

케라틴이 첨가된 PLGA 필름에서 케라틴 함량별 SC세포의 증식 및 형태유지에 관한 연구

오아영 · 김순희 · 김윤태 · 전나리 · 양재찬 · Sang Jin Lee*

James J. Yoo* · Mark van Dyke* · 신형식** · 이종문 · 강길선†

전북대학교 고분자융합소재 연구센터, *웨이크 포레스트 의과대학 재생의학과, **전북대학교 화학공학부
(2008년 8월 13일 접수, 2008년 9월 20일 수정, 2008년 10월 28일 채택)

A Study on Proliferation and Phenotypical Stability of Schwann Cell on Keratin/PLGA Film

A Young Oh, Soon Hee Kim, Yun Tae Kim, Na Ri Jeon, Jae Chan Yang, Sang jin Lee*, James J. Yoo*, Mark van Dyke*, Hyung-Sik Shin**, John M. Rhee, and Gilson Khang†

Polymer Fusion Research Center, Chonbuk National University,
664-14, Dukjin, Jeonju 561-756, Korea

*Wake Forest Institute for Regenerative Medicine, Wake Forest University School of Medicine,
Medical Center Boulevard, Winston-Salem, NC 27157, USA

**Division of Chemical Engineering, Chonbuk National University,
664-14, Dukjin, Jeonju 561-756, Korea

(Received August 13, 2008; Revised September 20, 2008; Accepted October 28, 2008)

초록: 본 연구는 신경손상 모델에서 신경재생을 유도하는 슈반세포(SC)의 배양에 케라틴이 미치는 영향을 확인하기 위한 실험으로써, 친수성 아미노산으로 구성된 케라틴과 PLGA를 혼합하여 케라틴/PLGA 필름을 0, 10, 20, 그리고 50 wt%가 되도록 제조하여, 케라틴 안에 존재하는 다양한 단백질 및 신호전달물질이 슈반세포의 증식, 부착형태 그리고 표현형 유지에 미치는 영향을 확인하였다. 세포의 배양 방법은 손쉽고 순수한 세포 분리가 가능한 Morrissey의 방법을 이용하였고 필름의 젖음성 확인을 위하여 접촉각 측정을 실시하였으며, 정해진 시간에 세포를 계수하여 케라틴 함량에 따른 세포 성장차이를 비교하였다. 케라틴/PLGA 필름에서의 세포의 부착 거동 및 세포 형태를 SEM을 통하여 확인하였고 슈반세포의 표현형 유지를 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 실험 결과, 다른 함유량과 비교 시 케라틴 10 또는 20 wt%가 함유된 케라틴/PLGA 필름이 SC 성장 및 표현형 유지에 긍정적인 영향을 미침을 확인하였다.

Abstract: Keratin contains regulatory molecules that can enhance neuronal cell activity. We fabricated keratin/PLGA films using 0, 10, 20, and 50 wt% of keratin using solvent casting method. We measured the contact angle of each film and cell proliferation was assayed by counting the cells attached on the film. Adhered cell morphology was confirmed by scanning electron microscope. RT-PCR was conducted to evaluate the gene expression of NF, NSE, and S-100, the Schwann cell markers. The keratin content of 20 and 50 wt% provided higher wettability than PLGA. The 20 wt% keratin was better in cell adhesion and proliferation of SCs than other keratin/PLGA films. The phenotypic stability of SC was maintained with the keratin content of 10 and 20 wt%.

Keywords: keratin, PLGA, phenotype, Schwann cell, proliferation.

서 론

신경계는 들어온 자극을 종합해서 반응을 생성하는 뇌와 척수를 포함하는 중추신경계와 자극과 반응을 전기신호의 형태로 중추신경계에 전달하는 말초신경계로 구성되어 있다.¹ 신경손상은 말초신경시스

템을 약하게 하며 작은 갭의 재생도 매우 제한적이며, 중추신경시스템의 재생은 물리적, 화학적 방해로 인해 본질적으로 매우 어렵다.²⁻⁴ 그러나, 최근 수년 전부터 분자생물학에 의한 신경과학이 발달되면서 신경세포의 구조와 기능이 분자 수준에서 해명되고 있으며 신경전달물질과 신경영양 인자의 중요성이 부각되면서 오랜 동안의 정설을 뒤엎고 중추신경을 재생할 수 있다는 사실이 입증되었다.^{5,6}

