

BMP-2를 함유한 2상 알지네이트 담체를 이용한 골수줄기세포의 골분화

임현주¹ · 김학태² · 오은정¹ · 김태정² · 김한도¹ · 최진현¹ · 정호윤²
경북대학교 기능물질공학과¹, 경북대학교 의학전문대학원 성형외과교실²

Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Stem Cell using Bi-phase Alginate Scaffold Including BMP-2

Hyun Ju Lim¹, Hak Tae Kim, M.D.², Eun Jung Oh¹,
Tae Jung Kim, M.D.², Han Do Ghim¹, Jin Hyun Choi¹,
Ho Yun Chung, M.D.²

¹Department of Advanced Organic Materials Science and Engineering, Kyungpook National University, Daegu;

²Department of Plastic & Reconstructive Surgery, School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu, Korea

Purpose: The object of this study is to develop a novel BMP-2 delivery system for continuous osteogenic differentiation and to induce osteogenesis of stem cells using a bi-phase alginate carrier *in vitro*.

Methods: Alginate nanoparticle loaded BMP-2 was prepared by the reverse emulsification-diffusion technique. Physical properties and release profiles of alginate carriers were measured by Instron and ELISA kit, respectively. Cell viability and alkaline phosphate activity of hBMSCs differentiation was also evaluated by MTS and Metra[®] BAP assays, respectively.

Results: Optimal concentration for bi-phase alginate carrier was determined as 2 wt% by evaluating mechanical and biological properties, and differentiation of BMSCs for bone regeneration. The 2% bi-phase alginate carrier had the lowest initial and final release ratio. In addition, the 2% bi-phase alginate carrier had a little higher ALP activity than the homogeneous carrier. An improved controlled release profile was obtained by combining alginate hydrogel with lyophilized particles.

Conclusion: Bi-phase alginate carrier has many advantages such as biocompatibility and controlled release capability. It is expected to be effective as a scaffold and

carrier in bone tissue engineering.

Key Words: Bi-phase, Alginate, Controlled release, BMP-2, Osteogenesis

I. 서론

조직재생의 3대 요소인 세포, 담체 (scaffold) 및 생리활성 물질 중에서 담체와 생리활성물질을 결합하여 세포의 성장 및 분화에 기여하기 위한 필수적인 부분으로 생체재료와 약물전달기술을 들 수 있는데, 재생하고자 하는 조직에 생리활성물질 또는 신호전달물질을 일정기간 전달하여 줄기세포의 성장 및 분화촉진을 지속적으로 유발시킬 수 있다.¹ 이러한 약물전달시스템에서 작은 유기분자 혹은 거대분자의 방출성을 통제하기 위한 방안으로 다양한 고분자의 적용이 검토되었다.² 효과적인 단백질약물전달을 위해서 가장 먼저 요구되는 사항은 약물의 효력과 제제의 안전성이다. 하지만 단백질약물의 낮은 생체이용률과 짧은 반감기 특성 때문에 유효한 약물효과를 달성하기 위해서는 아직까지 주기적인 약물주입이 필수적이다.

한편 다른 약물에 비해 상대적으로 크기가 큰 단백질약물을 장에서 효과적으로 흡수시키기 위해 나노크기의 약물 전달시스템이 제안되었다. 장을 제외한 다른 곳에서는 단백질과 같은 약물들이 대부분의 중합체 물질을 통해 서서히 용해되기 위해선 약물의 크기가 크며, 폴리아크릴아마이드와 같은 높은 다공도를 가지는 겔을 통하여 쉽게 용해시킬 수 있다. 이와 같은 방식의 가장 대표적인 예로 하이드로겔 약물전달시스템을 들 수 있다.³ 하이드로겔은 용해되지 않고 3차원 구조 내에 다량의 물을 함유하는 능력을 가지는 교차 결합된 고분자 매트릭스로 정의된다. 하이드로겔은 높은 생체적합성을 가지는데 이는 겔이 가진 높은 수분함량으로 인해 인근 조직과 유사하게 행동하는 특성 때문이다.⁴ 하이드로겔을 이용한 단백질약물의 전달시스템은 단백질약물을 고분자 용액에 분산시킨 후, 하이드로겔을 형성시킨 다음, 시간 경과에 따라 고분자가 분해하여 체내에서 약물이 서서히 방출되는 것을 목적으로 한다. 이와 같은 나노기술이 접목된 융합기술은 질병 발생 및 치료에

