

인체 양막의 골형성유도능 평가

¹한 정 옥 · ²서 영 권 · ²박 정 극 · † ¹송 계 용
¹중앙대학교 의과대학 병리학교실 ²동국대학교 생명화학공학과
(접수 : 2008. 6. 11., 게재승인 : 2008. 8. 7.)

Evaluation of Osteoinduction Efficacy of Human Amniotic Membrane

Jung-Wook Han¹, Young-Kwon Seo², Jung-Keug Park², and Kye-Yong Song^{1†}

¹Department of Pathology, Chung-Ang University, 221, Dongjak-gu, Seoul 156-756, Korea

²Department of Chemical and Biochemical Engineering, Dongguk University 3-26, Choong-gu, Seoul 100-715, Korea

(Received : 2008. 6. 11., Accepted : 2008. 8. 7.)

Amniotic membrane (AM) has been used in various medical application such as biomaterials and it has a biocompatibility and wound healing effects. In this studies, we made AM sponge that was homogenized with AM and then lyophilized. And osteoinduction efficacy of AM sponge was evaluated with collagen sponge by mesenchymal stem cell culture and implantation in nude mouse. As a result of this study, adhesion and proliferation of MSC cells on AM sponge and collagen sponge were not different, but AM sponge was more superior to collagen sponge for induction of collagen secretion and calcium adhesion in matrix in vivo. Besides, AM sponges were more positive stained than collagen sponge about osteocalcin and osteonectin. As a results of this study, there is possibility of doing that AM could increase osteoinduction.

Key Words : Osteoinduction, Human amniotic membrane, Scaffold

서 론

스포츠와 여가의 증가로 많은 정형외과 손상환자들이 증가하였고, 고령화 사회로 진입하면서 치과관련 환자의 수도 점점 증가하고 있는 추세이다. 이러한 서구화된 사회구조는 보건 의료사업의 증대와 사회구성원에 대한 복지향상을 요구하고 있다. 이러한 흐름에 따라 조직공학적인 치료방법은 이미 피부, 뼈, 연골 등의 조직 재생치료에 이용되고 있으며 각막, 신경 재생, 인공 혈관 등에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 조직공학 기술을 적용한 골의 재건에는 생분해성 재료로 스캐폴드를 제조하여 이식하는 방법, 여기에 세포 성장 인자를 도입하는 방법, 그리고 세포를 배양하여 이식하는 방법 등 다양한 연구가 진행되고 있다.

천연 생분해성 고분자 중에서 콜라겐, 히아루론산, 키토산, 그리고 소장점막하조직 (SIS) 등이 골재생용 스캐폴드 제조에 이용되고 있으며, 인공적으로 합성된 생분해성 재료중에 폴리락틱산 (polylactic acid, PLA), 폴리글리콜산 (polyglycolic acid,

PGA), 폴리락틱글리콜산 (Poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA), 그리고 폴리카프로락톤 (polycaprolactone, P-CL) 등의 재료 등이 연구되어지고 있다. 이들은 높은 기계적 물성과 생체적합성을 지니고 있어 현재 생체재료로서 다양한 연구들이 진행되고 있으나 합성고분자는 천연고분자보다 체내에서 염증반응을 좀 더 유발하는 문제점이 있다.

그리고 다양한 성장인자들중에 BMP-2, PDGF, IGF-1, TGF- β , 그리고 bFGF 등을 이용하여 골형성을 촉진시키는 연구들이 진행되고 있으나 고가의 비용이 들어가는 문제점이 있다. 골재생은 정형외과, 치과, 그리고 이빈후과 영역에서 광범위하게 필요로 하며 강한 기계적 강도를 요구하는 부위도 있으나 임플란트나 치조골, 그리고 골 부분 결손에 대한 충전물로서의 이용도 많아지고 있다. 소의 뼈를 가공한 인공골 등이 현재 이용되고 있으나 광우병 및 바이러스 감염 등의 문제가 있고, 사체의 뼈의 이용한 동종이식도 이용되고 있으나 공급의 제한이 있다. 따라서 이러한 골재생을 위하여 염증반응이 적고 세포적합성 및 생체적합성이 우수하며 골재생을 촉진시키는 새로운 골재생용 재료의 개발이 절실히 필요하다. 대부분의 합성된 생분해성 고분자들은 인공골 개발에 시도되었으나 염증문제를 해결하지 못했고 세라믹 등은 환자 자신의 골재생이 느리게 진행되는 문제점이 있다.