슈반세포(Schwann cell, SCs)는 신경아교 세포로서 말초신경을 싸

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

고 있는 수초를 구성하는 세포로 신경전달의 속도를 빠르게 하는데 도움을 주고,⁷ 신경이 손상되면 슈반세포가 손상부위로 이동하여 신경성장인자와 뇌유래 신경전달인자 등의 신경영양인자를 생산하여 신경의 재생에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.⁸⁻¹⁰ 뿐만 아니라 중추신경재생에 있어 재생세포로 널리 연구되고 있다.¹¹⁻¹⁴

천연유래 고분자인 케라틴은 머리카락, 양모, 손톱, 깃털 등을 구성하는 섬유 단백질의 구성요소 중 하나로서 머리카락 형성의 주기적인 과정은 계속적으로 오르고 내리면서 30개의 성장요소, 사이토킨, 그리고 다른 신호분자들이 최적의 효과를 올리도록 조절되어 있어 머리카락에서 추출된 케라틴은 세포의 행동을 조절하는 미량의 분자와 세포의 이동과 부착, 자가집결을 조절하는 많은 양의 단백질 기질을 포함한다.¹⁵⁻¹⁷ Tachibana 등은 케라틴을 함유한 필름에서 섬유아세포의 배양으로 세포의 증식과 부착이 뛰어나며, 높은 세포 성장을 확인하였다.¹⁷ 뿐만 아니라 van Dyke 등은 케라틴을 이용하여 슈반세포가 적정량의 케라틴 희석물에 노출되면 세포의 증식과 이동 그리고 유전자의 표현이 증가함을 확인하였으며 말초신경 손상 모델에 케라틴 지지체를 이식하는 실험을 통하여 케라틴 생체물질이 신경 재생을 강화하는 조절 분자가 들어있음을 명백히 확인하였다.¹⁵

조직공학적 치료에 있어서 지지체는 세포의 부착과 증식 및 분화를 효과적으로 유도하는 기능을 하고, 인체 내에서 높은 생체친화성을 가지며 지지체로서의 역할을 다한 후 생체 내에서 안전하게 흡수 분해되어야 한다.¹⁸ 이와 같은 조건을 갖춘 α -히드록시산 계열인 폴리글리콜라이드(PGA), 폴리락타이드(PLA), 및 그들의 공중합체인 PLGA는 생체내에서 가수분해에 의하여 젖산과 글리콜산으로 전환되며 결국에는 이산화탄소와 물로 체외로 배출되는 생분해성 고분자로서 현재 많이 사용되고 있다.¹⁹

본 논문의 이전 연구에서 케라틴 함량이 10, 20 wt%인 3차원 지지체에서 골수간엽줄기세포의 지속적인 세포증식을 확인하였고 이러한 세포의 성장과 증식에 긍정적인 영향을 미치는 이유는 케라틴이 가지는 생체적합성과 친수성 때문으로 확인되었다.²⁰ 이러한 케라틴의 뛰어난 생체적합성에 관한 결과와 더불어 케라틴이 희석된 배양액이 슈반세포의 복사조절에 긍정적인 영향을 끼치는 연구결과에 착안하여 본 실험을 진행하였다. 본 연구는 신경손상 모델에서 신경재생을 유도하는 슈반세포의 배양에 케라틴이 미치는 영향을 확인하기 위한 실험으로써, 다양한 케라틴이 함유된 케라틴/PLGA 필름에 신경세포 중 하나인 슈반세포를 파종하고 이의 복사조절에 영향을 미치는 최적의 케라틴 함량의 확인과 케라틴 함량에 따른 슈반세포의 특성분석을 시도하였다.

실 험

시약 및 재료. 케라틴은 인간 머리에서 유래된 것으로 미국의 Wake Forest 의대(Wake Forest University School of Medicine, Winston-Salem, USA)에서 제공 받았다. PLGA(락타이드/글라이콜라이드 몰비 75/25, Resomer® RG 756, Boehringer Ingelheim Chem. Co. Ltd., Germany)는 평균분자량이 90000 g/mole인 것을 사용하였다. 메틸셀룰로라이드(MC, Tedia Co. Inc., USA) 및 이외의 모든 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다. 세포 배양액으로는 Dulbecco's Modified Essential Media(DMEM) 및 우태이혈청

(FBS), 페니실린-스트렙토마이신(PS)를 Gibco BRL.(USA)에서 구입하여 사용하였다.²¹

케라틴을 함유한 PLGA 필름제조. PLGA 0.3 g을 MC 6 mL에 용해시켜 5(w/v)%의 PLGA 용액을 준비한 후 각각 0, 10, 20, 그리고 50 wt%에 해당하는 0.03, 0.06, 그리고 0.15 g의 케라틴을 첨가하였다. 케라틴과 PLGA의 혼합용액(케라틴/PLGA)을 직경이 40 mm인 유리접시 표면에 도포한 후 실온에서 2~3일간 상온에서 건조시켰다.

