

조직재생을 위한 효과적인 성장인자의 활용 Application of Growth Factors in Tissue Regeneration

윤예랑^{1,2} · 김해원^{1,2,3} · 장준혁^{4*}
Ye-Rang Yun^{1,2}, Hae-Won Kim^{1,2,3}, and Jun-Hyeog Jang^{4*}

¹단국대학교 조직공학연구소, ²단국대학교 WCU나노바이오의과학과, ³단국대학교 치과대학, ⁴인하대학교 의과대학 생화학교실

¹Institute of Tissue Regeneration Engineering (ITREN), Dankook University, 330-714, Korea

²Department of Nanobiomedical Science and WCU Research Center, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

³School of Dentistry, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

⁴Department of Biochemistry, Inha University School of Medicine, Incheon 400-712, Korea

(Received July 19, 2013 / Revised July 29, 2013 / Accepted August 8, 2013)

Growth factors (GFs) are soluble-secreted signaling proteins capable of instructing specific cellular responses including cellular growth, proliferation, migration and differentiation. GFs are expected to be effective in tissue regeneration. However, due to the short biological half-life, lack of long-term stability and possible toxicity, GFs show the limitation on practical application. Currently, sophisticated biomaterials systems that control the biological release of growth factors represent a new strategy for tissue regeneration. Here, we introduce the functions of GFs and the combinational applications of GFs and biomaterials.

Key words: Growth factors, Biomaterials, Tissue regeneration

서 론

성장 인자는 세포의 성장, 증식 및 분화에 관여하는 단백질로써¹⁾, 현재까지 다양한 성장 인자들이 발견되었다. 이들 성장 인자들은 종류에 따라, 특정 수용체와 결합해서 각각의 기능을 나타내고, 세포의 신호 전달 물질로 작용한다. 성장 인자들이 발견되고, 보고된 초반에는, 분리 및 정제에 어려움이 있었다. 그러나, 1973년 유전자 재조합 기술의 발달로 성장 인자들의 대량 분리와 정제가 가능해진 이후, 다양한 연구에서 이용되고 있다¹⁻³⁾. 특히, 조직과 장기들에 수많은 성장 인자들의 작용이 필요하므로, 이들 성장 인자를 이용한 조직 재생 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 그러나, 이들 성장 인자들은 짧은 생물학적인 반감기와 지속적인 안정성의 부족, 선택적인 조직 적합성 등의 약점들로 인해서, 조직 재생 연구에 더욱 효과적이기 위한 전달체로서 적절한 생체 재료(biomaterial)가 필요하다⁴⁾. 즉, 성장 인자를 조직 공학에서 전달체로서 생체 재료와 함께 사용함으로써 세포의 성장과 분화를 촉진시켜, 효과적인 조직 재생을 이룰 수 있다. 그와 더불어, 생체 조직 재생을 위한 적절한 생체 재료와 더불어 세포의 성장 및 분화에 필요한 중요한 인자로서 성장 인자의 적절한 약물 전달 시스템의 도입도 매우 중요하다 할 수 있다.

본 총설에서는 성장 인자들의 종류 및 기능에 대해서 알아

보고, 조직 재생 연구를 위한 전달체로 생체 재료의 이용 방법에 대해서 논하고자 한다. 더불어, 성장 인자들의 조직 재생 연구에 적용 사례를 다루어보고자 한다.

성장 인자의 종류 및 기능

성장 인자로 뼈 형성 단백질(bone morphogenetic protein, BMP), 섬유아세포 성장 인자(fibroblast growth factor, FGF), 혈관 내피 성장 인자(vascular endothelial growth factor, VEGF), 신경 성장 인자(nerve growth factor, NGF), 표피 성장 인자(epidermal growth factor, EGF), 인슐린 성장 인자 insulin-like growth factor, IGF), 형질 전환 성장 인자(transforming growth factor, TGF), 뇌 유래 신경 영양 인자(brain-derived neurotrophic factor, BDNF), 혈소판 유래 성장 인자(platelet-derived growth factor, PDGF), 태반 성장 인자(placental growth factor, PlGF), 간세포 성장 인자(hepatocyte growth factor, HGF) 등의 다양한 종류가 알려져 있다. 그 중에서 대표적인 성장 인자들의 기능에 대해 알아보하고자 한다.