최근에 양막을 이용한 다양한 연구들이 시도되고 있는데

† Corresponding Author : Department of Pathology, Chung-Ang University, 221, Dongjak-gu, Seoul 156-756, Korea

Tel : +82-2-820-5656, Fax : +82-2-825-7823

E-mail : sky@cau.ac.kr

양막 (amniotic membrane)은 태아막 (fetal membrane)중 제일 안쪽에 있는 막으로 모체 쪽으로부터의 각종 감염 및 면역 반응 등으로부터 태아를 보호하는 중요한 장벽역할을 하며, 두터운 바닥막과 무혈관성 간질로 이루어져 있다. 양막은 조직학적으로 단층인 양막세포 (amnion cell)와 바닥막 (basement membrane)으로 구성되어 있고 바닥막은 파이브로넥틴, 라미닌, 제4형 콜라겐 (Type IV collagen), 인테그린 $\alpha 6\beta 4$ 등이 포함되어 있다. 바닥막과 붙어 있는 간질층면 (stromal side)에는 주로 헤파란 설페이트 (heparan sulfate), 케라탄 설페이트 (keratan sulfate), 하이루론산 (hyaluronic acid), 제 1, 3형 콜라겐 (Type I, III collagen) 등으로 구성되어 있다. 그 외에도 양막에는 상피세포성장인자 (EGF), 인슐린 유사 성장인자 (IGF), 트랜스포밍 성장인자 (TGF)- α , 간세포 성장인자 (HGF), 혈관내피세포 성장인자 (VEGF), 분해효소억제제 (TIMP-1, 2) 등의 많은 성장인자 (growth factor) 및 생리활성물질이 함유되어 있다(1, 2). 이러한 구조적인 특징과 구성 성분으로 인하여 드레싱으로 사용시 환부의 염증 감소, 물과 단백질 등의 전해물질의 손실 억제로 인한 반흔 감소 및 통증의 경감 등의 효과가 있고, 라미닌과 제4형 콜라겐 등의 기저막 성분들이 남아 있어 상피세포의 이동 및 재상피화를 촉진시켜준다.

지금까지 양막을 그 자체적으로 이용하거나 몇몇 세포의 배양기질로 이용하려는 연구는 진행되고 있으나 아직까지 양막이 골형성 및 재생에 미치는 영향에 관한 연구는 없었다. 따라서 본 연구에서는 양막을 분쇄하여 양막스폰지를 제조한 뒤 중간엽줄기세포를 배양하고, 동물이식을 통하여 체내에서의 골형성유도능을 평가하였다.

재료 및 방법

골수 유래 중간엽 줄기세포의 분리 및 일차 배양

골수유래 중간엽줄기세포 (BM-MSC, bone marrow derived mesenchymal stem cells)는 환자의 동의와 중앙대학교 윤리위원회 허가를 득하여 사람 공여자의 골수로부터 분리하였다. 먼저 혈액응고를 막는 헤파린이 처리된 주사기로 장골 (iliac bone)로부터 골수 (bone marrow)를 천자하여 응고되지 않은 상태로 채취하였으며 이렇게 분리된 일부 골수는 Ficoll Histopaque (1.077 g/ml, Sigma) 용액과 1 : 1로 혼합한 뒤 2000 rpm의 속도로 20분간 원심 분리하였다. 원심 분리 후 형성된 버피코트층을 회수하고 이를 PBS와 함께 다시 혼합하여 원심분리한 뒤 침전된 세포를 회수하여 10% 우태아 혈청이 첨가된 Low Glucose Dulbecco' Modified Eagle's Medium (LG-DMEM; Invitrogen)를 이용하여 2×10^5 cells/cm²의 농도로 배양용기에 접종하였다. 이렇게 분리된 중간엽줄기세포들은 3일 간격으로 배지를 교체하였고, 배양용기 표면의 약 70% 증식배양 되면 계대배양 (subculture)을 실시하였다.

세포 표면 항원 검사

일차 배양된 세포가 중간엽 줄기세포 인지를 확인하기 위해 세포의 표면 항원검사 (Fluorescence activated cell sorting, FACS)를 시행하였다. 배양된 세포를 0.25% 트립신/0.2% 이디티에이 (EDTA)로 떼어낸 다음 0.5×10^6 cells/ml의 농도로 맞추고 여러

가지 항체로 20분간 반응시켰다. 이때 사용한 항체는 anti-CD73, CD90, CD105 (PE, Bayport, MN, USA)를 사용하였다. 위와 같이 항체와 반응한 세포용액을 2배 부피의 PBS로 세척한 다음 순환 완충액 (flow buffer; 1% paraformaldehyde, 0.1% sodium azide, and 0.5% bovine serum albumin in PBS)로 고정시킨 후 이 세포들을 flow cytometer (FACSscan; BD Sciences)로 측정하였고, 결과치 (data)는 CELLQUEST software (BD Sciences)으로 분석하였다.