Received March 8, 2010

Revised March 23, 2010

Accepted April 7, 2010

Address Correspondence: Ho Yun Chung, M.D., Department of Plastic & Reconstructive Surgery, School of Medicine, Kyungpook National University, 200 Dongduk-ro, Jung-gu, Daegu 700-721, Korea. Tel: (053) 420-5685 / Fax: (053) 425-3879 / E-mail: hy-chung@knu.ac.kr

* 본 연구는 보건복지가족부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임 (A091224).

대한 원인규명을 위해 활용될 뿐만 아니라 이를 응용한 생체조직공학, 재생의학제품, 생체신호 진단기기 등에 적용될 수 있다.¹

고분자 소재를 담체로 사용하기 위해서는 세포의 부착과 증식 및 분화를 효과적으로 유도하는 기능을 하고, 인체 내에서 높은 생체친화성을 가지며, 시간이 흐른 후 생체 내에서 안전하게 분해 및 흡수되어야 하는데, 이와 같은 조건을 갖춘 고분자 재료로는 폴리글리콜라이드, 폴리락타이드 및 이들의 공중합체를 포함하는 합성고분자와 키토산, 알지네이트, 히아루론산 등의 천연고분자를 들 수 있다. 합성고분자는 우수한 기계적 특성을 가지고 있지만, 생체 내에서의 가수분해 과정 중에 생성되는 산 분해물이 조직 주변의 pH를 감소시켜 염증을 유발할 수 있다. 알지네이트는 -L- 글루론산과 -D- 만누우론산의 1,4- 글루코시드 결합으로 구성되어 있다. 소디움염의 형태인 수용성 알지네이트는 다량의 COO⁻ 기를 함유하고 있어서 Ca²⁺, Mg²⁺와 같은 2가 양이온과의 착체 형성을 통해 겔을 구형하는 특성을 가지고 있다. 또한 독성이 없으며 생체적합성을 가지고 있어서 미립구, 비드, 마이크로캡슐, 정제, 매트릭스 담체 등으로 빈번하게 사용되고 있다.^{1,2,5}

많은 연구자들에 의해 골형성 및 재생 기간 동안 생체활성물질들 (TGF- β , BMP, IGF-1, bFGF)의 조절이 골형성에 효과적이라는 것은 이미 밝혀진 바 있다. 이 중에서 골형성 단백질 (BMP)군은 중배엽 세포들로부터 연골과 골형성을 유도할 수 있는 능력을 갖고 있으며, 특히 BMP-2는 신생골 형성 능력이 뛰어나고, 골절 치유과정에서 골세포의 증식과 분화에 깊이 관여한다고 알려져 있다.⁶

저자들은 생체적합성이 뛰어난 알지네이트를 나노 입자와 하이드로겔의 두 가지 형태로 적용함으로써 하이드로겔 안에 생체활성물질인 BMP-2를 함유한 나노입자를 포함하는 2상 담체 (bi-phase scaffold)를 제조하였으며, 제조된 담체의 세포독성 및 물리적 특성을 평가하였다. 또한 2상 담체에서 방출되는 BMP-2의 누적방출량을 측정함으로써 시간에 따른 단백질의 방출거동을 확인하였으며, BMP-2의 서방형 방출 (contolled release)이 골수줄기세포 분화에 미치는 영향을 살펴보았다.

II. 재료 및 방법

가. 2상 알지네이트 담체 제작

실험에 사용된 BMP-2 (Peprotech, USA)가 함유된 나노 하이드로겔은 역유화분산법 (reverse emulsification diffusion technique)⁷을 이용해서 제조하였다. 요약하면, 200 ng/mL의 BMP-2가 포함된 0.5 wt% 알지네이트 수용액 200 mL에 20 mL chloroform (Duksan, Korea)을 넣고 균질화기

를 이용하여 미셀을 만든 다음 200 mL의 chloroform을 추가로 가하여 미셀 (micelle) 내부로부터 물이 확산되어 고분자가 과포화 상태에 도달함으로써 고화되어 안정화되도록 한 후 미셀 외부의 chloroform 분산상을 제거한다. 350 mL의 10 wt% CaCl₂ (Duksan, Korea) 수용액을 첨가하여 알지네이트 표면에서의 칼슘염과의 착체 (complex) 형성을 유도함으로써 충분히 가교 (crosslinking)시키고 3번의 세척 후 동결건조를 통하여 나노 크기의 하이드로겔 입자로 제조하였으며, 나노 입자의 형성을 주사전자현미경을 이용하여 확인하였다. 상기의 입자상 나노하이드로겔은 다양한 농도의 알지네이트 하이드로겔과 결합하여 2상의 알지네이트 담체로 제조되었다.

