

Poly(lactic-co-glycolic acid)와 Hydroxyapatite 복합재료 지지체의 연골세포 적 합성 연구 (II) The Effect of Poly(lactic-co-glycolic acid)/Hydroxyapatite Composite Scaffold on Chondrocyte Cyto-compatibility (II)

이선호¹ · 서혁진² · 최재봉² · 박종철³ · 김정구^{1,*}

SunHo Lee¹, Hyokjin Seo², Jae Bong Choi², Jong-Chul Park³, and Jeong Koo Kim^{1,*}

¹인제대학교 의공학과, ²한성대학교 기계시스템공학과, ³연세대학교 의과대학 의학공학교실

¹Department of Biomedical Engineering, Inje University, Gimhae, Korea

²Department Mechanical Systems Eng., Hansung University, Seoul, Korea

³Department of Medical Engineering, Yonsei University, Seoul, Korea

(Received May 6, 2008/Accepted May 15, 2008)

The effect of PLGA/HA composite material on cellular adhesion and proliferation was investigated. The composite film was prepared by poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and hydroxyapatite (HA). The PLGA was used as matrix material and the HA particles were incorporated as reinforcing material. The HA particles were mixed in 5, 10 and 15 wt% with PLGA for preparing PLGA/HA composite film and scaffold. Mechanical property of the composite film was characterized by tensile test. The ultimate tensile strength of 10 wt% HA content film was two-fold higher than control group. Surface of the composite films and scaffolds were characterized by contact angle measurement and scanning electron microscope (SEM). The PLGA/HA composites were more hydrophilic than control group. The SEM picture showed that the pores in the PLGA/HA composite scaffold were clearly observed as the pores in the PLGA scaffold (control). For the PLGA/HA composite scaffold, compression test was performed. The compressive stress was decreased with increasing the amount of HA. This is the same phenomenon as the tensile test for composite film. For cell-compatibility, cellular attachment and proliferation were significantly higher on PLGA/HA (10 wt%) composite film than control group (1.5 times higher in attachment test and 1.3 times higher for 6th-day culture in proliferation assaying, $p < 0.05$). However, the PLGA/HA (10wt%) composite scaffold showed not as good result as the film has. For 3-D scaffold structure, it is presumed that other geometrical factors may important role in cellular adhesion and proliferation.

Key words: PLGA, Tissue engineering, Hydroxyapatite, Composite, Chondrocyte

서 론

인체의 관절부분에 존재하는 연골은 혈관이 존재하지 않고, 연골세포 한 종류의 세포로만 구성되어 있다. 연골은 재생이 어려우며 재생이 된다고 해도 재생되는데 걸리는 시간이 매우 길다. 현재까지 관절 연골의 치료에 사용되는 치료법들 중에 만족할 만큼의 치료효과를 주고 있는 것은 거의 없는 것으로 알려졌다.¹⁾ 현재 관절 연골 치료로 사용되고 있는 치료법들로는 관절 전체를 인공관절로 대체하거나 또는 관절의 연골을 모두 제거하고 인공연골로 대체하는 방법을 사용하고 있으며 이러한 방법들은 관절운동에 제한적이고 많은 부작용을 초래한다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 조직공학적 조직재생을 유도하여 그 문제점을 해결하려는 노력이 많이 시도되고 있다. 조직공학은 질병이나 사고, 또는 노화로 인해 퇴화되고

손실된 조직을 살아 있는 생물학적 또는 생리학적 대체물을 이용하여 그 질병을 치료하는데 목적이 있다. 이러한 연골 재생을 위해 현재 세포와 지지체를 이용하는 조직 공학적 방법을 통해 손상된 연골 조직재생을 유도하는 시도가 *in vivo/vitro* 방법으로 행해지고 있다.¹⁻³⁾