콜라겐 스폰지와 양막 스폰지의 제조

1% (w/v) 아텔로콜라겐 (ateolcollagen, bioland, Korea)과 10 mg/ml의 콘드로이틴 설페이트 (chondroitin-6-sulfate, Sigma)를 9 : 1로 혼합한 뒤 동결 건조하여 지름 10 mm의 콜라겐 스폰지를 제조하였다. 양막은 혈청검사상 B형 및 C형 간염, human immunodeficiency virus (HIV) 항체, venereal disease research laboratory (VDRL) 음성이며 전신적인 질환이 없는 건강한 산모에서 제왕절개를 통해 얻어진 태반으로부터 분리하였다. 태반으로부터 양막을 벗겨낸 후 항생제 (100 units/mL 페니실린, 100 μ g/mL 스트렙토마이신, 1 μ g/mL 아포테리신, Invitrogen)를 포함한 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM; Invitrogen)배지에 담아 4°C에서 실험실로 운반해 와서 다음과 같은 방법을 사용하여 양막을 처리하였다. 먼저 인산염 완충 용액 (Phosphate buffer saline; PBS)으로 5회 세척하여 혈액 등의 이물질을 제거한 뒤 -80°C에서 3시간 동안 냉동시킨 후 48시간 동안 동결 건조하여 건조된 양막을 준비하였다. 그리고 동결 건조된 양막을 0.1% 아세트산에 10 mg/ml 농도로 갈아서 분쇄시킨 후 10 mg/ml 콜라겐 (bioland, Korea)과 1 : 1로 혼합한 뒤 동결 건조하여 10 mm의 양막 스폰지를 제조하였으며, 제조된 스폰지를 가교반응을 실시하였다. 먼저 40% (v/v) 에탄올 20 ml에 50 mM의 2-morpholinoethane sulfonic acid (MES)을 녹인 후 스폰지 50 mg을 넣고 30분간 처리하였다. 그리고 40% (v/v) 에탄올 20 ml에 50 mM의 MES와 20 mM 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl)carbodiimide (EDC), 그리고 5 mM N-hydroxysuccinimide (NHS)을 녹인 후 스폰지 2차 처리하였다. 그리고 0.1 M Na₂HPO₄ 로 1시간 동안 세척한 후 1 M NaCl로 1시간, 2 M NaCl로 2시간동안 세척한 뒤 감마멸균 후 사용 전까지 냉동 보관하였다.

3차원 배양 및 골분화유도

콜라겐과 양막스폰지에 각각 중간엽줄기세포를 10% 우태아 혈청이 첨가된 low glucose Dulbecco' Modified Eagle's Medium (LG-DMEM; Invitrogen)를 이용하여 5×10^5 cells/개의 농도로 접종하였다. 이렇게 접종된 중간엽줄기세포들은 3일 간격으로 배지를 교체하였고, 7일 뒤 골분화용배지 (100 nM dexamethasone, 10 mM β -glycerophosphate, 0.05 mM ascorbic acid 2-phosphate, 그리고 10% 혈청이 함유된 high glucose DMEM로 교체하면서 2주간 배양하였다.

동물이식

콜라겐 및 양막스폰지의 골형성 유도능을 비교하기 위해 누드마우스의 등에 pocket 방식으로 이식하였다. 먼저 럽폰 (Yuhan Corp., Seoul, Korea)과 케타민 (Byer Korea Ltd., Korea)을 1 : 9

비율로 섞은 뒤 약 40 μ l를 복강 주사하여 마취한 후 포비돈으로 세균하였다. 그리고 각 군당 2마리씩 이식하였으며 대조군으로 콜라겐 스폰지를 이식하였으며 항생제를 7일간 물에 섞어 복용시켰다. 이식 후 4주째 수술 부위를 절제하여 10% 포르말린에 고정하고 통상적인 방법을 따라서 H/E 염색 및 면역화학염색을 실시하고 병리조직학적 변화를 관찰하였다.

결과 및 고찰

골수 유래 중간엽 줄기세포의 분리 및 일차 배양

골수에서 분리 및 배양된 중간엽줄기세포는, 현미경 관찰 결과 건강하고 정상적인 세포의 형태를 유지하고 있었다(Figure 1). 골수 1.5 ml을 이용하여 중간엽줄기세포를 일차배양하면 약 10일 뒤, 1×10^6 cells의 중간엽줄기세포를 얻을 수 있었으며 섬유모세포와 유사한 세포 형태를 가지고 있음을 관찰 할 수 있었다. 배양된 세포가 중간엽줄기세포인지를 확인하기 위해 세포 표면 항원 검사 (Fluorescence activated cell sorter, FACS)를 실시한 결과, 중간엽줄기세포 표면 특이 표지자인 CD73, CD90, CD105를 각각 99.87%, 99.86%, 그리고 99.86% 정도 발현하고 있어 간접적으로 중간엽줄기세포임을 확인할 수 있었다(Figure 1).

