

일반논문

온도감응성 수화젤을 이용한 골수간엽줄기세포의 골분화 유도

김선경·현 훈·김순희·윤선중·김문석*·이종문·강길선†·이해방*
전북대학교 BK21 고분자 BIN 융합연구팀, *한국화학연구원 나노생체재료연구팀
(2005년 7월 14일 접수, 2006년 5월 3일 채택)

Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Stem Cells Using Thermo-Sensitive Hydrogels

Sun Kyung Kim, Hoon Hyun, Soon Hee Kim, Sun Jung Yoon, Moon Suk Kim*, John M. Rhee, Gilson Khang†, and Hai Bang Lee*

BK21 Polymer BIN Fusion Team, Chonbuk National University, 664-14 Duckjin, Jeonju 561-756, Korea
*Nanobiomaterials Laboratory, Korea Research Institute of Chemical Technology, Box 107, Yuseong Gu, Daejeon 305-600, Korea
(Received July 14, 2005;accepted May 3, 2006)

초록 : 온도감응성 고분자인 폴리(에틸렌 글리콜)을 기본으로 하는 다이블록 및 트리블록 폴리에스테르 공중합체 들은 비독성과 생체적합성 그리고 생분해성 특징 때문에 조직공학 분야 및 주사제형의 약물전달체에서 많은 응용 이 이루어지고 있다. 본 연구에서는 다이블록 공중합체를 이용한 솔-젤 전이 현상을 갖는 고분자를 평균분자량 750 g/mole의 메톡시 폴리(에틸렌 글리콜)과 카프로락톤을 실온에서 HCl·Et2O 존재 하에서 개환중합을 통하여 합성하였다. 이 공중합체를 이용하여 in vivo 상에서 골수간엽줄기세포와 골유도물질인 덱사메타손의 존재 여부에 따라 골분화의 가능성을 조사하였다. 조직을 파라핀으로 고정시켜 슬라이드를 제조한 후 hematoxylin & eosin, 본쿠사 및 오스테오칼신 염색을 통하여 골형성 정도를 확인하였다. 결론적으로 덱사메타손이 함유된 젤이 골형성 에 도움을 주지만 젤만으로는 강한 골형성을 유도할 수 없으므로 줄기세포나 다른 골형성 유도재료를 사용하면 우수하게 골형성 효과를 가져올 것이라고 판단되었다.

Abstract : Poly(ethylene glycol)-based diblock and triblock thermo-sensitive polyester copolymers were investigated for application on tissue engineering and injectable biomaterials in drug delivery system due to their nontoxicity, biocompatibility and biodegradability. We synthesized the diblock co-polymers consisting of methoxy poly(ethylene glycol) (MPEG) (Mn=750 g/mole) and poly(ε-caprolactone) (PCL) by ring opening polymerization of ε-CL with MPEG as an initiator in the presence of HCl·Et2O. The effect of diblock copolymers on in vivo osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells (BMSCs) with and without the presence of osteogenic supplements (dexamethasone) was investigated. Thin sections were cut from paraffin embedded tissues and histological sections were stained by H&E, von Kossa, and immunohistochemical staining for osteocalcin. In conclusion, dexamethasone containing thermo-sensitive hydrogel might be improved osteogenic differentiation of BMSCs. We expect the osteoinduction effect to be excellent when it uses stem cell or other osteogenic materials.

Keywords : thermo-sensitive MPEG diblock copolymers, osteogenic, dexamethasone, BMSCs.

서 론

현대 산업사회는 사고 및 재해에 의한 빈번한 골조직의 파괴 및 결손, 나이에 따라 골밀도의 감소로 인한 골절, 그리고 선천적인 골형성 부전증같은 질환에 의한 성장부진 등과 같은 다양한 문제들에 대한 효과적인 재건방법으로 대두되고 있다.1-6 골결손을

치료하기 위한 조직공학적인 방법으로 세포가 성장할 수 있는 담체와 골아세포로 분화할 수 있는 줄기세포 그리고 골조직 형성의 유도분화를 촉진하는 골유도 물질이 필요하다.7-14

최근 가역적 솔-젤 전이현상을 갖는 수화젤은 약물 전달체와 조직공학의 응용을 위한 산업에서 광범위하게 적용되고 있으며 이에 대한 많은 연구가 진행되고 있다.15-24 이러한 수화젤은 주사형으로서 온도, pH, 및 신체 내의 생물학적 성분의 영향에 의해 원하는 형태로 쉽게 젤을 형성하고 수술에 의한 제거 과정이 필

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

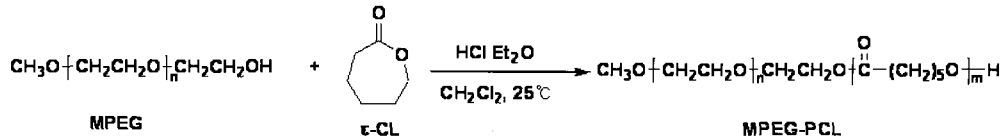


Figure 1. Polymerization scheme of MPEG-PCL diblock copolymers.