합성 고분자 중에서, poly(lactic acid), poly(glycolic acid), poly(ϵ -caprolactone), 그리고 이들의 공중합체가 뛰어난 생분해성과 생체 적합성으로 인해 많이 사용되어 지고 있다. 하지만 고분자가 가지는 약한 물리적 강도, brittleness로 인해 뼈나 연골 재생에는 매우 제한적이다. 현재 바이오 세라믹을 도입한 고분자/바이오세라믹 복합 지지체가 널리 연구되어지고 있다. 생체재료로 사용되어 지고 있는 바이오세라믹 중 하이드록시 아파타이트는 (Hydroxyapatite, HA, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, Ca/P: 1.67) 화학적으로 골과 하드 티슈의 미네랄 성분과 유사하며, 생체 내에서 무독성이다. 이러한 이유로, 생체적합성이 뛰어나며 생분해도가 조절이 가능한 poly(lactic acid-co-glycolic

*책임연락저자: jkkim@inje.ac.kr

acid) (PLGA)와 우수한 생체 적합성을 가지는 HA의 복합 지지체는 생체적합성 뿐만 아니라 물리적 강도 또한 향상시킬 수 있다. 현재, 많은 연구자들이 PLGA/HA 복합 지지체의 특성과 세포와의 상호 반응에 대하여 연구하고 있다.^{4,6,14,15)} 또한, 재료를 이용하여 생체적합성을 높이는 방법 이외에 지지체의 구조의 이점으로 인해 세포접착을 유도하여 생체적합성을 높이는 방법도 연구하고 있다.^{4,7)}

따라서, 본 연구에서는 생분해성 고분자 중의 하나인 PLGA와 바이오 세라믹인 HA를 복합재료화 하여 기계적 강도를 향상시키고, 연골세포의 접착 및 증식에 미치는 영향을 조사하고, 관절 연골의 재생에 필요한 PLGA/HA 복합 지지체에 가장 적절한 HA의 비율을 찾고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 시약 준비

Poly(lactide-co-glycolic acid) (PLGA)는 Lakeshore-Biomaterials (Brookwood Pharmaceuticals, Inc. U.S.A.)에서 구입하였다. Hydroxyapatite (HA)는 Sigma-Aldrich에서 구입하였으며, 10~100 μm 크기의 파우더를 섞어 복합재를 준비하였다. Chloroform은 Dusan Pure Chemical. Co. LTD에서 구입하였다.

PLGA/HA 복합 필름 제작

PLGA/HA 복합 필름은 solvent-casting 방식으로 제작하였다. PLGA 3 g을 Chloroform 15 ml에 완전히 녹인 후, 이 용액에 HA 파우더를 각각 5, 10, 15 wt% 비율로 넣어 균일하게 분포 되도록 1시간 동안 교반시킨다. 이 PLGA/HA 용액을 10×11 cm 크기의 몰드에 부어 수평을 유지한 상태로 상온에서 24시간 동안 건조시킨 뒤 다시 진공 냉동건조기에 넣어 48시간 동안 잔류 용매를 완전히 제거 하였다. 완전히 건조시킨 필름은 1 cm×1 cm의 크기로 잘라 실험을 진행하였다. HA 코팅의 여부는 FE-SEM(HITACHI S-4300DSE., Japan)으로 확인하였다.

PLGA/HA 복합 지지체 제작

PLGA/HA 복합재 지지체는 salt-leaching 방법으로 제작하였다. PLGA와 NaCl은 1:15의 무게 비로 섞어 주었으며, NaCl은 크기가 300~355 μm 의 범위를 가지는 micro sieve에 걸러서 크기를 결정하였다. 먼저 PLGA를 chloroform에 녹인 후 무게 비율에 맞게 HA를 PLGA 용액에 넣어 균일하게 교반시킨다. 그런 다음, NaCl과 미리 녹여 놓은 PLGA/HA 현탁액에 넣은 다음 테플론 몰드에 부어 상온에서 압축 붓을 이용하여 압축을 가하는 방법으로 제작하였다. 또한, 표면에 생기는 고분자 피막을 방지하기 위하여 2단계에 걸쳐서 압축을 가해 주었다. 테플론 몰드에서 5시간 정도 건조시킨 뒤, NaCl 제거를 위해 증류수에 담가 48시간 동안 녹여내었다. 6시간 간격으로 증류수는 교환하였다. 그런 다음 지지체를 상온에서