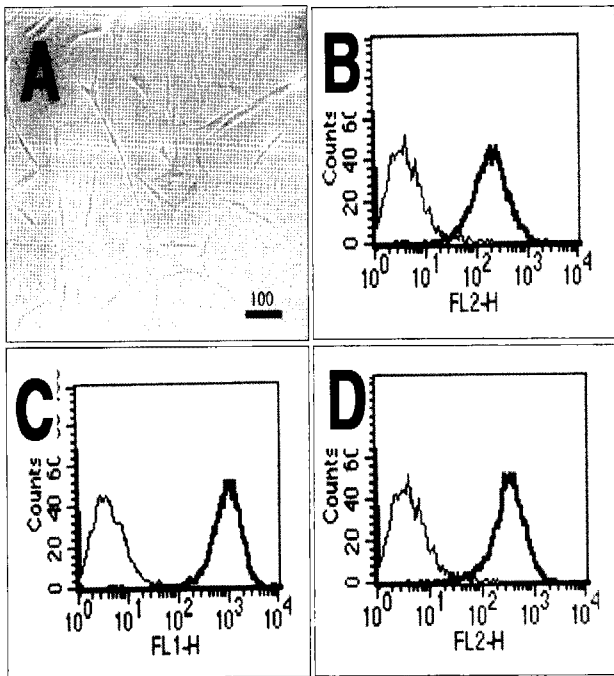


Figure 1. Light microscopy of primary cultured human mesenchymal stem cells (MSC) from bone marrow after 7 days (A) and FACS analysis of MSC surface markers (B: CD73 (99.87%), C: CD90 (99.86%), D: CD105 (99.86%), bar=100 μ m).

스캐폴드의 제조 및 체외 배양

콜라겐스폰지와 양막스폰지는 두께 1.5 mm, 지름 10 mm의 다공성의 디스크 형태로 제조되었으며 외형적으로 큰 차이가 없었다(Figure 2). 각 시료에 중간엽줄기세포를 5×10^5 cells를 접종한 뒤 7일 배양한 결과 콜라겐스폰지와 양막스폰지에 세포가 잘 부착하여 증식하고 있음을 관찰할 수 있었으며 두 실험군간에 큰 차이는 없었다(Figure 3).



Figure 2. Gross appearance of the amniotic membrane(AM) sponge and collagen sponge (Diameter=10 mm).



Figure 3. Histological comparison of the AM (A) sponge and collagen sponge (B) after 14 days culture (A, B: H&E staining, Original magnification: $\times 40$, Scale bar=200 μ m).

동물이식

이식 8주후 누드마우스를 관찰해 보면, 양막스폰지 이식부위 (화살표)가 콜라겐스폰지 이식부위 (화살표 머리)에 비해 외형적으로 좀 더 큰 것을 확인할 수 있었다(Figure 4A). 이를 생검한 결과 양막스폰지 (원형)에 비해 콜라겐스폰지 (사각형)가 좀 더 크기가 작아진 것을 관찰할 수 있었으며 이는 체내에서 분해되어 시료의 크기가 작아진 것으로 판단된다(Figure 4B).

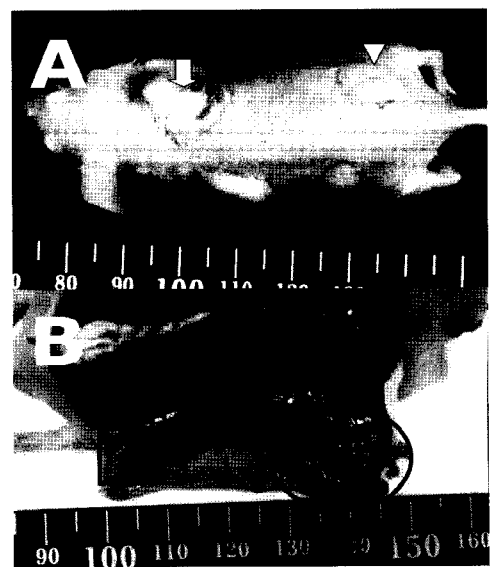


Figure 4. Optical microscopic photographs of the nude mouse. Cultured sponges implanted subcutaneously into dorsal area of nude mouse as a pocket type (A) and biopsy after 8 weeks of implantation (B). Dissected AM sponge showed some hardness (arrow: AM sponge implanted area, arrowhead: collagen sponge implanted area, circle: AM sponge, square: collagen sponge).