요인이 분해되거나 분산에 의해 신체 외부로 배출되는 장점을 가지고 있다. 특히, 온도에 의한 젤화는 유기용매를 사용하지 않고 수용액상에서 온도 변화에 의해 쉽게 약물이나 생물학적 활성 성분을 함유할 수 있다. 이러한 특성을 갖는 수화젤은 생체재료에 이용되기 위해서 생체적합성을 가지고 있어야 하며 분해 과정이나 배출 시 세포나 인체 대사 장기에 손상이 없어야 한다.²⁵⁻³⁷

현재까지 상업적으로 응용된 온도감응성 고분자로서 폴리(에틸렌 옥사이드) (PEO)와 폴리(프로필렌 옥사이드) (PPO), 폴리(부틸렌 옥사이드) (PBO) 등으로 구성된 PEO-PPO-PEO, PBO-PEO, 플루로닉®[®], 그리고 폴록사머 등이 응용되어 왔다. 이 고분자들을 생체재료로서 응용하기 위해서는 실온에서 술 상태 유지하며 다루기 쉽게 낮은 점도를 가지고 있어야 한다.¹⁵⁻³⁷

이에 일련의 전 연구에서는 생체적합적이며 생분해성 특징을 갖는 온도감응성 수화젤을 메톡시폴리(에틸렌 글라이콜) (MPEG)을 개시제로 ε-카프로락톤(CL)의 개환중합을 통해 합성하여 술-젤 상전이 현상의 특징을 갖는 것을 확인하게 되어¹⁵⁻²³ 조직공학적인 골형성을 위해 수화젤, 골형성 생리활성물질인 텍사메타손 그리고 골수간엽줄기세포(bone marrow stem cells, BMSCs)가 골형성에 미치는 영향을 확인하려 하였다. 여기서 텍사메타손은 BMSCs의 골분화에 매우 중요하게 작용하는 생리활성물질이다.³⁸⁻⁴⁰ 따라서 본 실험에서는 *in vivo* 상에서 골수간엽줄기세포와 골유도물질인 텍사메타손의 존재 여부에 따라 골분화의 가능성을 조사하였다. MPEG-PCL 다이블록 공중합체를 이용하여 새로운 술-젤 상전이 거동을 보이는 온도감응성 재료를 합성하였으며 NMR을 통해 분자량을 분석하였다. BMSCs는 마우스로부터 분리하여 배양하였으며, *in vivo* 환경에서 조직공학적 골형성을 관찰하기 위하여 면역결핍 쥐로 실험하여 조직학적 염색을 실시하였다.

실 험

시약 및 재료. 개시제로서 MPEG(Aldrich, Milwaukee, WI, USA)는 평균분자량 750 g/mole를 사용하였고 반응 단량체로서 CL(Aldrich)은 칼슘하이드라이드(CaH₂, Aldrich)하에서 감압 정제하여 사용하였다. CL의 중합촉매로서 HCl·Et₂O(Aldrich)는 정제과정 없이 사용하였다. MPEG-PCL의 반응용매로서 사용된 메틸렌클로라이드(MC, Jin Chem. Pharm. Co. Ltd., Korea)는 연속적으로 염화칼슘(Aldrich)과 CaH₂에서 질소기류 하에서 정제하였다. 반응 후 고분자의 침전을 위하여 헥산(Junsei chemical Co., Ltd., Japan)은 HPLC 등급을 사용하였다.

MPEG-PCL의 합성. 분자량 3150 g/mole의 공중합체를 합성하기 위하여 다음과 같은 과정을 실시하였다.¹⁵⁻²⁴ 개시제인 MPEG 3 g(4 mmol) 및 톨루엔 80 mL을 잘 건조된 100 mL 둥근 플

라스크에 넣고 딥 스탭 트랩을 사용하여 5시간 동안 130 °C에서 공비 증류를 실시하였다. 증류 후 톨루엔을 모두 제거하고 MPEG를 실온(25 °C)으로 냉각시킨 후 미리 정제된 CL 9.6 g(4 mmol)를 주사기를 이용하여 넣은 후 반응용매로서 미리 정제된 MC 40 mL을 넣은 다음 중합 촉매로서 HCl·Et₂O를 8 mL 투여하여 24시간 동안 실온에서 교반시켜 주었다. 모든 과정은 고순도 질소 하에서 실시하였다. 반응 후 미반응 단량체나 개시제를 제거하기 위하여 800 mL의 헥산에 반응물을 서서히 떨어뜨리면서 침전시켜주었다. 침전물은 MC에 녹여 거름종이로 거른 후 회전 증발기를 통하여 용매를 제거하고 감압 하에서 건조시켰다. MPEG-PCL의 중합식은 Figure 1에 나타내었다.