나. 물리적 특성 평가

각각 0.5 wt%, 1.0 wt% 및 2.0 wt%의 알지네이트 수용액에 BMP-2를 함유한 알지네이트 나노 입자를 첨가하여 제조한 하이드로겔 군과 첨가하지 않은 하이드로겔 군을 준비하였다. 제조된 하이드로겔은 1 × 10 cm의 직사각형 모양으로 시료를 준비하였으며 (n=3), 25 kN 로드셀 (load cell)을 이용하여 Instron (Shimatzu, Japan) 측정을 시행하였으며, 이를 통해 인장강도, 신장률 및 연신탄성률을 측정하였다. Instron 측정은 인장속도를 10 mm/min으로 하여 시행하였다.

다. BMP-2의 방출거동 (release behavior)

제조된 2상 알지네이트 하이드로겔 담체에 함유되어 있는 BMP-2의 방출거동을 enzyme-linked immunosorbent (ELISA) 분석키트 (Peprotech, USA)를 이용하여 측정하였으며, BMP-2가 함유되지 않은 실험군에 대해서는 나노입자와 같은 양의 BMP-2를 하이드로겔 안에 포함시켜 실험군을 제조하여 방출거동을 측정하였다. 자세하게는, 모든 실험군에 대해 5 mg의 시료를 채취하여 50 mL의 증류수에 넣고 50 rpm으로 회전시키면서 미리 정해진 측정 시간마다 각각 200 μ L를 추출하였다. 추출된 시료를 분석키트에 넣어 흡광도를 측정하고 이를 BMP-2 농도에 따른 흡광도 그래프에 삽입하여 생체활성물질 농도를 측정한 후, 초기농도와의 비율을 계산하여 방출거동을 확인하였다. 각 군마다 n=5의 개체수를 사용하였으며, 산출값은 평균을 내고 오차범위를 확인하였다.

라. 세포 증식을 평가

5-(3-carboxymeth-oxyphenyl)-2n-tetrazolium inner salt 용액 (MTS, Promega, USA)을 이용하여 2상 알지네이트 하이드로겔 담체 실험군에 대해 세포친화성을 확인하였다. 96 웰 (96-well)에 1 × 10³개의 골수줄기세포를 심은 후 제조된

담체를 담지하였다. 일정 시간에 따라 MIS 용액을 넣고 흡광도를 측정하여 담체를 넣지 않은 군과 비교하였다. 이 때 사용된 골수줄기세포는 인간골수에서 얻었으며, 히스토박(Sigma, USA) 중층원심분류법에 의해 분리하였고, 3번 계대배양하여 사용하였다.

마. Alkaline phosphate (ALP) 활성도 측정

방출되는 BMP-2가 줄기세포의 분화에 미치는 영향을 알아보기 위해 2상 알지네이트 하이드로겔 담체를 이용, 방출된 BMP-2에 의해 분화된 세포에서 단백질을 추출하여 ALP 활성도를 측정하였다. 6웰 (6-well)에 5×10^4 개의 골수줄기세포를 심고 24시간 지난 후 제조한 2상 알지네이트 하이드로겔 담체를 담지하였다. 이 때 각군마다 n=5개의 개체수를 사용하였다. 시료는 두 군으로 분류하였는데, 한 군에는 10 wt% Fetal Bovin Serum (FBS)와 1% strepto/mycin을 포함한 DMEM (일반미디어)을, 다른 군에는 10% FBS, 1 wt% strepto/mycin, $10^{-2}M$ β -glycerophosphate, 50 μ g/ml L-ascorbic acid, $10^{-8}M$ dexamethasone을 포함한 Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, Hyclon, USA)을 넣고 3일마다 미디어를 교환하였다. 그리고 14일이 지난 후, 미디어와 각각의 실험군을 제거하고 분화된 골수줄기세포를 모아서 PRO-PREP (Invitrogen, USA)을 이용하여 단백질을 추출 및 정량하였다. 정량된 단백질은 Metra[®]BAP (Bone specific alkaline phosphate, Quidel, USA) 분석키트를 이용하여 활성도를 측정하였다. 측정방법은 제조사의 분석순서를 이용하였다.