각각의 시료를 고정한 뒤 H/E 염색을 실시한 결과 양막스폰지와 콜라젠 스폰지 모두 세포가 균일하게 증식되고 있었으나(Figure 5A,B), 양막스폰지에서 좀 더 많은 새로운 콜라젠(별표시)이 분비된 것을 관찰할 수 있었다(Figure 5). 칼슘침착 정도를 확인하기 위해 본코사(von-kossa)염색 결과, 콜라젠 스폰지에서는 일부만 칼슘침착(갈색)이 관찰되었으며 시료의 중앙부위(원)는 칼슘침착이 관찰되지 않았다(Figure 5D). 이에 비해 양막스폰지에서 전체적으로 칼슘침착(화살표머리)이 균일하게 진행되고 있음을 확인할 수 있었다(Figure 5C).

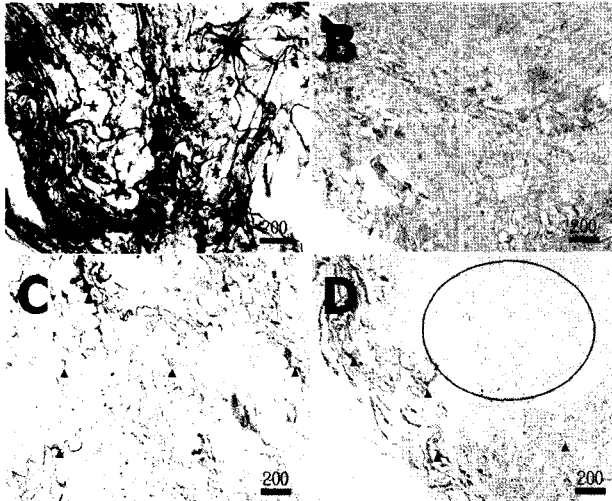


Figure 5. Histological section of the transplant 8 weeks after surgery. H&E stained paraffin sections (A, B) showing new secreted ECM. In the AM sponges (A), thicker, dense new secreted collagen were observed (stars), and the von-kossa staining shows that calcification in sponge. Positive von-kossa staining of the AM sponge graft (C) was more uniform than the collagen sponge graft (D). (circle: no stained area for von-kossa). (A, C: AM sponge grafting; B, D: Collagen sponge grafting, Original magnification: 40 \times , Scale bar: 200 μ m).

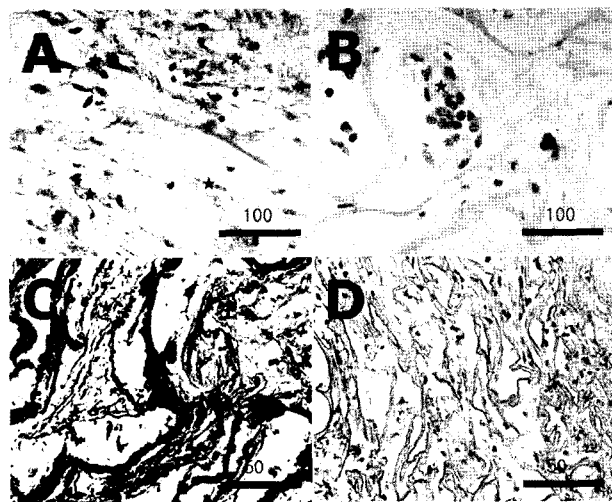


Figure 6. Immunohistochemistry of paraffin sections with antibodies against osteocalcin and osteonectin. The grafted AM sponges (A, C) and collagen sponge (B, D) have been converted into bone like tissue populated with MSCs and newly synthesized ECMs. AM sponges were more positive stained than collagen sponge for osteocalcin (A, B) and osteonectin (C, D) (stars: new secreted ECMs). (A, C: AM sponge grafting; B, D: Collagen sponge grafting, Original magnification: A, B 400 \times ; C, D 200 \times ; Scale bar: A, B 100 μ m; C, D 50 μ m).

또한 세포가 분비하는 세포외기질중 오스테오칼신(osteocalcin)을 염색한 결과 양막스폰지(Figure 6A)에서 콜라젠스폰지(Figure 6B)에 비해 좀 더 많은 오스테오칼신(별표시)이 발현되었으며, 오스테오네틴(osteonectin)도 콜라젠 스폰지(Figure 6D)에 비해 양막스폰지(Figure 6C)에서 좀 더 강하게 발현되었음을 관찰할 수 있었다.

이러한 결과에서, 콜라젠스폰지보다 양막스폰지에서 골형성 유도능이 좀 더 가능성이 있음을 확인할 수 있었다.