SC의 분리 및 배양. SC의 배양법 중 손쉽게 안전하게 순수한 세포분리가 가능한 Morrissey의 방법을 이용하였다.²² 먼저 Fischer 쥐의 대퇴부에서 좌골신경을 분리하여 PBS로 여러 번 세척하고 상피를 벗겨낸 후 약 1 mm로 잘게 잘라 6 웰 플레이트에 옮겨주었다. 3일에 한 번씩 배양액을 교체하고 7일에 한 번씩 새로운 용기로 신경조직을 옮겨주면서 배양하였다. 이러한 방법으로 섬유아세포가 일차적으로 제거되면 신경조직을 건어 1.25 U/mL 디스파제(Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)와 0.05% 콜라게나아제를 넣고 인큐베이터에서 6~10시간 동안 방치한 후, 파스퇴르 피펫을 이용해서 신경의 기질을 제거하고 단일세포로 분리하였다. 이 과정에서 얻어낸 SC를 새로운 용기에 옮긴 후 섬유아세포의 수를 감소시키는 역할을 하는 포스포콜린(Sigma Chem. Co., USA)을 배양액에 2 μ M의 농도로 첨가하여 SC의 순도를 높였으며, 성장영양인자인 소뇌하수체 추출물(Gibco)을 20 μ g/mL의 농도로 첨가하여 SC의 증식을 높였다.²³

케라틴/PLGA 필름의 표면 분석. 케라틴/PLGA 필름의 케라틴 함량별 친수성을 확인하기 위해 증류수를 떨어뜨려 접촉각을 측정하였다. 물 접촉각 측정기(Tantec™, CAM-PLUS micro, USA)를 이용하여 각각의 필름에 5 μ L의 증류수를 떨어뜨려 시료의 표면과 물방울이 이루는 각도를 측정하였다.²⁴ 일반적으로 시료와 물방울이 이루는 각도가 클수록 소수성을 띠며 각도가 작을수록 친수성을 나타낸다. 각 시료에서 무작위로 영역을 선택하여 3회 분석을 실시한 후 평균값을 취하여 사용하였다. 또한, 시료의 시간별 물 흡수정도를 측정하기 위해 증류수를 떨어뜨리고 5분 및 10분 간격으로 접촉각을 측정하여 물 흡수성 정도를 확인하였다.

케라틴/PLGA 필름에서의 SC배양 및 증식. 앞서 분리한 SC를 1~2 회 계대 배양하여 세포를 대량배양한 후 트립신 처리를 하였다. 케라틴을 함유하지 않은 PLGA 필름을 대조군으로 하고 케라틴을 함량별로 함유한 케라틴/PLGA 필름에 SC를 각각 3×10^5 세포수/필름(필름의 면적; 약 12.57 cm²)의 농도로 파종한 다음 배양액을 공급하여 주고 37 °C의 세포 배양기에서 1, 3, 그리고 5일 동안 세포를 배양하였다. 각각의 날짜마다 배양액을 제거하고 PBS로 세척한 다음 트립신처리를 하고 원심분리 후 배양액 1 mL을 넣어 세포를 계수하여 케라틴 함량에 따른 세포 성장차이를 비교하였다.

SEM 관찰. 다양한 비율의 케라틴/PLGA 필름을 지름 1.5 cm로 잘라 세포 배양용 24-웰에 실리콘 튜브로 고정시켜 70% 알코올로 멸균하였다. 여기에 SC를 각각의 필름에 3.0×10^4 세포수/필름(필름의 면적; 약 1.54 cm²)의 농도로 파종하고 1, 3, 그리고 5일간 배양하였다. 이 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척한 다음 2.5% 글루타르알데하이드(Gibco)로 24시간 고정한 후 일련의 알코올을 이용하여 탈수 및 동결 건조하였다. 각 시료를 잘라 샘플폴더에 고정시킨 후 플라즈마 스퍼터(Emscope, Model SC500K, UK)를 이용하여 200 μ m

의 두께로 백금코팅하고 주사전자현미경(Hitachi Co., Model S-2250 N, Japan)을 이용하여 케라틴 함량에 따른 케라틴/PLGA 필름에서의 세포의 부착 거동 및 세포 형태를 관찰하였다.