III. 결 과

가. 담체의 표면특성 관찰 및 실험군 제조

BMP-2를 함유한 알지네이트 나노입자를 동결건조하여 얻은 시료의 표면을 주사전자현미경으로 관찰하였다 (Fig. 1). 제조된 나노입자들의 크기를 입도분석기 (ELS8000, Photal)로 측정한 결과 20 nm부터 20 μ m까지의 넓은 입자 크기 분포를 보였으며, 평균 입자직경은 523 nm를 나타내었다. 주사전자현미경 (Scanning Electron Microscopy) 측

정결과로 보인 입자의 크기에 비해 광산란으로 얻은 입자의 크기가 매우 크게 나타나는 것으로부터, 동결건조를 하는 과정에서 입자 사이의 극심한 회합이 발생함을 확인할 수 있다. 다양한 농도의 알지네이트 용액을 이용하여 나노입자와 융합시킨 지지체 제조에 있어서 0.5 wt%의 알지네이트 수용액은 겔화가 잘 일어나지 않아서 실험에 사용할 수 없었으며, 1.0 wt%와 2.0 wt%의 농도에서는 상대적으로 겔화가 빠르게 일어남을 알 수 있었다. 실험군은 1.0 wt% 알지네이트 용액으로 겔화한 군을 1% homo., 1.0 wt% 용액과 BMP-2를 함유한 알지네이트 나노입자를 융합한 군을 1% bi-phase, 2.0 wt% 용액으로 겔화한 군을 2% homo., 2.0 wt% 용액과 BMP-2를 함유한 알지네이트 나노입자를 융합한 군을 2% bi-phase로 구분하였다.

나. 물리적 특성 평가

Table 1에서 보여지는 것처럼, 매트릭스로 사용된 하이드로겔의 인장강도와 연신탄성률은 알지네이트 농도가 높은 군에서, BMP-2가 함유된 동결건조된 나노입자가 포함되는 군에서 감소함을 알 수 있으며, 같은 농도의 하이드로겔에서는 나노입자가 포함되어 있는 실험군에서 신장률이 감소함을 알 수 있었다.

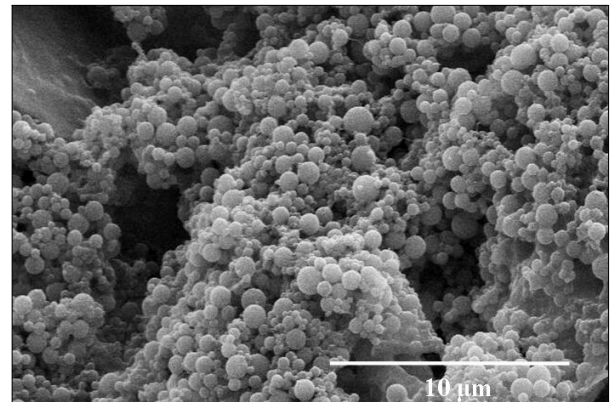


Fig. 1. Scanning electron microscopy of alginate nanoparticle loaded BMP-2.

Table I. Physical Properties of Bi-phase Alginate Carriers

Conc. of specimens	Strain (%)	Stress (N/mm)	Young's modulus (N/mm)
1% homo	7.470	7.837	6.557
1% bi-phase	2.240	8.796	19.163
2% homo	8.410	8.807	23.498
2% bi-phase	4.990	8.904	28.6420

다. BMP-2의 방출거동

1.0 wt% 하이드로겔을 이용한 실험군의 초기방출량은 고농도의 실험군에 비해 낮았으나 12시간이 지나면서 방출속도가 급격히 빨라짐을 알 수 있었으며, 2.0 wt% 하이드로겔을 이용한 실험군들의 경우에는 초기방출량은 높았으나 8시간이 지난 후에는 방출속도가 저하되면서 서방성을 보임을 Fig. 2에서 알 수 있었다.