특성분석. 개시제와 합성 고분자의 몰 비에 대한 분자량은 내부 기준시료인 0.05 wt%의 테트라메틸 실란(TMS)을 포함한 CDCl₃(Merck, Germany)를 용매로 하여 ¹H-NMR(Bruker 300, 500 MHz, USA)를 통하여 분석하였다. 또한 미셀임계농도(critical micelle concentration, CMC)를 통해 MPEG-PCL 공중합체가 젤을 이루는 거동에 대해 분석하였다.

젤의 안정성 및 동물 실험. 수용액 내에서의 젤의 안정성을 확인하기 위하여 바이알 내에서 20 wt%의 고분자를 실온에서 용해시킨 후 37 °C에서 젤을 형성한 후 젤 위에 2 mL의 증류수를 넣어 전체 농도를 0.1 wt%로 고정하여 37 °C 진동 항온조에 보관하여 젤의 분산 여부를 관찰하였다. 또한, 체온 부근에서의 술-젤 전이를 확인하기 위하여 산화에틸렌 가스를 이용하여 450~1000 mg/L의 농도로 3~7시간 멸균을 실시한 후 20 wt% 농도를 선택하여 실온에서 완전 용해시킨 후 피하 주사기를 사용하여 고분자 1 mL 용액을 쥐의 피하에 주사하였다. 30일 후 주사 부위를 절제하여 젤 형성을 확인하였다.

골수간엽줄기세포의 배양. BMSCs는 10% 우태혈청(FBS, Gibco BRL Grand Island, NY, USA)과 1% 항생제(100 units/mL 페니실린과 100 µg/mL 스트렙토마이신, Gibco BRL)를 첨가한 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM, Gibco BRL)에 부유시킨 후 콜라겐을 코팅한 세포배양 플라스크에 분주하였다. 세포를 1×10⁵ cells/cm²의 농도로 37 °C, 5%의 CO₂ 세포배양기에서 배양한 후 2일에 한 번씩 배양액을 교체해 주었다.

***In vivo* 환경에서의 골형성 효과.** *In vivo* 환경에서의 조직공학적 골형성을 관찰하기 위해 쥐의 피하조직에 주입하고 서로 다른 함량의 텍사메타손을 함유한 젤과 BMSCs를 함께 이식하였다(Table 1). 4 주가 지난 후 다시 절개하여 형성된 젤을 10% 포르말린에 고정하였다. 고정된 지지체를 파라핀 블록으로 제작하여 3 µm 두께로 자른 후 슬라이드에 고정하고 조직학적 평가를 하기 위하여 H&E, 본쿠사 및 오스테오칼신 염색을 실시하였다.

Table 1. The Formulation of Dexamethasone Released Thermo-sensitive Gel for Osteogenesis of BMSCs

	Gel ^a	Gel ^a +Cell ^b	Gel ^a +Cell ^b +Dexamethasone
Sample 1	o	-	-
Sample 2	o	o	-
Sample 3	o	o	1 mg
Sample 4	o	o	5 mg
Sample 5	o	o	10 mg

^aGel : 0.4 g/sample. ^bCell(BMSCs) : 1 × 10⁵ cells/sample.

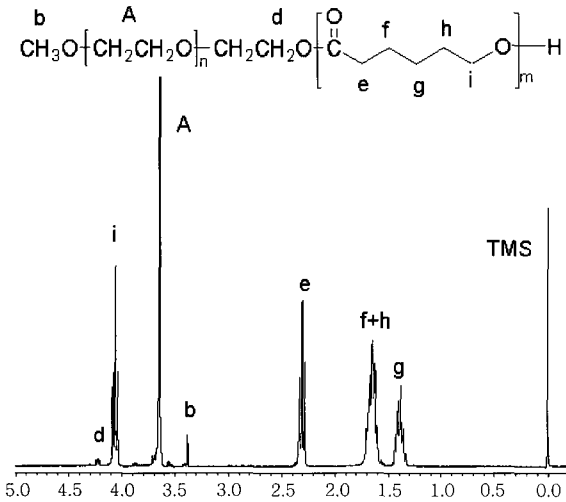


Figure 2. ¹H-NMR spectra of MPEG-PCL diblock copolymers.

결과 및 토론

블록공중합체의 합성. 온도감응성 약물 전달체를 준비하기 위하여 친수성의 MPEG와 소수성의 PCL로 구성된 블록공중합체를 합성하였다. MPEG($\bar{M}_n = 750$ g/mole)을 고분자 개시제로 하여 블록공중합체를 개환중합을 이용하여 98%의 정량적 수율로 합성하였으며 1.29의 매우 좁은 분산도와 이론적 분자량과 거의 유사한 분자량을 갖고 있음을 ¹H-NMR을 통해 확인하였다. 중합된 MPEG-PCL 블록공중합체의 특정 관능기에 대한 분자 구조는 ¹H NMR을 통해서 분석하였다(Figure 2). MPEG의 반복되는 CH₂의 프로톤은 $\delta = 3.65$ ppm (A)에서 확인할 수 있었고, 말단의 메톡시 프로톤은 $\delta = 3.38$ ppm (b)에서 확인하였다. PCL의 각각의 신호(f~i)는 $\delta = 2.31, 1.63, 1.39$, 그리고 4.07 ppm에서 확인하였다. 또한 PCL의 말단 OH 프로톤(j)은 $\delta = 3.70$ ppm에서 관찰하였다. 합성된 모든 블록공중합체는 신호 b와 d의 면적비가 정확히 3 : 2의 비율을 나타냄을 확인하였다. 이러한 결과로부터 블록고분자는 MPEG를 개시제로 사용하여 단량체의 개환중합으로 합성된 것을 확인할 수 있었다.^{15,17,23}