고 찰

인공골은 인공고관절 등과 같이 완전대체용과 외상, 수술 등으로 인해 생기는 골결손을 치료하기 위한 부분대체용으로 나눌 수 있다. 세라믹 등을 이용한 인공고관절 등은 현재 임상에서 이용되고 있으나, 부분골 결손을 위한 골충진재 등은 아직까지도 연구가 진행중에 있다.

골결손을 위한 치료법에는 자가골이식이나 동종이식등이 이용되었고 근래에는 이종골 및 세라믹계열의 인공골 제품들도 시술되고 있다. 자가골이식은 채취부위의 통증과 장기간에 걸친 치료가 요구되고, 동종이식은 공급의 제한이 있으며 세라믹계열의 인공골은 세포의 이동과 골재생의 속도가 느린 단점이 있다. 최근의 골재생에 관련된 연구들은 대부분 콜라젠, 히아루론산, 키토산 등의 생분해성 천연고분자와 PLA, PLGA, Poly-carprolacton 등의 생분해성 합성고분자등이 이용되고 있으며, 여기에 골유도를 향상시키기 위해 bFGF, TGF, 그리고 rhBMP등과 같은 성장인자를 도입하는 연구들이 진행되고 있다. Nakahara 등은 bFGF가 함유된 콜라젠스폰지를 제조한 뒤 개의 치조골(alveolar bone) 결손부위에 이식한 결과 bFGF가 함유된 스폰지 이식군에서 골형성이 촉진된 것을 관찰하였고(3), Oest 등은 BMP-2와 TGF- β 3가 함유된 알긴산(alginate)을 다공성 PLDL스캐폴드에 접종하여 성장인자가 함유된 PLDL스캐폴드를 제조한 뒤 쥐의 다리 결손 부위에 이식한 결과 성장인자가 함유되지 않은 PLDL스캐폴드보다 골재생이 촉진된 것을 보고 하였다(4). 그리고 Lee 등은 rhBMP-2가 함유된 PLLA/TCP를 토끼의 두개골에 이식한 결과 성장인자가 함유되지 않은 부위보다 더 많은 골재생이 이루어진 것을 확인하였다(5). 이러한 rhBMP를 이용한 연구는 다공성 Calcium phosphate (Ca-P) cement를 이용한 연구에서도 유사한 결과를 확인할 수 있었다(6).

그러나 이러한 연구에 있어 성장인자는 매우 비용이 고가이고 이를 대처할 수 있는 다른 재료의 공급이 필요하다. 이에 천연재료중하나인 소장점막하조직(SIS: small intestinal submucosa)이 골재생을 위한 재료로 연구가 시도 되었다. 돼지의 SIS도 다른 생체재료로 여러 분야에 이용되어 지는데, 이는 SIS 조직에 제 1, 4, 7형 콜라젠, 글리코사미노글리칸, 히아루론산, 헤파린, 콘드로이틴설페이트 등의 세포외 기질뿐만 아니라 섬유모세포 성장인자(FGF-2), 전환 성장인자(TGF- β) 등 다양한 성장인자(growth factor)가 함유되어 있기 때문이다(7). 이러한 이점 때문에 SIS는 건 및 인대재생에 시도되었는데, 건의 결손부위를 SIS로 감싸 여러 성장인자와 세포외기질의 치유 효과, 그리고 주변조직의 침윤을 막아주는 방어벽 역할을 수행하여 건의 재생이 잘 이루어짐을 알 수 있었다(8-11).

이러한 다양한 SIS의 장점을 이용하여 Suckow 등은 SIS를 랫의 골 결손부위에 감싸서 골형성이 촉진되는 것을 확인하였고, Douglas 등도 이와 유사한 동물실험 결과를 보고하였다. 최근에 와서는 Khang등은 PLGA에 SIS를 같이 혼합하여 다공성 스캐폴드를 제조하여 골형성이 촉진됨을 보고하였다(12-14).

본 연구에 이용된 양막도 다양한 치료에 이용되어 왔고 SIS와 유사한 성장인자들이 함유되어 있다. 양막은 임상적으로 피부화상, 욕창 그리고 궤양 등의 드레싱 및 복막조직 유착 방지 등에 사용되어져 왔고, 안과영역에서도 스티븐-존슨 증후군과 각막 알칼리 화상 등의 질환에서 안구표면 드레싱으로 많이 이용되고 있다. 최근에는 신경유도관, 구강점막 및 기도상피세포, 그리고 각막 상피세포의 배양 기질로 이용되는 연구도 활발히 진행되고 있다. 그리고 양막을 이용하여 건 (tendon)을 재생시키려는 동물적 실험이 진행되고 있으며 체외에서 양막에 흉선림프구 (T cell)를 배양하여 림프구의 증식과 사이토카인의 분비가 감소되는 결과를 보여 양막의 여러 성분의 항염증 효과를 입증하는 연구 결과도 발표되고 있다(15-30).