라. 세포증식을 평가

기계적 특성과 방출거동이 가장 우수하였던 2.0 wt% 하

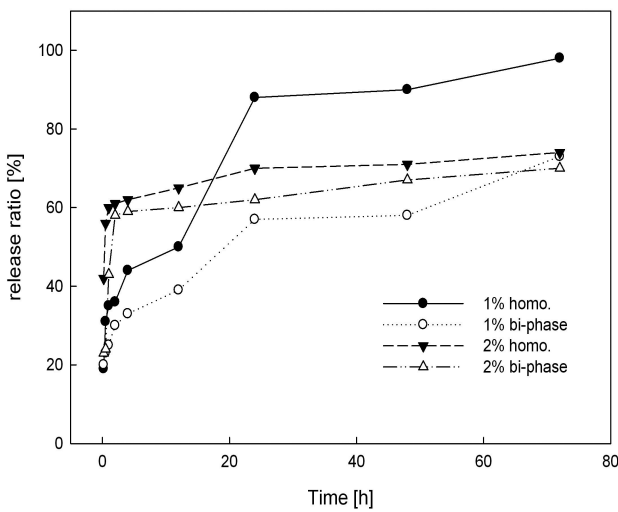


Fig. 2. Release profiles of bi-phase alginate carriers: 1% homogeneous carrier had low initial release ratio, but it had the fastest final release ratio over time and 2% bi-phase alginate carrier had the lowest initial and final release ratio.

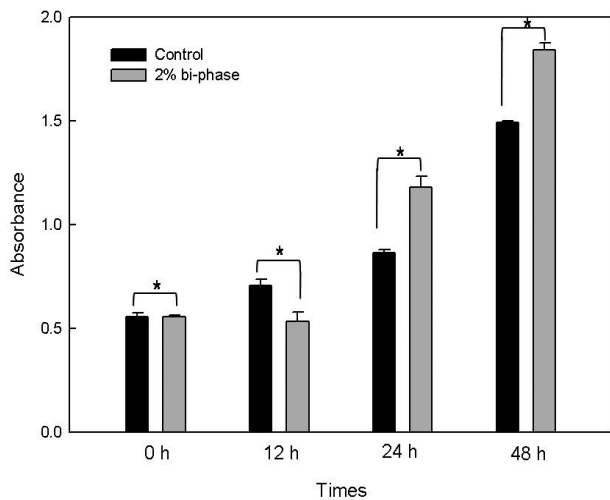


Fig. 3. Cell viability of bi-phase alginate carrier using 2 wt% hydrogel: Initial cell viability was lower than control group, otherwise, it is higher and dependent on time (* $p < 0.05$).

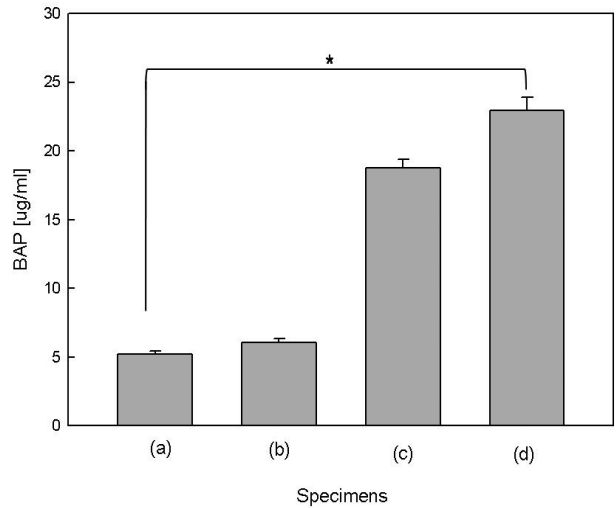


Fig. 4. ALP activity of bi-alginate carrier using 2 wt% hydrogel on BMSCs differentiation: (a) on culture medium, (b) on culture medium included bi-phase alginate carrier loaded BMP-2, (c) on osteogenic medium, (d) on osteogenic medium included bi-phase alginate carrier loaded BMP-2 (* $p < 0.05$).