블록고분자의 솔-젤 상전이 거동. Figures 3과 4는 합성된 고분자의 수용액상에서의 온도에 따른 상전이 거동을 확인하기 위하여 농도별로 고분자를 증류수에 용해시킨 후 일정 온도의 간격에서 바이알을 기울임으로써 바이알 내에서 흐름 특성을 통해 솔-젤 상변화를 확인하였다.

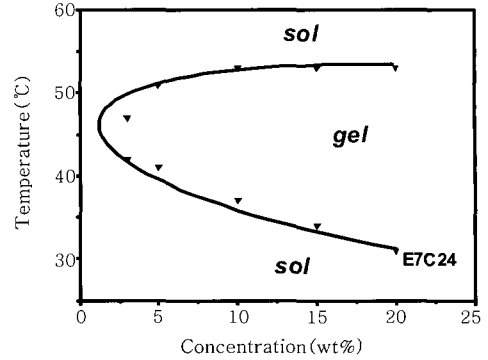


Figure 3. Sol-gel-sol phase transition curves of MPEG-PCL diblock copolymers in an aqueous solution.

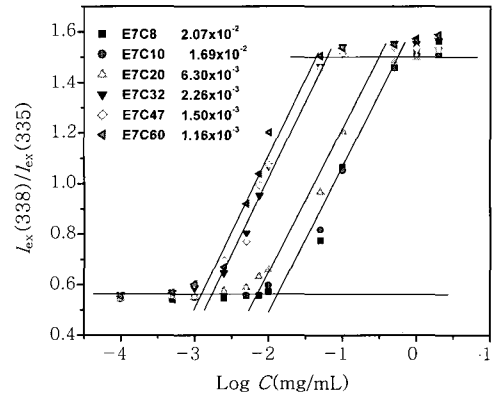


Figure 4. Plot of pyrene excitation spectra vs log C for concentration (C) of MPEG-PCL diblock copolymers.

젤의 안정성 및 동물실험. 형성된 젤의 무한 희석 용액 상에서의 젤의 안정성을 확인하기 위하여 MPEG-PCL 20 wt%를 37 °C에서 젤을 형성 후 2 mL의 증류수를 첨가하여 최종 농도가 0.1 wt%가 되도록 하여 100 rpm, 37 °C의 진동 항온조에서 젤의 분산여부를 확인하였다. Figure 5에서처럼 합성된 고분자 MPEG-PCL은 젤의 분산 없이 약 1달간 젤을 유지하고 있었다.

체온에서의 젤 형성 및 일정 기간 후의 젤의 보전을 확인하기 위하여 멸균된 MPEG-PCL를 증류수에 20 wt%로 희석하여 용해시킨 후 2 mL의 용액을 쥐의 피하에 주사하고, 30일 후 주사 부위를 절제하여 젤 형성을 확인하였다(Figure 6). 피하에 주사한 솔은 주입 후 수초 이내에 젤이 형성됨을 확인할 수 있었고, 30일 후에도 주사 부위를 절제하였을 때 젤이 분산 없이 잘 보전됨을 확인하였다.

골수간엽줄기세포의 배양. BMSCs를 4번 계대배양한 후 세포를 관찰한 결과 전형적인 BMSCs의 형태로 나타났으며, 4주 배양하여 실험에 필요한 양의 세포를 얻을 수 있었다.

In vivo 환경에서의 골형성에 관한 조직학적 평가. 젤에 BMSCs와 함량에 따른 텍사메타손을 피종하여 면역결핍 쥐의 피하를 절제한 후 주입하였다. 여기서 BMSCs를 빠르게 분화시키는데 작용하는 텍사메타손은 인체에 존재하는 부신피질호르몬 유사체로서 코르티코스테로이드에 속하는 약물로 항염증제 등으로 널리 사용되고 있는데 이의 약리작용 기전은 직접적인 골흡수 억제작용에

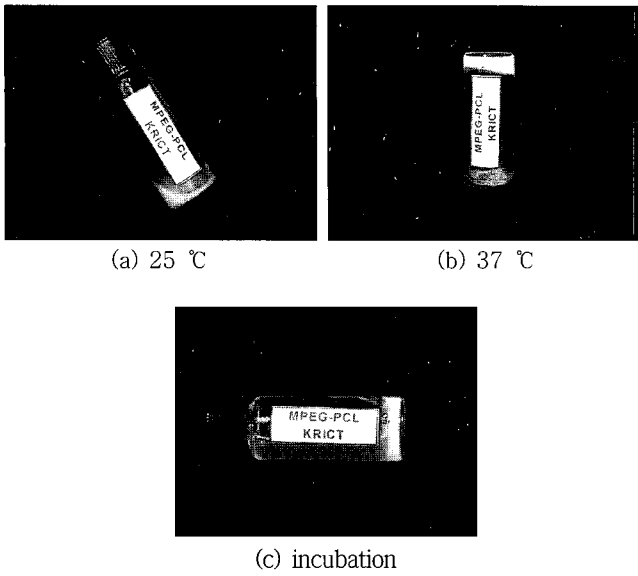


Figure 5. Sol-gel-sol phase transition behavior and incubation for 1 months of MPEG-PCL diblock copolymers in vial.