12시간, 동결 건조기에 넣어 24시간 동안 건조시켰다. PLGA/HA 복합재 지지체는 HA의 함량을 5 wt%, 10 wt%, 그리고 15 wt%로 시편을 준비하였다.

PLGA/HA 복합 필름의 표면 접촉각 측정

PLGA/HA 복합재 필름의 표면 친수성을 알아보기 위하여 contact angle analyzer (Phoenix 150)를 이용하여 측정하였다. 제작된 필름을 각각 그룹별로 n수를 6으로 하여 sessile drop 방법으로 접촉각을 측정한 뒤 평균값으로 그 차이를 비교하였다.

인장 및 압축 실험을 통한 강도 테스트

인장 테스트와 압축 테스트를 이용하여 PLGA/HA 복합 필름과 다공성 지지체의 기계적 강도를 분석하였다. 시편의 단축 방향의 stress-strain 값은 Micro-Load System (R & B INC., Korea)를 이용하여 측정하였다. 준비된 film은 헤드 속도 2 mm/min, 5 kgf 로드 셀을 이용하여 인장 테스트를 실시하였고, 다공성 지지체는 헤드 속도 0.5 mm/min, 5 kgf 로드 셀을 각각 이용하여 압축테스트를 실시하였다.⁹⁾ 필름의 각 시편 크기는 15 mm×10 mm, 두께는 0.12 ± 0.02 mm (n=5)이며, PLGA/HA 복합지지체는 $5.5(\pm 0.3) \times 5.5(\pm 0.2) \times 5.5(\pm 0.23)$ mm의 크기로 제작하였으며, 인장은 시편이 완전히 끊어 질 때까지, 압축은 압축방향의 60% 변형률까지 실험을 진행하였다.⁷⁾

연골세포의 분리와 배양

연골은 돼지의 다리 무릎 관절에서 추출하여 collagenase type II을 이용한 효소분해법으로 연골세포를 추출하였다. 연골을 0.5×0.5×0.2 mm의 크기로 잘라 0.2% collagenase type II (GIBCO) 용액에 넣어 14시간 동안 용해시켰다. 용해된 연골collagenase 용액을 70 m nylon sieve (cell strainer, Falcon)에 걸러 1000 rpm에서 5분 동안 원심분리 하여 연골 세포를 추출하였다. 추출한 연골 세포는 Hank's balanced salt solution (HBSS)으로 2~3번 세척하여 잔류해 있는 collagenase type II 용액을 제거한 뒤 $2.0 \times 10^4/\text{cm}^2$ 의 밀도로 120 mg/L penicillin와 200 mg/L streptomycin을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma) 배지에 넣어 37 °C, 5% CO₂의 조건하에 배양하였다. 배지는 매 3일마다 교환하여 주었다.^{10,11)}

Immunohistochemistry (IHC) 테스트

연골 세포의 ECM 단백질의 주 구성성분인 type II collagen을 분석하기 위해 Immunohistochemistry (IHC)를 통하여 확인하였다. 플라스크에서 단층으로 *in vitro*로 성장증식하게 되는 연골세포가 fibroblast화 되었는지를 type II collagen를 염색하여 확인하였다. 염색에 사용한 세포는 세포실험에 사용할 2~3번 passage 세포와 control로 사용할 4번 passage 세포를 사용하였다. 각각 antibody를 사용하지 않고 염색한 것을 negative control로 하여 비교하였다. IHC를 위해