이드로겔을 이용한 실험군에 대해 시간에 따른 세포의 증식률을 확인하면 12시간에서는 비교군에 비해 미약한 증식의 감소를 보였으나, 시간이 흐를수록 비교군보다 조금 더 높은 증식률을 보임을 알 수 있었다 (Fig. 3).

마. ALP 활성도

최적조건의 담체에 의해 골수줄기세포가 골세포로 분화하였는지 확인하기 위해 조골세포에 특이적으로 발현하는 ALP 활성도를 측정하였으며, 비교군으로 2상 알지네이트 하이드로겔 담체를 포함하지 않는 시료에 대하여 각각 일반 미디어 (Fig. 4 (a))와 분화미디어 (Fig. 4 (b))에서 배양한 후 단백질을 추출하여 활성도를 측정하였다. 담체를 포함하지 않고 일반미디어에서 배양한 실험군에 비해 담체에서 서방형으로 방출된 BMP-2에 의해 분화가 된 실험군 (Fig. 4 (c), (d))에서 미약하게 활성도가 더 높았고, 같은 분화미디어에서의 배양에 대한 활성도에서도 담체가 들어간 군 (일반미디어; Fig. 4 (b), 분화미디어; Fig. 4 (d))이 조금 높았으며, 각각의 결과는 통계적으로 유의한 증가를 나타내었다 (* $p < 0.05$).

IV. 고 찰

줄기세포를 원하는 조직으로 분화시키고 인체에 적용하기 위해서는 세포지지체가 있어야 하고 분화에 필요한 생체활성물질을 전달하기 위해서는 운반체 및 전달시스

템이 필요하다. 이러한 세포지지체나 생체활성물질 운반체는 세포 친화성이 있어야 하고, 세포독성이나 면역반응을 일으키지 않아야 하며, 특히 운반체의 경우 효과적으로 생체활성물질을 세포 내로 전달하여 효율적으로 특정 유전자의 발현 조절이 가능하도록 해야 한다. 또한 약물 전달시스템은 치료 부위에 치료용 약물을 효율적으로 전달함으로써 약물의 부작용을 줄이고, 약물에 대한 환자의 순응도를 높이며, 효능 및 효과를 극대화 할 수 있도록 기존의 약물이나 새로운 약물의 제형을 설계하여 약물치료를 최적화하기 위한 기술로써 약물을 대체할 수 있는 생체활성물질을 전달할 수도 있다. 세포지지체와 운반체를 구성하는 물질로는 피브린, 콜라겐, 글리코사미노글라이칸, 알지네이트 등 천연 물질들이 많이 이용되고 있으며, 그 중 알지네이트는 세포의 성장 및 수송 등에 널리 사용되고 있다.⁵

BMP-2를 함유한 알지네이트 나노입자를 동결건조하여 준비한 다음, 알지네이트 용액과 융합 및 가교시켜 새로운 2상 알지네이트 하이드로겔 담체로 제조하였다. 지지체가 주변의 환경을 극복하고 효과적인 조직재생을 유도하기 위해서는 지지체의 물리적 물성도 중요하다. 일반적으로 인장강도는 시료의 단위면적 당 지지하는 힘 (MPa)을 의미하고, 신장률은 시료의 초기 길이에 대한 신장 길이의 비율을 말한다. 또한 연신탄성률은 재료의 탄성을 나타내주는 지표로서 측정된 재료의 고유한 특성을 나타내는데, 신장률의 변화량에 대한 인장강도의 변화량의 비로써 표시된다.⁸ 2상 알지네이트 하이드로겔 담체는 나노입자가 포함됨에 따라 인장강도, 신장률, 연신탄성률이 모두 감소하였으나, 알지네이트 수용액의 농도가 높을수록 이들 값이 모두 높아지는 경향을 보여 상호 보완이 가능할 것이라고 판단된다.

각각의 실험군에서 동일한 BMP-2 함량을 갖도록 조절된 시료에 대한 방출거동을 확인한 결과, 초기방출량 및 속도가 높은 2.0 wt% 알지네이트 용액과 나노입자를 융합한 군의 경우 8시간이 지난 후에는 방출속도가 감소하는 것으로 보아 입자 표면과 하이드로겔 외부의 미교착 생체활성물질들이 한꺼번에 방출되는 것으로 판단되며, 일정 시간이 흐른 후에는 서방형으로 바뀌는 것을 고려할 때, 서방형 운반체로서의 가능성이 높다고 판단된다.