본 연구 결과 양막은 골형성유도에도 SIS와 같은 가능성이 있음을 확인할 수 있었으며, 앞으로 양막스폰지 제조 후 남아 있는 성장인자들을 분석함으로써 골형성유도 재료로서의 이용 가능성을 검토하는 연구가 진행되어야 하겠다.

요 약

양막은 다양한 생체재료로 이용되어 왔으며 생체적합성과 환부의 치료효능이 우수한 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 양막을 같이 양막스폰지를 제조하고 중간엽줄기세포를 배양한 뒤 누드마우스이식을 통하여 콜라젠스폰지와 비교하여 골형성유도능에 대한 연구를 실시하였다. 연구결과 세포의 부착과 증식면에서는 두 시료가 유사하였으나, 체내에 이식한 결과 양막스폰지군에서 좀 더 많은 콜라젠 분비와 칼슘이 침착되었음을 확인하였다. 그리고 면역화학염색 결과 골형성시 필요한 오스테오칼신과 오스테오넥틴이 좀 더 발현된 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 양막은 골형성유도를 향상시킬 수 있는 가능성이 있음을 알 수 있었다.

감 사

본 연구는 보건복지부의 특정센터 연구지원 사업 (0405-BO01-0204-0006)으로 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Jasinkowski, N. L., and J. L. Cullum (1984), Human amniotic membrane as a wound dressing, *AORN J.* **39**, 894-895.
- Tyszkiewicz, J. T., I. A. Uhrynowska-Tyszkiewicz, A. Kaminski, and A. Dziedzic-Goclawska (1999), Amnion allografts prepared in the central tissue bank in warsaw, *Ann. of Transplant.* **4**, 85-90.
- Nakahara, T., T. Nakamura, E. Kobayashi, M. Inoue, K. Shigeno, Y. Tabata, K. Eto, and Y. Shimizu (2003), Novel approach to regeneration of periodontal tissues based on *in situ* tissue engineering: effect of controlled release of basic fibroblast growth factor from a sandwich membrane, *Tissue Eng.* **9**, 153-162.
- Oest, M. E., K. M. Dupont, H. J. Kong, D. J. Mooney, and R. E. Guldberg (2007), Quantitative assessment of scaffold and growth factor-mediated repair of critically sized bone defects, *J. Orthop. Res.* **25**, 941-950.
- Lee, Y. M., S. H. Nam, Y. J. Seol, T. I. Kim, S. J. Lee, Y. Ku, I. C. Rhyu, C. P. Chung, S. B. Han, and S. M. Choi (2003), Enhance bone augmentation by controlled release of recombinant human bone morphogenetic protein-2 from biodegradable membrane, *J. Periodontol.* **74**, 865-872.
- Ruhe, P. Q., H. C. Kroese-Deutman, J. G. C. Wolke, P. H. M. Spauwen, and J. A. Jansen (2004), Bone inductive properties of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement implants in cranial defects in rabbits, *Biomaterials* **25**, 2123-2132.
- Badylak, S. F., R. Tullius, K. Kokini, K. D. Shelbourne, T. Klootwyk, S. L. Voytik, M. R. Kraine, and C. Simmons (1995), The use of xenogenic small intestinal submucosa as a biomaterial for Achilles tendon repair in a dog model, *J. Biomed. Mater. Res.* **29**, 977-985.
- Dejardin, L. M., S. P. Arnoczky, B. J. Ewers, R. C. Haut, and R. B. Clarke (2001), Tissue-engineered rotator cuff tendon using porcine small intestine submucosa. Histologic and mechanical evaluation in dogs, *Am. J. Sports Med.* **29**, 175-184.
- Derwin, K., C. Androjna, E. Spencer, O. Safran, T. W. Bauer, T. Hunt, A. Caplan, and J. Iannotti (2004), Porcine small intestine submucosa as a flexor tendon graft, *Clin. Orthop.* **423**, 245-252.
- Ledet, E. H., A. L. Carl, D. J. DiRisio, M. P. Tymeson, L. B. Andersen, C. E. Sheehan, B. Kallakury, M. Slivka, and H. Serhan (2002), A pilot study to evaluate the effectiveness of small intestinal submucosa used to repair spinal ligaments in the goat, *Spine J.* **2**, 188-196.
- Musahl, V., S. D. Abramowitch, T. W. Gilbert, E. Tsuda, J. H. Wang, S. F. Badylak, and S. L. Woo (2004), The use of porcine small intestinal submucosa to enhance the healing of the medial collateral ligament-a functional tissue engineering study in rabbits, *J. Orthop. Res.* **22**, 214-220.
- Sucknow, M. A., S. L. Voytik-Harbin, L. A. Terril, and S. F. Badylak (1999), Enhanced bone regeneration using porcine small intestinal submucosa, *J. Invest. Surg.* **12**, 277-287.
- Moore, D. C., H. A. Pedrozo, J. J. Crisco III, M. G. Ehrlich (2004), Preformed grafts of porcine small intestine submucosa (SIS) for bridging segmental bone defects, *J. Biomed Mater Res A.* **69**, 259-266.
- Lee, S. J., L. W. Lee, Y. M. Lee, H. B. Lee, and G. Khang (2004), Macroporous biodegradable natural/synthetic hybrid scaffolds as small intestine submucosa impregnated poly(D,L-lactide-co-glycolide) for tissue-engineered bone, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **15**, 1003-1017.
- Quinby, W. C., H. C. Hoover, M. Scheflan, P. T. Walters, S. A. Slavov, and C. C. Bondoc (1982), Clinical trials of amniotic membranes in burn wound care, *Plast. Reconstr. Surg.* **70**, 711-717.
- Subrahmanyam, M. (1995), Amniotic membrane as a cover for microskin grafts, *Br. J. Plast. Surg.* **48**, 477-478.
- Honavar, S. G., A. K. Bansal, V. S. Sangwan, and G. N. Rao (2000), Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in Stevens-Johnson Syndrome, *Ophthalmology* **107**, 975-979.
- Kim, J. S., J. C. Kim, B. K. Na, J. M. Jeong, and C. Y. Song (2000), Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn, *Exp. Eye Res.* **70**, 329-337.