RT-PCR. 케라틴/PLGA 필름에서 슈반세포의 표현형 유지를 확인하기 위해 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR)을 수행하였다. 케라틴이 다양하게 함유된 케라틴/PLGA 필름에 파종된 슈반세포의 mRNA를 확인하고자 케라틴/PLGA 필름을 지름 1.5 cm로 잘라 세포배양용 24-웰플레이트에 실리코놀로 고정시켜 70% 알코올로 멸균하였다. 그리고 1×10^5 cell/필름농도로 세포를 파종하여 1, 3, 그리고 5일간 배양하여 각 날짜에 RT-PCR을 실시하였다. 세포 배양 후 각 TRIzol(Invitrogen™, USA)을 처리하여 세포로부터 mRNA를 분리하고 Super Script™ II RT(Invitrogen™)를 사용하여 cDNA로 전사하였다. 이렇게 전사시킨 cDNA는 2유닛 Taq DNA 폴리머라제를 포함한 PCR 마스터키트(Roche, Germany)를 이용하여 각 프라이머(GAPH, NF, S100)를 신장시켜 원하는 DNA의 특정영역을 증폭시켰다. PCR 수행 후 증폭된 DNA를 1.2%(w/v) 아가로스 겔에 넣어 100 V에서 25분 동안 전기영동을 한 후, 상대적 발현을 SYBR 녹색형광(SYBR™ Green I Nucleic Acid Gel Stain, Cambrex, U.K)에 의해 시각화하였으며 자외선 투과조사기(Vilber Lourmat ETX-20.M, France)에 위치하여 관찰하였다.²⁵ 프라이머는 제노텍(Korea)으로부터 구입하였으며 프라이머의 염기서열은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. The Primer Sequences

| Species | Protein | Primer sequence |
|---------|---------|---|
| Rat | GAPDH | F : 5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3' R : 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' |
| Rat | NF | F : 5'-TGGAGAATGAGCTGAGAAGC-3' R : 5'-TTCGTAGCCTCAATGGTCTC-3' |
| Rat | NSE | F : 5'-GCTGCTGAAGGTCAACCAGATCGG-3' R : 5'-CCAGGAGAATGAGATGATGTTCC-3' |
| Rat | S100 | F : 5'-GACTCCAGCAGCAAAGGTGAC-3' R : 3'-CATCTTCGTCCAGCGTCTCCA-3' |

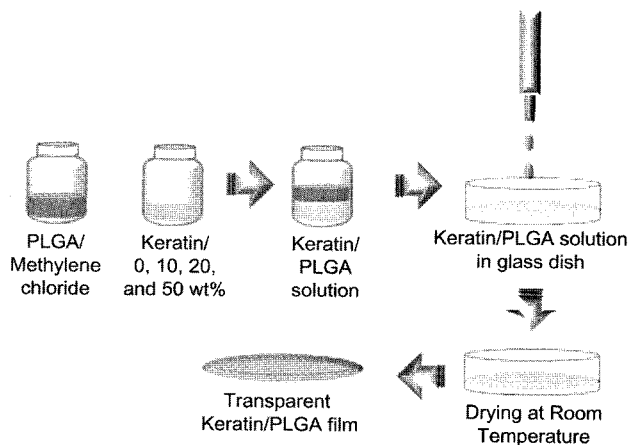


Figure 1. Schematic diagram illustration of the fabrication process of keratin/PLGA film.