기계적 특성과 방출거동 평가결과 골재생 지지체로 사용함에 있어 가장 적합한 조건으로 판단되는 2.0 wt% 알지네이트 용액을 이용한 2상 알지네이트 하이드로겔 담체를 이용하여 세포증식력을 측정하였다. 초기에는 미약하게 세포증식이 감소하였으나, 시간이 흐를수록 비교군에 비해 높은 증식률을 보임을 알 수 있다. 일반적으로 골재생 지지체로 사용하는 기간은 최소 6개월 이상이므로 오히려 세

포친화력이 높다고 판단된다.

ALP는 일반적으로 세포의 골분화도를 알아보는 대표적인 분석방법이다. 골의 생성 과정 중 발현되는 ALP, 오스테오폰틴, 우스테오넥틴 등의 골형성 표지자는 골기질의 성숙도를 나타내는 지표로서 사용되는데, ALP는 세포막에 붙어 있는 효소로서 골형성의 초기에 풍부하게 나타난다. 따라서 골형성 단계를 확인할 수 있는 초기 증거로서 ALP 활성도를 사용하였다.⁷ 2상 알지네이트 하이드로겔 담체가 없는 실험군에 비해 담체를 포함한 실험군에서 ALP 활성도가 조금씩 높게 나타났으며, 분화 미디어가 아닌 일반미디어 조건에서도 방출된 BMP-2만으로 약하게 분화가 일어난 것으로부터 유추해볼 때, 제조된 2상 알지네이트 하이드로겔 담체에서 방출되는 BMP-2가 골수줄기세포의 분화에 영향을 미치는 것으로 판단할 수 있다.

V. 결 론

특정조직을 재생하기 위해서는 세포, 지지체 및 생체활성물질의 세 가지 요소에 대한 조화가 필수적이다. 만약 외부의 주기적인 공급 없이 최초의 투입량으로 생체활성물질을 꾸준히 방출하는 것이 가능한 시스템이라면 장기적으로 인체와 가깝도록 조직의 재생이 가능할 것이다. 제조된 2상 알지네이트 하이드로겔 담체는 생체활성물질의 운반체로서 뿐만 아니라 향후 나노입자에는 생체활성물질을, 하이드로겔에는 세포를 고정시켜 사용함으로써 골재생 지지체로서의 가능성도 기대된다.

REFERENCES

1. Lee HB, Jeong JK, Sohn SI, Byun YR, Ki MH, Seo JK: Drug delivery and regenerative medicine technology. *Tissue Eng and Regen Med* 6: 663, 2009
2. Lee M, Chen TT, Iruela-Arispe mL, Wu BM, Dunn JC: Modulation of protein delivery from modular polymer scaffolds. *Biomaterials* 28: 1862, 2007
3. Lee JY, Kim KS, Lee JH, Hwang SJ, Lee B, Khang GS, Lee HB, Kim MS: A recent tendency of protein drug delivery system for bioefficacy improvement. *Tissue Eng and Regen Med* 5: 587, 2008
4. Wang F, Li Z, Khan M, Tamama K, Kuppusamy P, Wagner WR, Sen CK, Guan J: Injectable, rapid gelling and highly flexible hydrogel composites as growth factor and cell carriers. *Acta Biomater* 23, 2009
5. Choi MS, Jun YJ, Cho HM, Oh DY, Ahn ST, Han DK, Lee JW: Chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in alginate sponge scaffolds. *Tissue Eng and Regen Med* 5: 842, 2008
6. Bae MS, Kim DW, Kim SE, Choi KK, Kwon IK: BMP-2 immobilized gelatin- β -chitosan scaffold for bone regenera-

- tion. *Tissue Eng and Regen Med* 6: 609, 2009
7. Lee SM, Yoo ES, Ghim HD: Alginate nanodryogels prepared by emulsification-diffusion method. *Macromol Res* 17: 168, 2009.
 8. Kim SH, Kim SH, Kim BS, Kim SH: Effect of unitended pores on vascular scaffold fabrication. *Tissue Eng and Regen Med* 5: 594, 2008