먼저, BMP는 TGF-β에 속하고⁵⁾, BMP receptor (BMPR, BMPR Ia, BMPR Ib, BMPR II)와 결합하여, 뼈 형성을 유도하는 성장 인자이다. 소의 뼈 조직에서 처음으로 정제되었다. BMP는 이후, 유전자 재조합 기술의 발전에 따라, 현재까지 여덟 종류의 BMP (BMP-1~8)가 분리되었다⁶⁾. 특히, BMP-2와 BMP-7이 뼈 형성에 있어서 탁월한 효과를 보이는 것으로 알

*책임연락처: juhjang@inha.ac.kr

려져 있다⁷⁾. 또한, BMP-2 (Infuge BMP2, Medtronic)와 BMP-7 (Osteogenic protein-1, OP-1, Stryker Biotech)은 FDA 승인을 받았다.

FGF는 뇌와 뇌하수체 속에 존재하며, 섬유아 세포를 포함한 다양한 세포에서 발현된다⁸⁾. FGF는 현재까지 22 종류가 분리되었고, FGFR1,2,3,4와 결합하여 여러 기능을 한다^{9,10)}. 그 중에서, basic FGF (bFGF, FGF-2)가 뼈 형성부터, 혈관 형성 등 다양한 기능을 나타내고 있어서 가장 활발하게 이용되고 있다¹¹⁻¹⁴⁾.

VEGF는 platelet-derived growth factor (PDGF)에 속해 있고, VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₄₅, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₉, VEGF-A₂₀₆, VEGF-B, C, D, E, placental growth factor (PlGF)-1, 2가 있다^{15,16)}. VEGF의 주요 기능으로 혈관 신생(angiogenesis) 유도하고, 혈관의 투과도(permeability)를 증가시킨다. VEGF는 그의 수용체인 Flt-1 (VEGFR-1)과 KDR (VEGFR-2)을 통하여 신호 전달 물질로 작용하여 기능을 나타낸다.

NGF는 1950년대에 처음으로 발견되었고, 신경 세포(neuron)의 성장에 관여하는 단백질이다¹⁷⁾. NGF는 생물체 발달 초기에 발달이 덜 된 신경 세포를 유지시켜 주고 성숙한 여러 신경세포와 뇌 세포 조직으로의 분화를 유도한다. NGF는 지금까지 발견된 유일하게 중추 신경계통과 주위 신경 계통 손상에 대해 복구작용이 있는 활성물질이다. 따라서, 파킨슨병¹⁸⁾, 무도병¹⁹⁾, 노년치매증²⁰⁾ 등 신경손상 질병 치료에서 중요한 인자로 인식되어 다양하게 연구되고 있다.

EGF는 6 kDa의 작은 단백질로, 1962년에 처음으로 발견되었다²¹⁾. EGF는 세포핵에 작용하여 표피 세포의 분열과 증식속도를 촉진시켜, 피부 재생 과정에 관여한다²²⁾. 또한, 각막 궤양, 손상의 회복에도 효과가 큰 것으로 보고되었다²³⁾. 그 외에도, EGF는 위점막 세포 재생작용과 위산분비 억제 효과도 있다²⁴⁾. 이러한 기능을 가지는 EGF는 화장품 분야에서 폭넓게 이용되

Table 1. 성장 인자의 종류 및 기능

성장 인자	기능
BMP (Bone Morphogenetic protein)	뼈 세포의 증식 및 분화
FGF (Fibroblast growth factor)	많은 세포들의 성장, 증식 및 분화 (섬유아 세포, 상피 세포)
VEGF (Vascular endothelial growth factor)	상피 세포의 증식 및 분화
NGF (Nerve growth factor)	신경 세포의 증식 및 분화
EGF (Epidermal growth factor)	많은 세포들의 증식 촉진 (상피 세포)
IGF-I (Insulin-like growth factor-1)	많은 세포들의 증식 촉진
IGF-II (Insulin-like growth factor-II)	태아 초기 형태의 세포 증식 촉진
TGF- α (Transforming growth factor- α)	상처 치료 촉진
TGF- β (Transforming growth factor- β)	뼈와 연골 세포의 증식 및 분화

고 있으며²⁵⁾, 앞으로 영역이 크게 확대될 것으로 기대된다.