결과 및 토론

케라틴을 함유한 PLGA 필름 제조. 케라틴이 함유된 PLGA 필름의 제조방식은 Figure 1에 나타내었다. PLGA 용액의 부피는 일정하게 고정하고 케라틴의 함량을 다르게 하였다. 제조된 각각의 케라틴/PLGA 필름은 갈색의 원형의 형태를 나타냈으며 케라틴의 함량이 높을수록 진갈색을 나타내었다. 표면은 덮개를 씌워 MC의 증발을

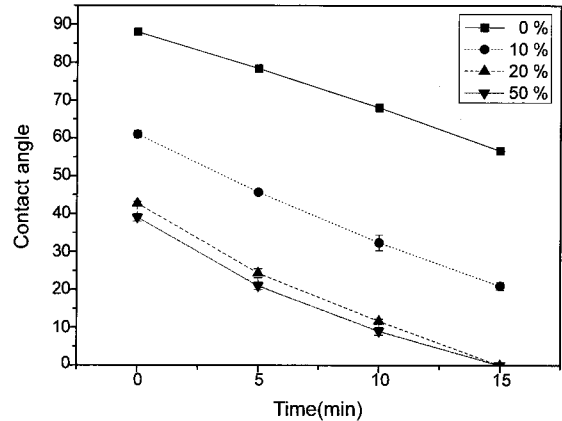


Figure 2. Water contact angle of the keratin/PLGA films.

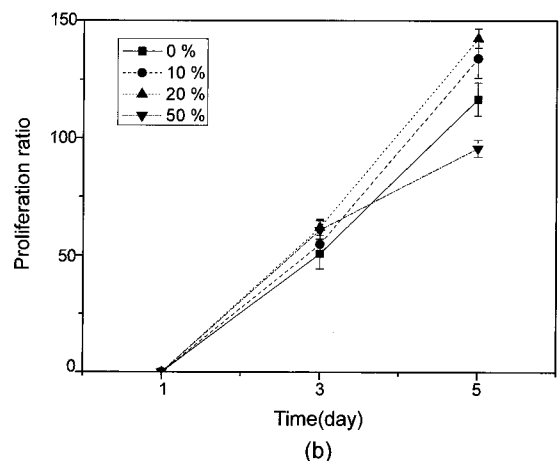
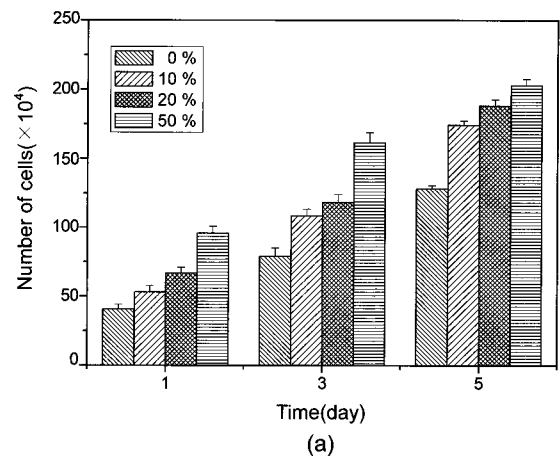


Figure 3. Schwann cells adhered on the keratin/PLGA film surfaces: (a) Number of cells; (b) proliferation ratio for 5 days.

적당히 조절하였으며 함량이 높을수록 거칠어지는 경향을 나타냈으며 유리면에 접촉한 부분은 균일하고 매끄러웠다. 필름 제조에 있어 사용된 유리 접시의 직경과 사용된 PLGA의 양에 따라서 두께를 조절할 수 있다.

케라틴/PLGA 필름의 친수성 평가. PLGA 필름과 케라틴함량에 따른 케라틴/PLGA 필름 표면의 친수성을 알아보기 위하여 접촉각 측정을 실시하였다. 시료와 물방울이 이루는 각도가 작을수록 친수성을 나타내며 평가결과는 Figure 2에 나타내었다. 측정 결과 케라틴 함량이 증가할수록 접촉각이 작고 물방울의 퍼짐이 좋았으며 초기접촉각

측정에서 20과 50% 케라틴/PLGA 필름이 다른 필름에 비하여 작은 접촉각을 보였다. 이러한 결과는 글루탐산, 알기닌, 시스틴 등의 친수성 아미노산으로 구성되어 있는 케라틴 자체가 PLGA와 혼합되어 필름의 친수성을 증가시킨 것이라 사료된다.