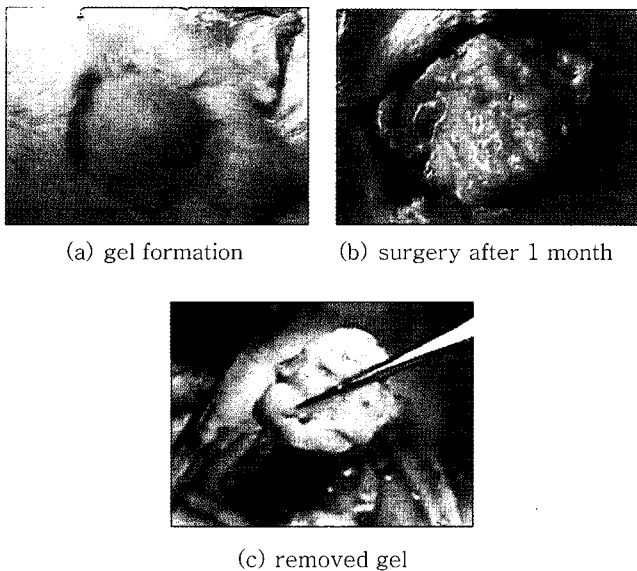


Figure 6. Gel conformation of MPEG-PCL diblock copolymer (20 wt%) on rat.

의해 조골세포의 성장을 촉진하고, 골형성 자극활성을 갖는 특징이 있다.³⁸⁻⁴⁰ 무엇보다도 골형성 성장인자는 다른 많은 성장인자들에게 나타나는 부작용인 종양형성 가능성을 완전히 배제할 수 없는 것이 문제점으로 꼽혀왔지만 덱사메타손은 생분해성 고분자로부터 오랜 시간 서서히 방출되어 BMSCs에만 국소적으로 작용해 분화를 효과적으로 유도하기 때문에 약물에 대한 부작용인 생체 내에서 다른 세포에 대한 작용 등을 현저히 줄일 수 있다는 장점을 가지고 있다.³⁸⁻⁴⁰

이러한 덱사메타손을 함유한 젤을 이식한지 4주가 지난 후 절개하여 형성된 젤을 분리하고 10% 포르말린 수용액으로 고정

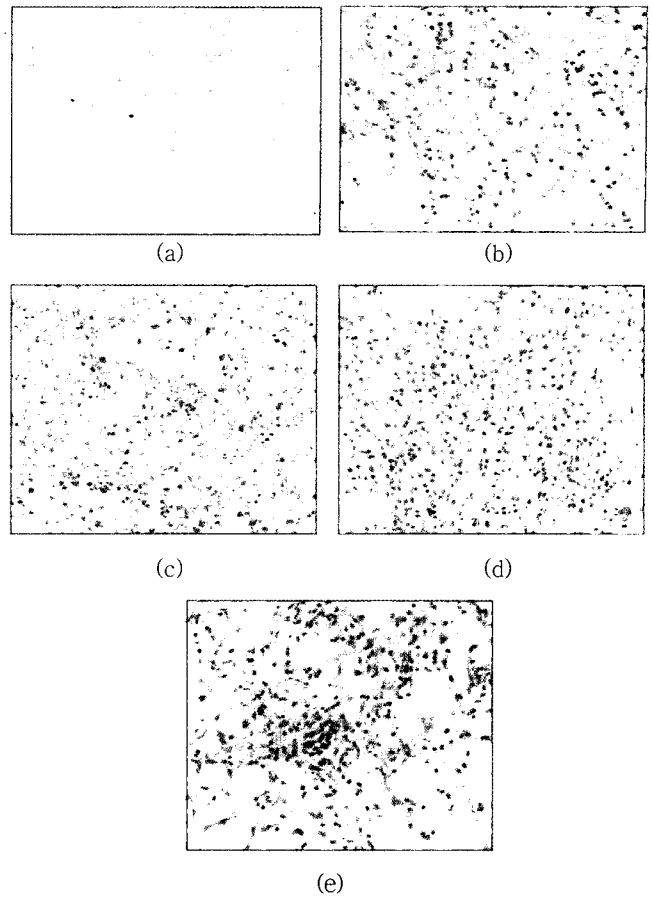


Figure 7. Photographs of histochemical staining for H&E (after 4 weeks, $\times 100$); (a) gel, (b) gel+cell(BMSCs), (c) gel+cell+dexamethasone 1 mg, (d) gel+cell+dexamethasone 5 mg, and (e) gel+cell+dexamethasone 10 mg.