TGF- β 는 섬유아세포(fibroblast)의 형질 전환을 유도하는 물질로 처음 알려졌다으며, 이러한 성질에 따라 그 이름이 명명되었다. TGF- β 는 발생 과정, 세포 분화 및 증식, 이동, 생존, 세포외 기질의 생산, 면역 체계 등을 조절하는 인자로 알려져 있다^{26,27)}. 특히, 혈관의 발생과 혈구 세포 생산에 중요한 역할을 한다²⁸⁾. 특이하게도, TGF- β 는 성장을 촉진시키기 보다는 대부분의 세포에서 성장 억제 효과 또한 보고되어 있다²⁹⁾.

이들 대표적인 성장 인자들의 종류와 기능을 Table 1로 요약하였다. 또한, 다양한 pathway 중에서 MAP kinase pathway를 이용한 성장 인자의 작용 기전을 Figure 1에 나타내었다.

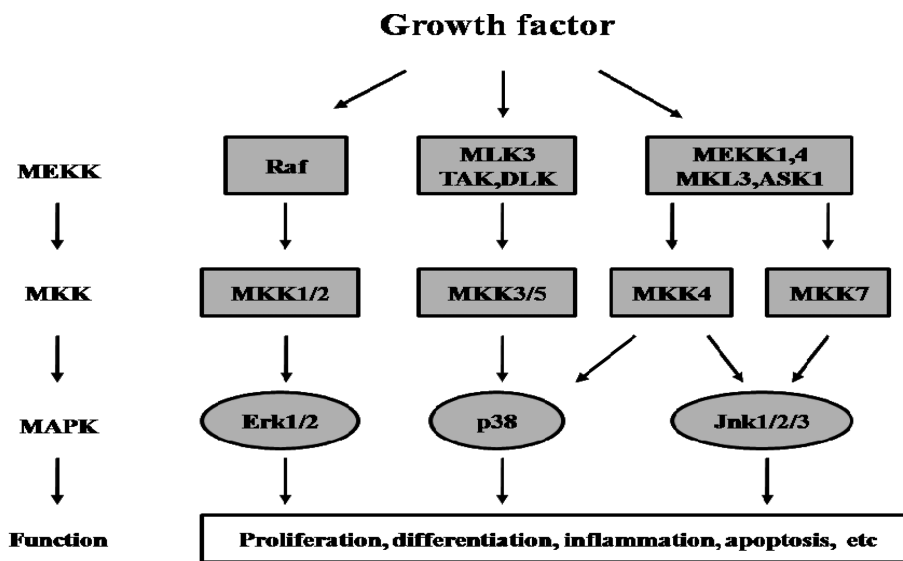


Figure 1. Representative MAP kinase pathway. Growth factor ligand binds to the receptor and activates tyrosine kinases. Through the MAP kinase pathway, growth factor plays a role in cellular response including proliferation, differentiation, and so on.

성장 인자의 조직 재생 연구 적용 방법

최근 들어, 이들 성장 인자들을 뼈, 연골, 신경 등의 조직 재생 공학 연구에 다양한 방법으로 적용시키고 있다. 그러나, 성장 인자의 여러 단점들로 인해, 전달체로써 생체 재료 (biomaterials)의 이용이 필요한 실정이다. 이들 생체 재료를 전달체로써 유용하게 이용하는 방법은 크게 다음의 세 가지로 나눌 수 있다(Figure 2).