Anti-Human collagen type II (MP Biomedicals, LLC, USA) 와 Dako Real Envision Detection System (Dako, Denmark) 를 사용하였다.^{12,13)}

세포 점착 및 증식 테스트

세포의 점착 및 증식에 관한 연구는 각각 다른 시간 간격동안 테스트를 시행하였다. 세포 실험을 위해 필름 시편을 $\phi = 12$ mm의 크기로 준비하고, 지지체 시편은 $\phi = 7$ mm, 높이 = 3 mm의 크기로 제작하였다. 각각의 시편을 24-well plates (Falcon)에 넣은 다음, PBS 용액으로 3번 세척하였다. 그리고 점착 테스트에서는 2-3번 분주한 연골세포를 1.3×10^5 cells/film, 2.0×10^4 cells/scaffold(PLGA/HA)의 밀도로 각 시편에 seeding 하였다. 시편은 4시간 동안 37°C and 5% CO₂에서 배양한 뒤, 배지를 첨가하고 4시간 더 배양을 하였다. 그 뒤, 시편에 점착된 세포의 수를 측정하기 위해 Cell Counting Kit (CCK-8, Dogindo Lab, Kumamoto, Japan)를 사용하였다. 10 μ l의 CCK-8 용액을 각 시편 위에 넣은 뒤 4시간 동안 용액과 살아 있는 세포가 반응하도록 놓아둔다. 세포와 반응한 용액은 분홍색에서 오렌지색으로 변하게 되며 이렇게 변화한 용액을 96 well plate에 옮겨 담아 450 nm에서 micro-plate reader (synergy HT, BIO-TEK)를 이용하여 흡광도를 측정하여 시편에 점착된 세포의 수를 간접적으로 계산하여 구하였다. 세포 증식 실험에서는 1.3×10^4 cells/film, 1.3×10^4 cells/scaffold (PLGA/HA)의 밀도로 각 시편에 연골세포를 seeding하였다. 증식된 세포는 각각 1, 3, 6일에 측정하였다.

결과 및 고찰

PLGA/HA 복합 필름 및 지지체 특성 분석

PLGA와 PLGA/HA 복합 필름의 표면의 접촉각을 측정하였다. 측정된 결과는 Table 1에 요약하였다. HA를 섞은 복합 필름의 접촉각이 PLGA ($72 \pm 2.8^\circ$)에 비하여 감소 (PH5 = 62 ± 4.1 , PH10 = 61 ± 2.1 , PH15 = 62 ± 1.5)하는 경향을 보였다 ($p < 0.05$). 소수성이 강한 PLGA의 표면성질이 상대적으로 친수성인 HA에 의해 친수화 된 것으로 보인다. PLGA/HA 복합 필름간의 유의성 차이는 보이지 않았다.

인장 및 압축 실험을 통한 PLGA/HA 필름과 복합 지지체 특성 분석

PLGA와 PLGA/HA 복합 필름의 인장 시험 결과는 Table 1에 나타내었다. HA의 함유량이 증가할수록 tensile strength가

Table 2. Physical properties of PLGA/HA composite scaffolds (n=5)

	Compressive Stress (MPa)	Young's Modulus (MPa)
PLGA (P)	0.41 \pm 0.02	0.48 \pm 0.05
PLGA/5% (PH5)	1.56 \pm 0.15	3.35 \pm 0.21
PLGA/10% (PH10)	1.984 \pm 0.74	2.97 \pm 0.26
PLGA/15% (PH15)	0.44 \pm 0.12	3.46 \pm 1.49

증가하다가 15 wt% 유한 시편 그룹에서는 오히려 감소하였다. 이는 복합재료이론에서 강화하는 particle의 양이 최적선을 넘어서서 오히려 강도가 약해진 것으로 판단된다. 결과를 보면 10 wt%의 HA함유량이 복합재료에서 강도가 증가하는 mixing point에 가까운 값이라고 사료된다.