한 후 3 μm 로 절단하여 슬라이드에 고정시키고 골분화 정도를 확인하고자 H&E, 본쿠사, 오스테오칼신 염색을 하였다. 먼저 골형성을 확인하기 위하여 세포의 배열 및 형태학적 변화를 관찰하기 위해 모든 조직 절편을 핵과 세포질을 구분해서 볼 수 있는 H&E 염색을 하였다. Figure 7에서 보면 미분해된 젤을 관찰할 수 있었는데 이는 합성한 젤이 체내에서 분해가 완전히 이루어지지 않았음을 나타낸다. 또한 덱사메타손의 양이 증가할수록 매크로파지의 증가를 확인할 수 있었는데 이는 젤이 어느 정도의 염증반응을 일으키기 때문이라고 사료된다. 즉 골유도물질인 덱사메타손의 양이 많아질수록 더 많은 뼈세포가 유도되어 밀집되어 있음을 관찰할 수 있었다.

조직에서 칼슘 형성을 본쿠사 염색을 통하여 알아보았다(Figure 8). 본쿠사 염색은 비탈회 표본염색으로서 조골세포가 가지는 인산염이나 탄산염 형태로 존재하는 칼슘을 실버나이트레이트로 처리하면 칼슘과 은이 은염으로 치환되고 이것은 강한 빛 즉 환원제에 의해 흑색의 금속 은으로 치환되는 것이다. 젤만 존재하는 것에서는 약간의 칼슘 영역을 확인할 수 있었지만 BMSCs와 덱사메타손의 함량이 증가할수록 칼슘침착 영역이 증가하는 경향을 보였다. 이를 단위면적으로 나누어 정량하였는데 덱사메타손의 양이

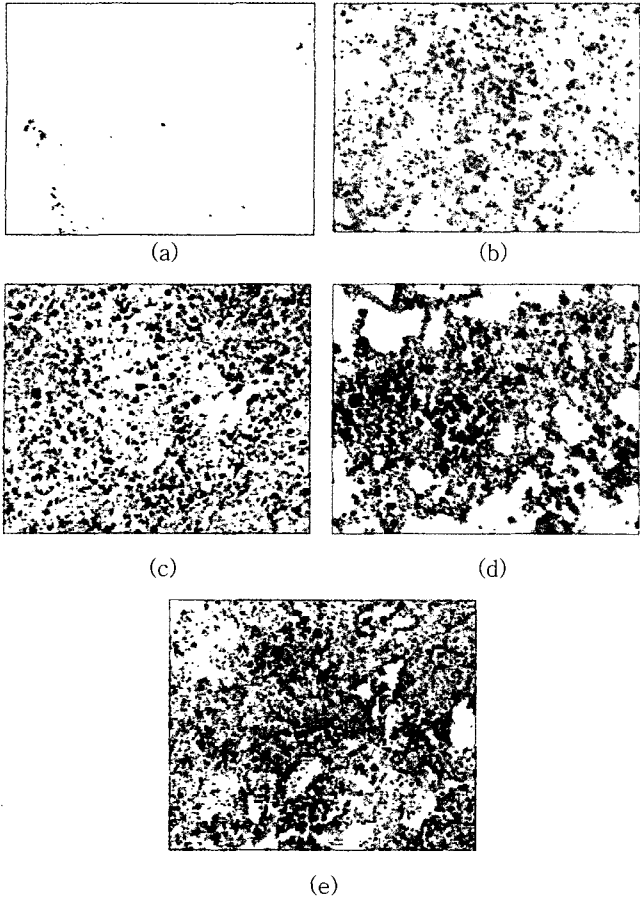


Figure 8. Photographs of histochemical staining for von Kossa (after 4 weeks, $\times 100$); (a) gel, (b) gel+cell (BMSCs), (c) gel+cell+dexamethasone 1 mg, (d) gel+cell+dexamethasone 5 mg, and (e) gel+cell+dexamethasone 10 mg.

1, 5, 10 mg이 첨가 될수록 칼슘이 각각 7.6, 13.7, 19.4% 형성됨을 확인할 수 있었다. 면역학적 염색법인 오스테오칼신 염색은 뼈와 상아질에서 존재하는 비콜라겐성 단백질로 세포막 주위에 갈색으로 염색되는 방법이다. Figure 9에서 보는 것처럼 젤만 존재하는 것은 핵주위의 세포막에 약간의 염색이 되었지만 BMSCs와 텍사메타손의 함량이 증가할수록 세포기질이 점점 강하게 염색되었음을 확인할 수 있었다.

