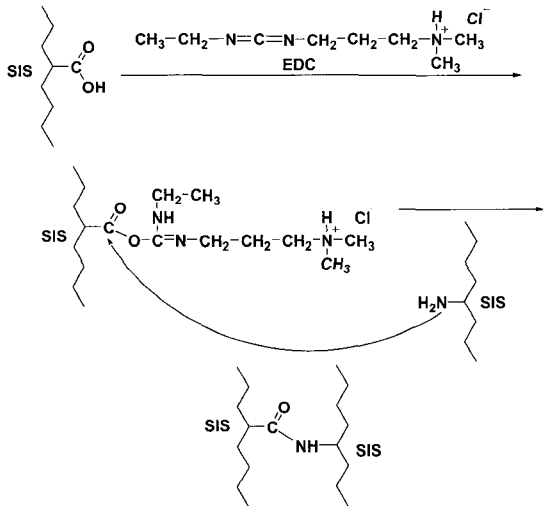


Figure 8. Crosslinking mechanism of SIS sponge.

가는 기계적 물성을 증가시키며, 따라서 SIS의 스폰지 중 50과 100 mM이 실제 상처 드레싱재로 사용하기에 뛰어난 경화조건을 가지게 되었다. 본 연구에서는 면역학적 거부반응이 일어나지 않고 다양한 성장인자를 포함하는 천연재료 (SIS)와 생체 적합성 경화제 (EDC)의 결합으로 SIS 스폰지를 상처 드레싱재로 응용하기에 적절한 조건 및 특성을 확인하였다. 또한 생체 적합성 실험으로 *in vivo*나 *in vitro*를 통해 우수한 결과를 얻을 수 있을 것이라 기대하며 SIS는 다루기가 쉽고 값이 저렴하여 얻기 쉬운 강점을 가지고 있어 폭넓은 연구가 앞으로 진행되어 질 것이라 사료된다. 또한 본 연구에서 SIS 스폰지는 상처 드레싱재뿐만 아니라 다른 응용에도 기여할 수 있

을 것으로 기대하며 상처 드레싱재로서의 생체적합성 연구 및 분해도 실험 및 *in vivo* 실험을 수행 중에 있다.

감사의 글 : 본 연구는 산업자원부의 차세대 사업 (N11-A08-1402-05-1-3)에 의하여 진행되어졌으므로 이에 감사드립니다.

References

1. S. B. Song, G. Khang, S. K. Hong, I. Lee, S. W. Kim, and H. B. Lee, *Biomater. Res.*, **4**, 13 (2000).
2. K. Lindberg and S. F. Badylak, *Burns*, **27**, 254 (2001).
3. S. F. Badylak, *Semin. Cell Devel. Biol.*, **13**, 277 (2002).
4. E. H. Ledet, A. L. Carl, D. J. DiRisio, M. P. Tymeson, L. B. Andersen, C. E. Sheehan, B. Kallakury, M. Slivka, and H. Serhan, *Spine J.*, **2**, 188 (2002).
5. S. F. Badylak, B. Kropp, and T. B. McPherson, *Tissue Eng.*, **4**, 379 (1998).
6. J. A. Kang, S. J. Lee, G. Khang, I. Lee, and H. B. Lee, *Biomater. Res.*, **6**, 107 (2002).
7. P. K. Shin, S. J. Lee, B. Lee, Y. M. Lee, H. B. Lee, and G. Khang, *Macromol. Chem. Symp.*, **15**, 175 (2002).
8. G. Khang, P. Shin, I. Kim, B. Lee, S. J. Lee, Y. M. Lee, H. B. Lee, and I. Lee, *Macromol. Res.*, **10**, 158 (2002).
9. I. Lee, S. J. Lee, J. S. Choi, J. S. Lee, G. Khang, Y. M. Lee, and H. B. Lee, *Childs Nerv. Syst.*, in press (2004).
10. C. J. Morgan, A. G. P. Coutts, M. C. McFadyen, T. P. King, and D. Kelly, *J. Nutri. Biochem.*, **7**, 339 (1996).
11. S. F. Badylak, G. C. Lantz, and A. C. Coffey, *J. Surg. Res.*, **47**, 74 (1989).
12. G. C. Lantz, S. F. Badylak, and A. C. Coffey, *J. Invest. Surg.*, **3**, 217 (1990).
13. S. F. Badylak, B. Kropp, and T. B. McPherson, *Tissue Eng.*, **4**, 379 (1998).
14. G. E. Sandusky, S. F. Badylak, and R. J. Horff, *Ann. J. Path.*, **140**, 317 (1992).
15. E. N. Lamme, H. J. de Vries, H. van Veen, G. Gabbiani, W. Westerhof, and E. Middelkoop, *J. Histochem. Cytochem.*, **44**, 1311 (1996).
16. S. P. Hong, J. K. Park, S. H. Huh, and H. S. Kim, *J. Plast. Surg.*, **25**, 547 (1998).
17. B. P. Kropp, B. L. Eppley, C. D. Prevel, M. K. Rippey, R. C. Harruff, S. F. Badylak, M. C. Adams, R. C. Rink, and M. A. Keating, *Urology*, **46**, 396 (1995).
18. D. Prevel, B. L. Eppley, and S. F. Badylak, *Ann. Plast. Surg.*, **35**, 381 (1995).
19. M. Rosen, J. Ponsky, R. Petras, A. Fanning, F. Brody, and F. Duperier, *Surgery*, **132**, 480 (2002).
20. S. K. Han and S. J. Choi, "Mechanism of Wound Healing", in *Advance in Wound Care*, H. J. Yoo, J. H. Kim, M. H. Park, K.

- K. Lee, J. H. Lee, Y. S. Yoo, S. K. Han, and G. Yushimiz, Editors, Korea Medical Book Publisher Co., Seoul, p 43 (2002).
21. J. J. Yoo and I. Lee, *Tissue Engineering: Concepts and Application*, Korea Medical Book Publisher Co., Seoul, 1998.
 22. Y. Chang, C. C. Tsai, H. C. Liang, and H. W. Sung, *Biomaterials*, **23**, 2447 (2002).
 23. V. Charulatha and A. Rajaram, *Biomaterials*, **24**, 759 (2003).
 24. J. S. Pieper, T. Hafmans, J. H. Veerkamp, and T. H. van Kuppevelt, *Biomaterials*, **21**, 581 (2000).
 25. S. N. Park, J. C. Park, H. O. Kim, M. J. Song, and H. Suh, *Biomaterials*, **23**, 1205 (2002).
 26. S. N. Park, H. J. Lee, K. H. Lee, and H. Suh, *Biomaterials*, **24**, 1631 (2003).
 27. L. A. Forato, R. B. Filho, and L. A. Colnago, *Anal. Biochem.*, **15**, 136 (1998).