Table 2에는 복합 지지체의 압축 시험 결과를 나타내었다. 지지체도 필름과 비슷한 경향을 보이고 있지만, 그룹별 값이 거의 비슷한 값을 나타내었다. 복합 지지체의 기계적 성질은 재료자체의 물성에 영향을 받지만, 다공성 구조를 가지고 있기 때문에 재료의 구조적 성질에 의해 많은 영향을 받기 때문에, 비슷한 크기의 기공과 porosity를 가지고 있기 때문에 기계적 성질이 비슷한 값을 나타낸 것이라 사료된다. 그러나, 10 wt% HA 함유된 복합재 지지체가 가장 강도가 높은 값을 나타내었다.

FE-SEM 통한 필름과 지지체의 표면 및 단면의 형태학적 분석

SEM 촬영을 통해 필름과 지지체의 표면과 단면을 관찰하였다. Figure 1의 (a)와 (b)는 필름의 대표적인 표면을 보여주고 있다. 전체적으로 PH5와 PH10 그룹에서는 HA가 균일하게 분포된 것을 확인하였는데, PH15 그룹에서는 HA가 뭉쳐 clot을 형성하고 있으며(Figure 1(b)), clot 안을 확대한 사진에서는 가는 crack이 발견되기도 하였다.

지지체의 표면(Figure 1)과 단면 촬영 결과 P, PH5, PH10 세 그룹간의 뚜렷한 차이는 발견되지 않았으며, 세 그룹 모두 pore의 모양이 NaCl 결정모양으로 잘 유지되었음을 확인하였다.

세포 점착 및 증식 테스트

세포 점착 및 증식테스트를 하기위해 2-3 분주한 연골세포를 사용하였다. IHC 테스트 결과 4번째 분주한 연골세포에서는 type II collagen을 발견할 수 없었고, 3번째 분주한 연골세포까지 phenotype을 유지하는 것을 관찰 했다(Figure 2).

Table 1. Physical properties of PLGA/HA composite film (n=5)

	Contact angle	Ultimate tensile Strength (MPa)	Ultimate tensile strain	Stiffness (MPa)
PLGA (P)	68	1.89 \pm 0.4	6.25 \pm 0.52	2.60 \pm 0.38
PLGA/5% (PH5)	61.75 \pm 4.06	3.4 \pm 0.3	4.91 \pm 0.16	12.26 \pm 2.38
PLGA/10% (PH10)	58.125 \pm 2.1	3.9 \pm 0.37	4.50 \pm 0.87	16.56 \pm 5.96
PLGA/15% (PH15)	56 \pm 1.51	1.77 \pm 0.1	3.69 \pm 0.39	6.46 \pm 1.49