첫 번째, 생체 재료 자체에 성장 인자를 봉입하여 전달하는 방법으로³⁰⁾, 생체 재료의 형태를 완성한 후 성장 인자를 안으로 집어넣는 방법과, 생체 재료가 완성되기 전에 성장 인자를 넣고 가공하는 방법이 있다. 전자의 경우, 단순 확산에 의해 봉입되므로, 빠른 시간 내에 성장 인자가 확산되어 방출된다. 그러나, 후자의 경우는 성장 인자의 방출을 조절하기에 용이한 것으로 알려져 있다. 두 번째, 생체 재료 표면에 성장 인자를 고정화시켜 전달하는 방법이다³¹⁾. 고정화된 성장 인자가 단순히 세포 부착에만 관여하는 것이 아니라, 세포 신호를 전달하여 세포의 기능까지 조절하게 된다. 마지막으로, 가장 널리 쓰이는 방법은 생체 재료의 미립구 형태를 이용한 성장 인자 전달 방법이다³²⁾. 물에 녹지 않는 소수성 고분자 물질을 유기 용매를 이용해서 녹이고, 성장 인자 및 유화제를 첨가한 후, 유기 용매가 증발되는 과정을 통해서 미립구 형태가 만들어진다. 미립구에서 성장 인자는 확산과 고분자의 분해에 의해 방출하게 된다. 방출 초기에는 주로 확산에 의해 성장 인자가 방출된다. 그리고, 고분자의 분해에 의한 성장 인자를 방출하기 위해 단백질의 구조 안정성을 고려해야 한다.

이들 방법을 통해, 다양한 생체 재료를 전달체로써 성장 인자들을 조직 재생 연구에 활발하게 이용되고 있다.

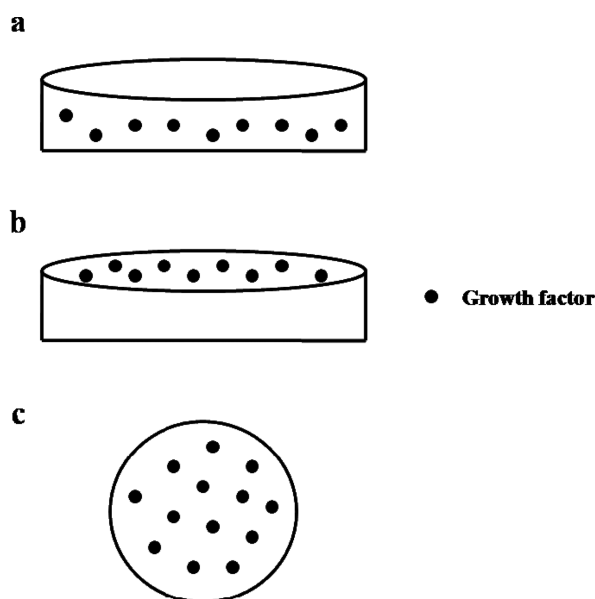


Figure 2. Growth factor delivery system by biomaterials. (a) Incorporated growth factor delivery. (b) Immobilized growth factor delivery. (c) Microspheres delivery.

성장 인자의 조직 재생 연구 적용 사례

조직 재생에 탁월한 효과를 보이는 BMP는 위에 언급했던 것처럼 BMP-2와 BMP-7이 주로 이용되었다. BMP-2와 간엽 줄기세포를 함유한 하이브리드 스캐폴드는 in vitro에서 간엽 줄기세포의 뼈 세포로의 분화를 강화시켰고, in vivo에서도 뼈 형성을 강화시키는 것으로 나타났다³³⁾. BMP-2와 간엽 줄기 세포를 함유한 하이드로겔을 이용한 또 다른 한 연구에서도 뼈 재생에 효과가 있었음을 보고하였다³⁴⁾. BMP-2와 마찬가지로, BMP-7을 함유한 collagen은 개의 뼈 연골 손상 부위의 회복을 유도하였다³⁵⁾. 이미, BMP-2와 BMP-7는 자체로도 뼈 형성을 유도하는 것으로 잘 알려져 있는데, 생체 재료와의 조합으로 효과가 상승되는 것을 확인 할 수 있었다.