19. Ward, D. J., J. P. Bennett, H. Burgos, and J. Fabre (1989), The healing of chronic venous leg ulcers with prepared human amnion, *Br. J. Plast. Surg.* **42**, 463-467.
20. Koizumi, N., T. Inatomi, A. J. Quantock, N. J. Fullwood, A. Dota, and S. Kinoshita (2000), Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits, *Cornea* **19**, 65-71.
21. Koizumi, N., N. J. Fullwood, G. Bairaktaris, T. Inatomi, S. Kinoshita, and A. J. Quantock (2000), Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane, *IOVS*. **41**, 2506-2513.
22. Koizumi, N., T. Inatomi, T. Suzuki, C. Sotozono, and S. Kinoshita (2001), Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders, *Ophthalmology* **108**, 1569-1574.
23. Koizumi, N., L. J. Cooper, N. J. Fullwood, T. Nakamura, K. Inoki, M. Tsuzuki, and S. Kinoshita (2002), An evaluation of cultivated corneal limbal epithelial cells, using cell-suspension culture, *IOVS*. **43**, 2114-2121.
24. Tsai, R. J., L. M. Li, and J. K. Chen (2000), Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells, *N. Engl. J. Med.* **343**, 86-93.
25. Mohammad, J., J. Shenaq, and S. Shenaq (2000), Modulation of peripheral nerve regeneration : A tissue-engineering approach. The role of amnion tube nerve conduit across a 1-centimeter nerve gap, *Plast. Reconstr. Surg.* **105**, 660-666.
26. Nakamura, T., K. Endo, L. J. Cooper, N. J. Fullwood, N. Tanifuji, M. Tsuzuki, N. Koizumi, T. Inatomi, Y. Sano, and S. Kinoshita (2003), The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane, *IOVS*. **44**, 106-116.
27. Ti S. E., D. Anderson, A. Touhami, C. Kim, and S. C. Tseng (2002), Factors affecting outcome following transplantation of ex vivo expanded limbal epithelium on amniotic membrane for total limbal deficiency in rabbits, *IOVS*. **43**, 2584-2592.
28. Lindberg, K., M. E. Brown, H. V. Chaves, K. R. Kenyon, and J. G. Rheinwald (1993), In vitro propagation of human ocular surface epithelial cells for transplantation, *IOVS*. **34**, 2672-2679.
29. Ueta, M., M. N. Kweon, Y. Sano, C. Sotozono, J. Yamada, N. Koizumi, H. Kiyono, and S. Kinoshita (2002), Immunosuppressive properties of human amniotic membrane for mixed lymphocyte reaction, *Clin. Exp. Immunol.* **129**, 464-470.
30. Seo, Y. K., J. I. Ahn, D. H. Lee, S. Y. Kwon, D. H. Jung, Y. S. Park, K. Y. Song, E. K. Yang, Y. J. Kim, and J. K. Park (2004), The wound healing effects of human deepithelialized amniotic membrane with keratinocyte, *Tissue Eng. and Regen. Med.* **1**, 178-183.