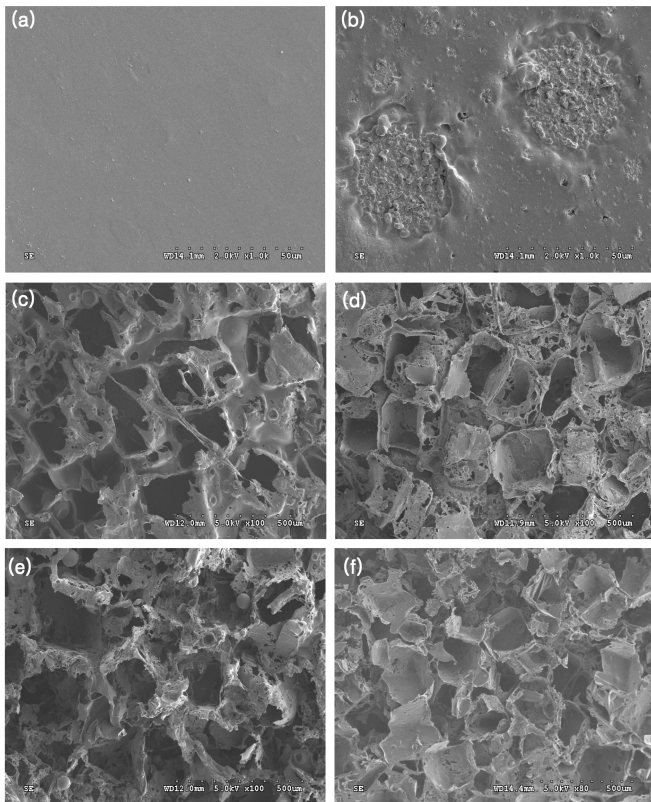


Figure 1. SEM image PLGA/HA composite films and scaffolds : (a) PLGA 10 wt% film, (b) PLGA/HA 15 wt% film, (c) PLGA/HA composite scaffold, (d) PLGA/HA 5 wt% composite scaffold, (e) PLGA/HA 10 wt% composite scaffold (f) PLGA/HA 15 wt% composite scaffold.

PLGA/HA 복합재 필름에서의 연골세포의 점착 및 증식은 Figure 3에 나타난 바와 같이 PLGA/HA 복합재군에서 HA 10 wt% (PH10) 군이 대조군 보다는 약 1.5배 더 많은 세포

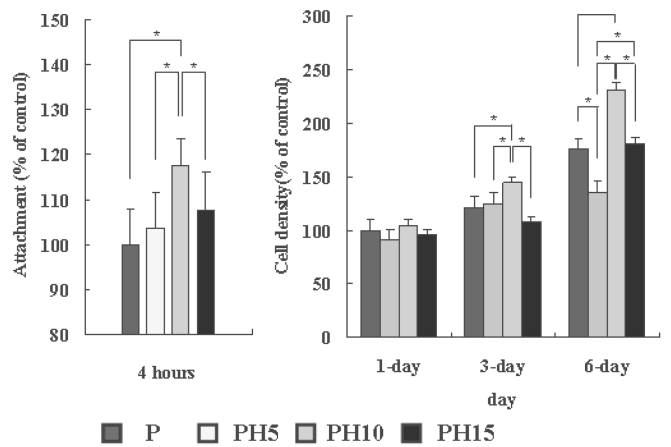


Figure 3. Effect of PLGA/HA composite on chondrocyte attachment (1.3×10^5 cells/film) (a), and proliferation (1.3×10^4 cells/film) (b) ($*p < 0.05$).

가 점착 되었다($p < 0.05$). 세포 증식테스트에서는 6일째 배양 했을때, PH10 군이 대조군보다 약 1.3배 높은 증식율을 나타 내었다. 그러나, PH5군 및 PH15군에서는, 세포점착은 대조군 에 비해 조금씩 증가한 양상을 보였으나, 세포 증식 테스트에 서는 대조군보다 감소하거나 비슷한 양상을 보였다. 고분자 재 료의 matrix 필름에 적절한 양의 HA의 혼합은 연골세포의 점 착 및 증식의 향상을 보였다. 그러나, HA 15 wt% 이상에서 는 HA가 필름의 변성을 초래해서 세포의 점착이나 증식에 손 상을 주었던 것으로 사료된다. 필름 형태의 시편에서는, 혼합 된 HA의 양이 연골세포의 점착이나, 증식에 영향을 미친다고 생각된다.