다양한 기능을 나타내는 FGF-2 또한 뼈 형성에 효과가 있다는 보고가 많이 되어 있다. FGF-2와 collagen, β -tricalcium phosphate (β -TCP)의 조합은 토끼의 피질골 회복에 도움을 주는 것으로 나타났다¹¹⁾. Figure 3에서, FGF-2와 간엽 줄기 세포

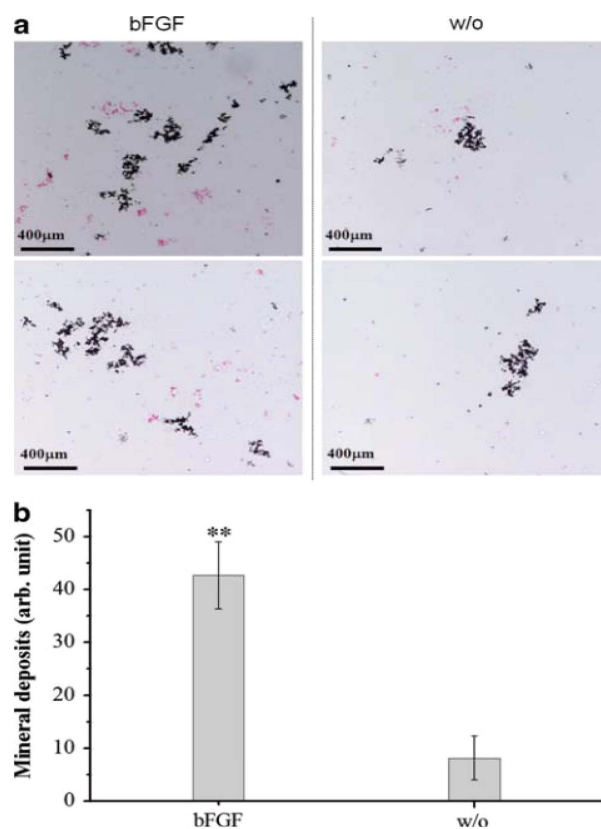


Figure 3. Effect of bFGF (5 ng) on the mineralization of MSCs cultured within the collagen hydrogels during 28 days was determined using von Kossa stain. (a) Representative images clearly show calcium deposits stained by dark gray spots. Calcium deposits were observed more frequently in the presence of bFGF. Images were counter stained with hematoxylin to reveal cell nuclei. (b) Calcified deposits were quantified by densitometric analyses (mean gray values per area), with significant mineral deposits being detected in bFGF-containing group (** $p < 0.01$, by ANOVA, $n = 3$)¹⁾.