결 론

본 연구에서는 합성된 공중합체에 BMSCs를 파종시키고 텍사메타손을 투여하여 골조직공학에 응용하고자 하였다. 저분자량 MPEG(Mn=750 g/mole)를 개시제로 하여 ϵ -CL의 개환 중합을 통해 수용액 상에서 새로운 솔-젤-솔 상전이 거동을 보이는 다이블럭 공중합체를 합성하였고 이를 수용액상에서 3~20 wt%로 용해시켜 실온에서 솔 상태를 유지하고, 31~53 $^{\circ}$ C의 범위에서 젤을 형성하며, 53 $^{\circ}$ C 이상에서는 다시 솔 상태의 특성을 보임을 확인하였다. 이를 이용하여 합성된 공중합체에 BMSCs와 함량별 텍사메타손을 파종하여 골형성이 되었는지 조직학적 평

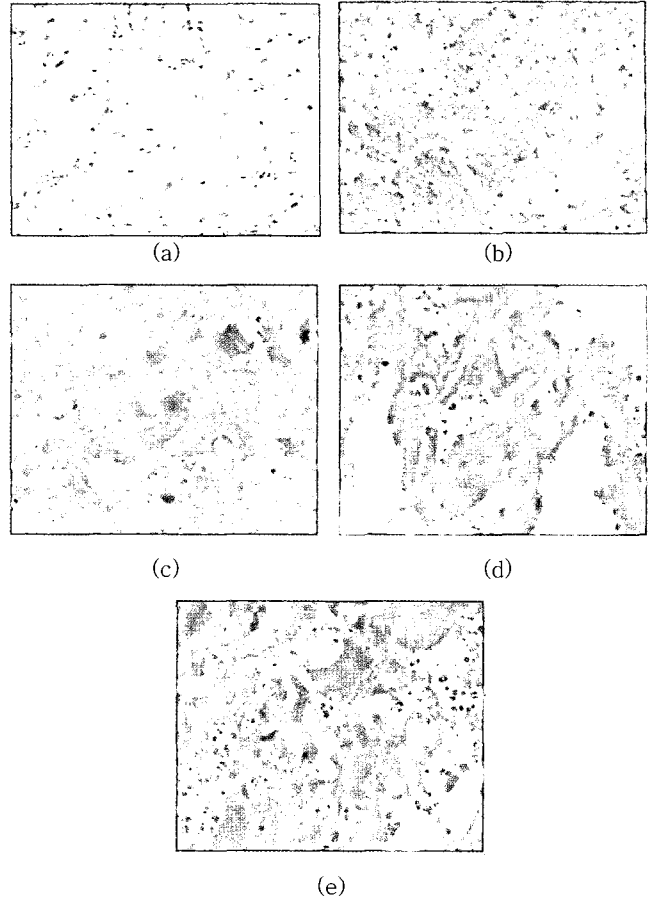


Figure 9. Photographs of histochemical staining for Osteocalcin (after 4 weeks, $\times 100$); (a) gel, (b) gel+cell (BMSCs), (c) gel+cell+dexamethasone 1 mg, (d) gel+cell+dexamethasone 5 mg, and (e) gel+cell+dexamethasone 10 mg.

가를 통해 알아보았다. H&E 염색 사진을 통해 텍사메타손의 함량이 높은 젤에서 더 많은 뼈세포가 유도되어 밀집되어 있음을 관찰할 수 있었다. 이는 BMSCs를 뼈로 분화하는데 작용하는 텍사메타손의 영향 때문이라고 사료된다. 또한 본쿠사 염색을 통해서 골세포가 가지는 칼슘형성 정도를 확인할 수 있었는데 텍사메타손의 함량이 증가할수록 칼슘 침착 영역이 증가함을 확인할 수 있었다. 면역화학적 염색인 오스테오칼신 염색에서도 텍사메타손의 함량이 증가할수록 강한 오스테오칼신 염색영역을 보였다. 하지만 합성된 젤만을 가지고는 강한 골형성 효과를 볼 수 없었는데 이는 젤만으로는 골형성을 가질 수 없고 줄기세포를 이용하거나 다른 골형성 재료와 같이 사용하였을 때 더 우수한 효과를 가진다고 사료된다.

결론적으로 합성된 공중합체를 통해 생체 내에서 새로운 골조직을 형성한다는 것을 다양한 염색법을 통해 확인하였다. 이는 BMSCs와 텍사메타손이 새로운 골조직의 형성에 매우 우수한 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

현재 합성된 공중합체에 텍사메타손을 첨가하여 텍사메타손의 서방화에 대해서도 실험 중에 있다.