지지체군 에서는 Figure 4에서와 같이 PH10군이 다른 지지 체군에 비해 점착도가 다소 떨어지는 것을 알 수 있었다. 이는

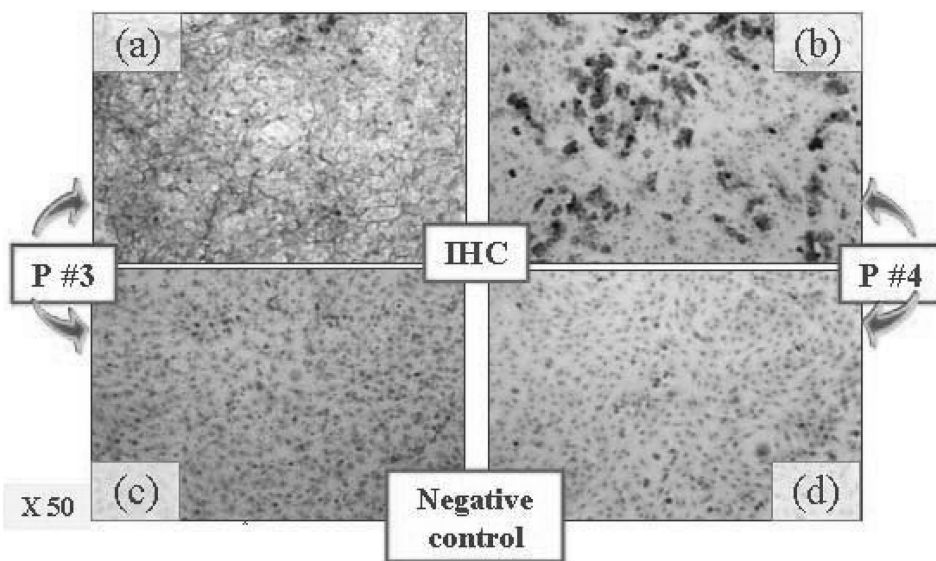


Figure 2. Immunohistochemistry of chondrocyte, collagen type II: 3rd passage of chondrocyte (a), 4th passage of chondrocyte (b) and negative control 3rd (c) and 4th (d) (non-antibody treatment)

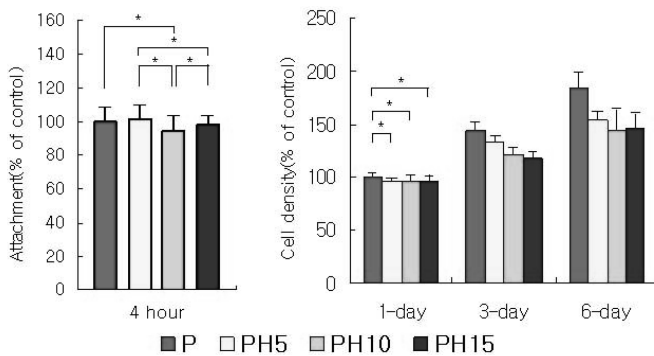


Figure 4. Effect of hydroxyapatite on chondrocyte attachment (2.0×10^4 cells/scaffold) (a), and proliferation (1.3×10^4 cells/scaffold) of (b) (* $p < 0.05$)

서의 구조적 성질에도 의존한다는 것을 알 수 있었다. 지지체 군에서는, PLGA/HA 복합재로 준비된 모든 시편이 배양 3일, 배양 6일 모두 감소된 결과를 보였다. 이는 HA의 세포에 대한 화학적 효과 보다는 지지체의 구조적 성질이 세포의 증식에 큰 영향을 미친다고 생각된다.

결론

본 연구에서는, 생분해성 고분자 물질인 PLGA에 HA의 첨가에 의한 연골세포의 친화성에 대해 검토 하였다. 필름 형태의 시편에서는 HA의 적절한 양에 따라서 연골세포의 점착 및 증식이 향상되었으나, 3-D형태의 지지체 구조에서는 기하학적인 요소에 더 크게 영향을 미치는 것으로 생각된다. 본 실험에서, 10 wt%의 HA를 혼합한 PLGA/HA 복합재가 가장 연골세포의 점착과 증식에 유리한 결과를 보였다. 지지체에서는 HA의 혼합으로 인한 기하학적 요인으로 인해 연골세포의 점착과 증식이 다소 감소한 것으로 보인다. 3-D 지지체에서 HA를 15 wt% 이상 혼합하였을 경우 HA의 뭉침현상으로 인하여 연골세포의 증식 과정에서 지지체의 붕괴가 나타났다. 이로 인해 세포 유실이 발생하여 증식 효과가 감소한 것으로 사료된다. HA의 particle size 변화 및 구조변화 등을 통하여 뭉침 현상을 방지하여 HA의 함량을 20 wt%, 30 wt%로 증가시킨 PLGA/HA 복합체의 기계적 성질 및 세포 친화성 성질을 더 향상시킬 수 있을 것이라 생각된다.