케라틴/PLGA 필름에서 슈반세포의 증식거동. 다양한 함유량의 케라틴 필름 표면에서 SC의 증식 정도를 1, 3, 그리고 5일 동안 세포계수를 통하여 확인하였고 그 결과를 Figure 3에 나타내었다. 증식률(%) = [(날짜별 세포 수 - 1 day의 세포 수) / 1 day의 세포 수] × 100 식에 대입함으로써 세포 증식률을 측정하였다. 세포 수 측정에서

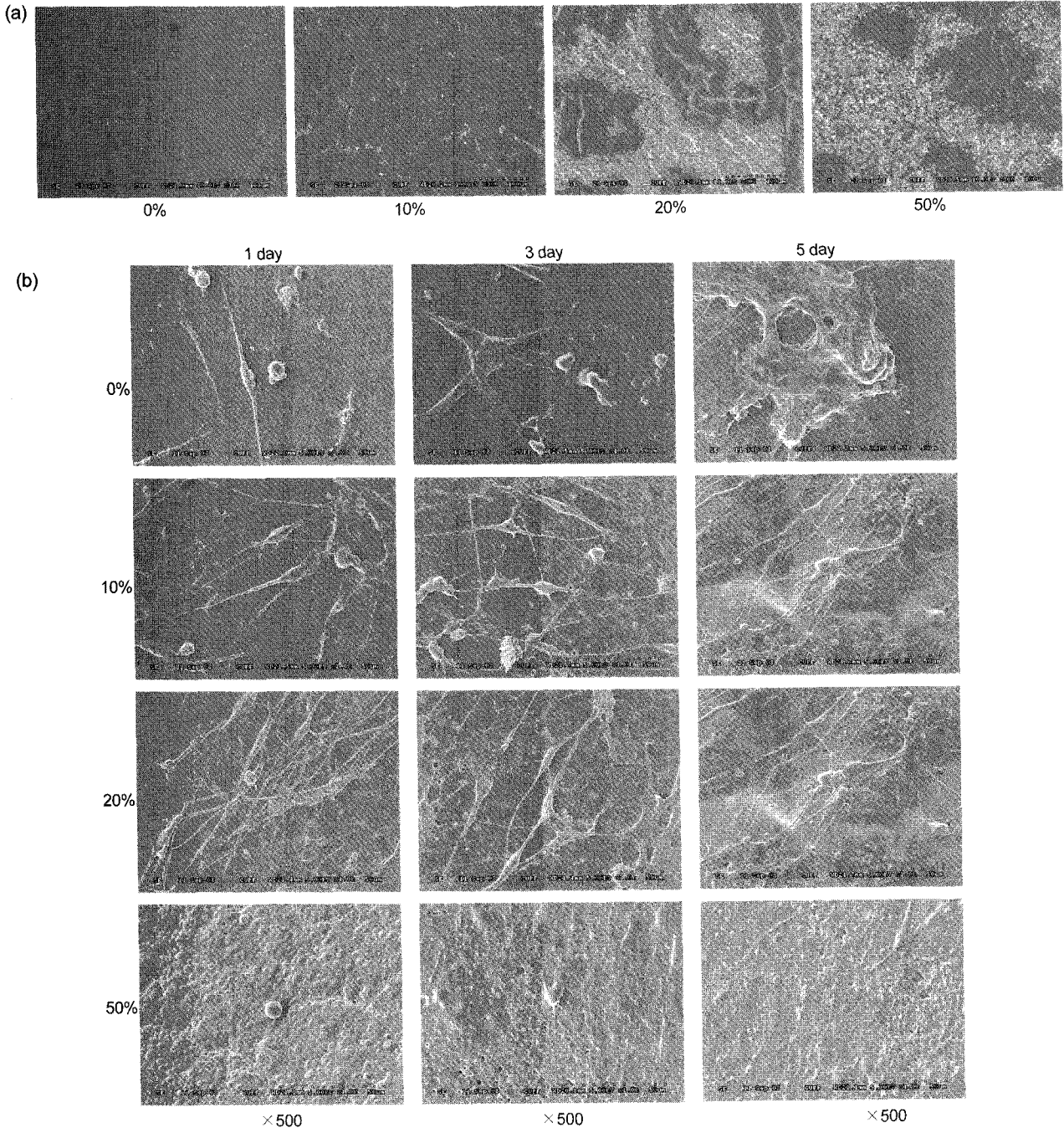


Figure 4. (a) SEM microphotographs of keratin/PLGA film surfaces; (b) Schwann cells morphology on the keratin/PLGA films for 1, 3, and 5 days, respectively.