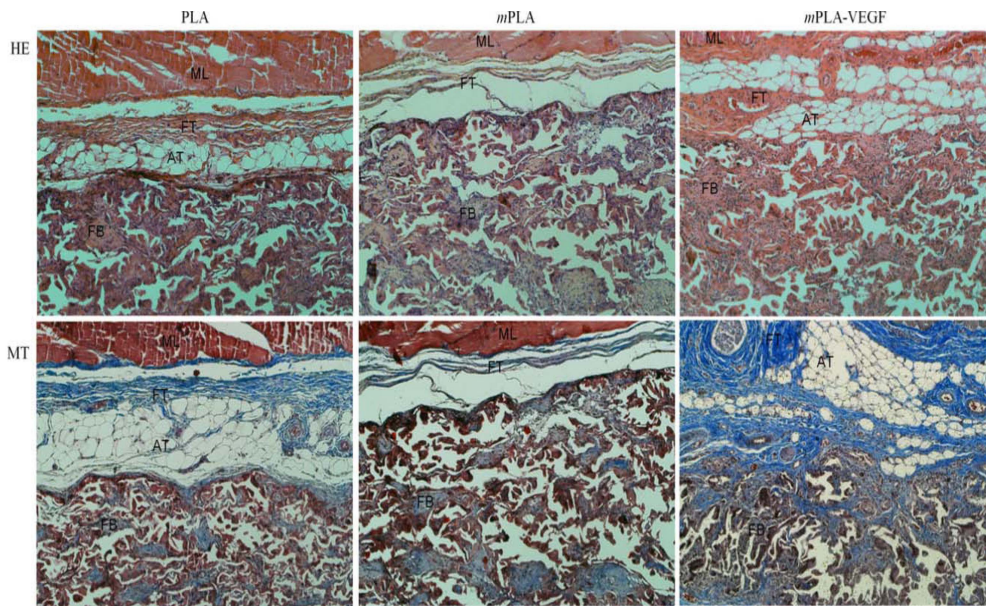


Figure 4. Representative histological images of the scaffolds implanted subcutaneously in rats and the surrounding tissues after 4 weeks; PLA, mPLA, and mPLA-VEGF, either stained with HE or MT. All the three groups show the similar patterns of mild inflammatory response around scaffolds. The observation between three groups was nearly the same with similar fibrous encapsulation and inflammation; however, the VEGF loaded mPLA group shows higher blood vessel formation within newly formed tissues than other two groups. The biological host response against three groups was minimal (original magnification $\times 100$). ML: muscle, FT: fibrous tissue, AT: adipose tissue, and FB: fibroblasts¹⁾.

포를 함유한 collagen 하이드로겔 또한 뼈 형성을 촉진하는 것으로 보고되었다¹²⁾. FGF-2와 paclitaxel을 함유한 chitosan 하이드로겔은 상처를 치료하고, 더불어 혈관 형성을 증가시키는 것으로 보고되었다¹³⁾. 뼈 형성 및, 혈관 형성과 더불어, FGF-2와 heparin/alginate gel은 쥐의 좌골 신경 재생 효과 또한 보였다¹⁴⁾. 이와 같이, FGF-2는 다양한 기능을 나타내므로, 조직 재생 연구에서 특히 활용도가 높을 것으로 기대된다.

VEGF는 주로 혈관 생성 연구에 이용되고 있다. Figure 4에 나타난 것처럼, VEGF를 함유한 PLA이 혈관 생성을 촉진하는 것으로 나타났다³⁶⁾. 이러한 혈관 생성 효과는 다양한 생체 재료를 이용한 연구에서도 보고되었다^{37,38)}. 그 외에도 VEGF를 함유한 chitosan 코팅이 뼈 형성에 도움을 준다는 연구도 보고되었다³⁹⁾.

NGF는 신경 재생 연구에 많이 이용되고 있다. NGF를 함유한 polymeric microspheres는 손상된 신경을 지닌 환자에서 entubulation을 통해 기능적인 회복을 증진시키는 것으로 나타났다⁴⁰⁾. NGF와 또 다른 생체 재료인 hyaluronic acid (HA)와의 조합 또한 신경 재생 과정의 초기 단계에 효과적임을 보였다⁴¹⁾.

EGF는 상처 치료 및 피부 재생에 탁월한 효과를 보였다. EGF를 함유한 gelatin microspheres는 상처 부위를 줄여주고, 부작용없이 생체에 적합함을 보였다⁴²⁾. EGF를 함유한 gelatin-hyaluronate sponge 또한 상피 세포의 재생 효과를 나타냈다⁴³⁾.

이처럼 성장 인자와 생체 재료와의 조합이 조직 재생에 효과적임을 보여주는 많은 연구들이 보고되었다. 최근에는 한 종류가 아닌, 두 종류 또는 세 종류의 성장 인자와 생체 재료

조합의 조직 재생 연구가 활발하게 이루어지고 있는 실정이다. 더불어, 특정한 조직 재생에 가장 효과적인 성장 인자와 생체 재료의 조합에 대한 연구가 계속 이루어져야 할 것이다.