감사의 글

“This work was supported by the Korea Research Foundation Grant funded by the Korea Government (MOEHRD)” (D00615).

참고문헌

1. D. W. Hutmacher, “Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage,” *Biomaterials*, **21**, 2529-2543 (2000).
2. Y. Z. Wang, D. J. Blasioli, H. J. Kim, H. S. Kim, and D. L. Kaplan, “Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes,” *Biomaterials*, **27**, 4434-4442 (2006)
3. A. Ciorba and A. Martini, “Tissue engineering and cartilage regeneration for auricular reconstruction,” *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, **70**, 1507-1515 (2006).
4. C. Durucan and P. W. Brown, “Low temperature formation of calcium-deficient hydroxyapatite-PLA/PLGA composites,” *Journal of Biomedical Materials Research*, **51**, 717-725 (2000).
5. S. -S. Kim, M. S. Park, O. Jeon, and C. Y. Choi, “Effects of hydroxyapatite in 3-D chitosan-gelatin polymer network on human mesenchymal stem cell construct development,” *Biomaterials*, **27**, 1859-1867 (2006).
6. C. -H. Chang, H. -C. Liu, C. -C. Lin, C. -H. Chou, and F. -H. Lin, “Gelatin-chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold for cartilage tissue engineering,” *Biomaterials*, **24**, 4853-4858 (2003).
7. M. Kikuchi, Y. Suetsugu, J. Tanaka, and M. Akao, “Preparation and mechanical properties of calcium phosphate/copoly-L-lactide composites,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **8**, 361-364 (1997).
8. Chih-Hung Chang et al. “Gelatin-chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold for cartilage tissue engineering,” *Biomaterials*, **24**, 4853-4858 (2003).
9. Sarah E. Petricca, Kacey G. Marra, Prashant N. Kumta, *Acta Biomaterialia*, **2**, 277 (2006).
10. Chih-Hung Chang, Hwa-Chang Liu, Chien-Cheng Lin, Cheng-Hung Chou and Feng-Huei Lin. Gelatin-chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold for cartilage tissue engineering,” *Biomaterials*, **24**, 4853, (2003).
11. J. J. A. Barry, H. S. Gidda, C. A. Scotchford, S. M. Howdle, *Biomaterials*, **25**, 3559-3568, (2004).
12. H. Janice Lee, Jin-Soo Lee, Thanissara Chansakul, Christopher Yu, Jennifer H. Elisseff, Seungju M. Yu, *Biomaterials*, **27**, 5268-5276, (2006).
13. Horst Claassen, Joachim Hassenpflug, Michael Schnke, Walter Sierralta, Hubert Thole, and Bodo Kurz, *Annals of anatomy*, **183**, 223-227, (2001).
14. Zhongkui Hong, Peibiao Zhang, Chaoliang He, Xueyu Qiu, Aixue Liu, Li Chen, Xuesi Chen, Xiabin Jing, “Nano-composite of poly(L-lactide) and surface grafted hydroxyapatite: Mechanical properties and biocompatibility,” *Biomaterials*, **26**, 6296-6304, (2005).
15. J. B. Lee, S. G. Lee, S. M. Yoo, J. -C. Park, J. B. Choi, and J. K. Kim, “Improved Attachment and Proliferation of Porcine Articular Chondrocyte onto Hydroxyapatite Incorporated Poly (Lactic-co-Glycolic acid),” *Biomaterials Research*, **10**, 196-200 (2006).