감사의 글 : 본 연구는 보건복지부 및 세포응용사업단(SC3100)의 지원으로 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- G. Khang and H. B. Lee, in *Methods of Tissue Engineering*, A. Atala, and R. Lanza, Editors, Academic Press, p.771 (2001).
- G. Khang, I. W. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer Sci. Tech.*, **12**, 239 (2001).
- G. Khang, S. J. Lee, C. W. Han, J. M. Rhee, and H. B. Lee, in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, M. Elcin, Editor, Kluwer-Plenum Press, London, Vol. **657**, p.235 (2003).
- G. Khang, S. J. Lee, I. W. Lee, and H. B. Lee, *Polymer Sci. Tech.*, **13**, 4 (2002).
- G. Khang, M. S. Kim, S. H. Cho, I. W. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 9 (2004).
- G. Khang, M. S. Kim, and H. B. Lee, *Chem. World*, **45**, 24 (2005).
- G. Khang, S. K. Kim, K. D. Hong, W. Y. Jang, M. S. Kim, C. W. Han, I. W. Lee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 136 (2004).
- H. S. Kim, I. W. Lee, J. M. Lee, C. W. Han, J. H. Sung, M. Y. Park, G. Khang, and H. B. Lee, *J. Korea Soc. Endocrinology*, **17**, 206 (2002).
- G. Khang, E. J. Kim, S. H. Kim, K. S. Park, C. W. Han, Y. S. Yang, M. S. Kim, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **2**, 20 (2005).
- S. J. Lee, D. H. Lee, G. Khang, Y. M. Lee, and H. B. Lee, *Macromol. Chem. Symp.*, **15**, 201 (2002).
- J. W. Jang, B. Lee, C. W. Han, I. W. Lee, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **27**, 226 (2003).
- S. J. Lee, I. W. Lee, Y. M. Lee, H. B. Lee, and G. Khang, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **15**, 1003 (2004).
- J. W. Jang, B. Lee, C. W. Han, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **28**, 382 (2004).
- J. W. Jang, K. S. Park, S. H. Kim, C. S. Park, M. S. Kim, C. W. Han, J. M. Rhee, G. Khang, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **2**, 34 (2005).
- K. S. Seo, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **28**, 211 (2004).
- K. S. Seo, S. K. Chon, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **28**, 232 (2004).
- M. S. Kim, K. S. Seo, G. Khang, S. H. Cho, and H. B. Lee, *J. Biomed. Mater. Res.*, **70A**, 154 (2004).
- K. S. Seo, M. S. Kim, K. J. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **28**, 328 (2004).
- K. S. Seo, C. S. Park, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **28**, 344 (2004).
- M. S. Kim, K. S. Seo, S. Y. Jeong, G. Khang, S. H. Cho, and H. B. Lee, *Polymer Preprints*, **45**, 1054 (2004).
- M. S. Kim, K. S. Seo, G. Khang, S. H. Cho, and H. B. Lee, *J. Polym. Sci.: Part A: Chem. Ed.*, **42**, 5784 (2004).
- K. S. Seo, M. S. Kim, G. Khang, S. H. Cho, and H. B. Lee, *Polymer Preprints*, **46**, 820 (2005).
- M. S. Kim, K. S. Seo, G. Khang, and H. B. Lee, *Macromol. Rapid Commun.*, **26**, 643 (2005).
- M. S. Kim, H. S. Seong, S. H. Cho, H. B. Lee, K. S. Chae, J. S. Lee, and G. Khang, *Bio-Med. Mater. Eng.*, **15**, 229 (2005).
- Y. H. Bae, T. Okano, R. Hsu, and S. W. Kim, *Makromol. Chem. Rapid Commun.*, **8**, 481 (1994).
- H. Feil, Y. H. Bae, J. Feijen, and S. W. Kim, *Macromolecules*, **25**, 5440 (1992).
- R. Yoshida, K. Uchida, Y. Kaneko, K. Sakai, A. Kikuchi, Y. Sakurai, and T. Okano, *Nature*, **372**, 240 (1995).
- C. S. Brazel and N. A. Peppas, *Macromolecules*, **28**, 8016 (1995).
- S. R. Park, B. H. Min, S. H. Park, and H. J. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **2**, 77 (2005).
- G. H. Chen and A. S. Hoffman, *Nature*, **373**, 49 (1995).
- J. L. Thomas, H. You, and D. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 2949 (1995).
- J. Yang, S. Pickard, N. J. Deng, R. J. Barlow, D. Attwood, and C. Booth, *Macromolecules*, **24**, 670 (1994).
- B. Jeong, Y. H. Bae, D. S. Lee, and S. W. Kim, *Nature*, **388**, 860 (1997).
- R. Bhardwaj and J. Blanchard, *J. Pharm. Sci.*, **85**, 915 (1996).
- Y. J. Kim, S. Choi, J. J. Koh, M. Lee, K. S. Ko, and S. W. Kim, *Pharm. Res.*, **18**, 548 (2001).
- B. Jeong, Y. H. Bae, and S. W. Kim, *J. Biomed. Mater. Res.*, **50**, 171 (2000).
- F. Berglund, *Acta Physiol. Scand*, **73**, 20 (1968).
- J. S. Temenoff, E. S. Steinbis, and A. G. Mikos, *Orthopaedic Tissue Engineering: Basic Science and Practice*, New York, Marcel Dekker, p.77 (2004).
- C. G. Bellow and J. N. M. Heersch, *Dev. Biol.*, **140**, 132 (1990).
- D. Benayahu, A. Fred, D. Zipori, and S. Wientroub, *Calcif. Tissue Int.*, **49**, 202 (1991).