맺음말

성장 인자는 세포의 유지, 성장 및 분화에 필수적인 단백질로 다양한 종류만큼 다양한 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 그에 따라, 조직 재생 연구에 있어서, 성장 인자 자체만의 조직 재생 효과 또한 많이 연구되었다. 보고된 연구들을 통해 효과가 있음이 확인되었으나, 성장 인자가 지니는 여러 단점들로 인해 적절한 생체 재료와의 조합이 조직 재생에 더 효과적일 것으로 기대된다. 실제로, 많은 연구를 통해서 성장 인자와 생체 재료의 조합이 조직 재생에 효과적임을 확인할 수 있다. 그러므로, 우선 성장 인자와 생체 재료 각각의 기능 및 특성들을 잘 이해하고, 가장 적절한 방법을 이용한 조합하는 일이 중요할 것으로 생각된다. 특정 조직 재생에 있어 최상의 효과를 내기 위해 성장 인자와 생체 재료의 조합에 대한 연구가 지속적으로 이어져야 할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2013년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(2013R1A1A2011375, 2010-0022628), 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(HI11C0388).

참고문헌

1. Y. R. Yun, J. H. Jang, E. Jeon, W. Kang, S. Lee, J. E. Won, H. W. Kim and I. Wall, *Regenerative Medicine*, **7**, 369-385 (2012).
2. J. Tan, Y. Wang, X. Yip, F. Glynn, R. K. Shepherd and F. Caruso, *Advance Materials*, **24**, 3362-3366 (2012).
3. E. Jeon, Y. R. Yun, W. Kang, S. Lee, Y. H. Koh, H. W. Kim, C. K. Suh and J. H. Jang, *PLoS One*, **7**, e43982 (2012).
4. S. D. Putney and P. A. Burke, *Nature Biotechnology*, **16**, 153-157 (1988).
5. P. B. Malafaya, G. A. Silva and R. L. Reis, *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, **6**, 283-295 (2002).
6. P. Ducey and G. Karsenty, *Kidney International*, **57**, 2207-2214 (2000).
7. C. A. Kirker-Head, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **43**, 65-92 (2000).
8. B. Nies, E. Dingeldein and H. Wahlig, 2000, Darmstadt, Germany, Inc. US006118043A.
9. Y. R. Yun, J. E. Won, E. Joen, S. Lee, W. Kang, H. Jo, J. H. Jang, U. S. Shin and H. W. Kim, *Journal of Tissue Engineering*, 2010, doi: 10.4061/2010/218142.
10. V. P. Eswarakumar, I. Lax and J. Schlessinger, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **16**, 139-149 (2005).
11. H. Komaki, T. Tanaka, M. Chazono and T. Kikuchi T, *Biomaterials*, **27**, 5118-5126 (2006).
12. S. A. Oh, H. Y. Lee, J. H. Lee, T. H. Kim, J. H. Jang, H. W. Kim and I. Wall, *Tissue Engineering Part A*, **18**, 1087-1100 (2012).
13. M. Ishihara, M. Fujita, K. Obara, H. Hattori, S. Nakamura, M. Nambu, T. Kiyosawa, Y. Kanatani, B. Takase, M. Kikuchi and T. Maehara, *Current Drug Delivery*, **3**, 351-358 (2006).
14. M. Ohta, Y. Suzuki, H. Chou, N. Ishikawa, S. Suzuki, M. Tanihara, Y. Suzuki, Y. Mizushima, M. Dezawa and C. Ide, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **71**, 661-668 (2004).
15. N. Murukesh, C. Dive and G. C. Jayson GC, *British Journal of Cancer*, **102**, 8-18 (2010).
16. T. Tammela, B. Enholm, K. Alitalo and K. Paavonen, *Cardiovascular Research*, **65**, 550-563 (2005).
17. M. Fiore, G. N. Chaldakov and L. Aloe, *Reviews in the Neuroscience*, **20**, 133-145 (2009).
18. S. E. Counts and E. J. Mufson, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, **64**, 263-272 (2005).
19. L. W. Chen, L. Y. Horng, C. L. Wu, H. C. Sung and R. T. Wu, *Neuropharmacology*, **63**, 719-732 (2012).
20. D. Konukoglu, G. Andican, S. F i r t i na, G. Erkol and A. Kurt A, *Acta Neurologica Belgica*, **112**, 255-260 (2012).
21. R. C. Harris, E. Chung and R. J. Coffey, *Experimental Cell Research*, **284**, 2-13 (2003).
22. R. S. Herbst, *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, **59**, 21-26 (2004).
23. E. Sener, N. Yuksel, D. K. Yildiz, B. Yilmaz, O. Ozdemi, Y. Caglar and E. Degirmenci E, *Current Eye Research*, **36**, 1005-1013 (2011).
24. M. Felkl, K. Tomas, M. Smid, J. Mattes, R. Windoffer and R. E. Leube, *PLoS One*, **7**, e45280 (2012).
25. J. K. Choi, J. H. Jang, W. H. Jang, J. Kim, I. H. Bae, J. Bae, Y. H. Park, B. J. Kim, K. M. Lim and J. W. Park, *Biomaterials*, **33**, 8579-8590 (2012).
26. T. Yang, Y. Liang, Q. Lin, J. Liu, F. Luo, X. Li, H. Zhou, S. Zhuang and H. Zhang, *Journal of Cellular Biochemistry*, **114**, 1336-1342 (2013).
27. F. Martin, L. Apetoh and F. Ghiringhelli, *Trends in Molecular Medicine*, **18**, 742-749 (2012).
28. J. Wang, Y. Wang, Y. Wang, Y. Ma, Y. Lan and X. Yang, *The Journal of Biological Chemistry*, **288**, 10418-10426 (2013).
29. 7thspace.com, 2009-01-08, Retrieved 2009-01-21.
30. R. A. Perez, T. H. Kim, M. Kim, J. H. Jang, M. P. Ginebra and H. W. Kim, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **101**, 923-931 (2013).
31. S. E. Kim, S. H. Song, Y. P. Yun, B. J. Choi, I. K. Kwon, M. S. Bae, H. J. Moon and Y. D. Kwon, *Biomaterials*, **32**, 366-373 (2011).
32. J. Hou, J. Wang, L. Cao, X. Qian, W. Xing, J. Lu and C. Liu, *Biomedical Materials (Bristol, England)*, **7**, 035002 (2012).
33. K. Na, S. W. Kim, B. K. Sun, D. G. Woo, H. N. Yang, H. M. Chung and K. H. Park, *Biomaterials*, **28**, 2631-2637 (2007).
34. N. Kimelman-Bleich, G. Pelled, D. Sheyn, I. Kallai, Y. Zilberman, O. Mizrahi, Y. Tal, W. Tawackoli, Z. Gazit and D. Gazit, *Biomaterials*, **30**, 4639-4648 (2009).
35. S. D. Cook, L. P. Patron, S. L. Salkeld and D. C. Rueger, *The Journal of Bone and Joint Surgery American volume*, **85-A Suppl 3**, 116-123 (2003).
36. J. H. Kim, T. H. Kim, G. Z. Jin, J. H. Park, Y. R. Yun, J. H. Jang and H. W. Kim, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **101**, 1447-1455 (2013).
37. L. Geng, A. Chaudhuri, G. Talmon, J. L. Wisecarver and J. Wang, *PLoS One*, **8**, e59918 (2013).
38. J. A. Shepard, F. R. Virani, A. G. Goodman, T. D. Gossett, S. Shin and L. D. Shea, *Biomaterials*, **33**, 7412-7421 (2012).
39. L. Megan, J. Jessica, H. Warren and B. Joel, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2013, doi: 10.1002/jbm.a.34745.
40. X. Xu, W. C. Yee, P. Y. Hwang, H. Yu, A. C. Wan, S. Gao, K. L. Boon, H. Q. Mao, K. W. Leong and S. Wang, *Biomaterials*, **24**, 2405-2412 (2003).
41. A. Washio, C. Kitamura, E. Jimi, M. Terashita and T. Nishihara, *Experimental Cell Research*, **315**, 3036-3043 (2009).
42. K. Ulubayram, A. Nur Cakar, P. Korkusuz, C. Ertan and N. Hasirci, *Biomaterials*, **22**, 1345-1356 (2001).
43. S. R. Hong, S. J. Lee, J. W. Shim, Y. S. Choi, Y. M. Lee, K. W. Song, M. H. Park, Y. S. Nam and S. I. Lee, *Biomaterials*, **22**, 2777-2783 (2001).