케라틴 50%가 함유된 케라틴/PLGA 필름이 다른 실험군에 비해 1일째에 확연히 높은 세포 수를 보였고, 이후 모든 측정 날짜에서 다른 실험군 보다 세포수가 높게 나타났다. 그러나, 증식률 결과를 통하여 케라틴 10%와 20%가 함유된 필름에서는 5일 동안 지속적으로 세포의 증식률이 증가함을 확인한 반면 50%가 함유된 필름에서는 3일 이후로 증식률이 크게 증가하지 않음을 확인하였다. 결과적으로 케라틴을 함유한 케라틴/PLGA 필름은 PLGA 필름과 비교 시 높은 세포부착도와 지속적인 세포 증식률을 확인할 수 있었다.

SEM 관찰. 케라틴 함량에 따른 각 필름 표면에서 SC의 부착과 형태에 케라틴이 끼치는 영향을 알아보기 위하여 SEM분석을 실시하였으며 이를 Figure 4에 나타내었다. 케라틴 10, 20%가 함유된 필름에 부착된 SC에서 신경돌기가 잘 뻗어 나온 것을 확인할 수 있었으며 PLGA 필름과 케라틴 50 wt%가 함유된 필름에서는 신경돌기의 뻗음이 매우 미약하고 둥근형태의 세포만 관찰되었다. SEM을 통하여 케라틴이 세포의 부착형태에 영향을 끼침을 확인할 수 있었는데 이는 케라틴에 포함되어 있는 세포의 이동을 조절하는 미량의 분자와 세포의 부착, 자가 집결을 조절하는 많은 양의 단백질 기질이¹⁵ SC에 영향을 준 결과라 사료된다. 이로써 케라틴을 10, 20 wt%를 함유한 필름은 SC의 생존 환경에 도움을 주며, SC의 부착을 유도하여 세포의 이동 및 활발한 증식과 돌기의 뻗음 등, 본연의 형태를 유지하는데 도움을 주는 것으로 사료되며 과량의 함량(50 wt%)은 세포부착에는 도움을 주나 SC의 형태유지에는 부적절한 영향을 주는 것으로 사료된다.

유전자 발현. 케라틴이 함유된 필름이 SC의 표현형 유지에 미치는 영향을 mRNA 관점에서 확인하였다. SC 배양 후 1, 3, 그리고 5 일째에 RT-PCR을 통해 신경 세포에서 특이적으로 발현하는 단백질인 NF와 S-100의 mRNA 발현 정도를 확인하였고 이를 Figures 5 및 6으로 나타내었다. 1일째 모든 실험군에서 mRNA 발현은 큰 차이를 보이지 않았지만 3, 5일 제에서 케라틴 함량 10, 20 wt%의 필름에서 mRNA 발현이 높게 나타남을 확인하였다. 이에 반해 0,

50 wt%에서는 mRNA 발현정도가 시간이 지나면서 낮아짐을 보였다. RT-PCR을 통하여 케라틴 10, 20 wt%가 함유된 필름과 PLGA 필름 및 케라틴 50 wt% 필름을 비교 분석한 결과 10, 20 wt%의 케라틴을 첨가하면 케라틴 안에 포함되어 있는 세포의 행동을 조절하는 미량의 신호 분자가 SC의 표현형 유지에 도움을 주는 것으로 사료된다.¹⁵

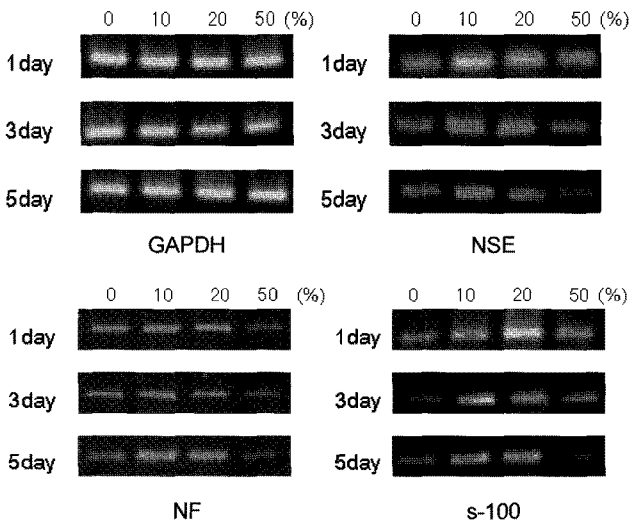


Figure 5. Effect of various keratin contents on the gene expression of Schwann cell-specific markers.

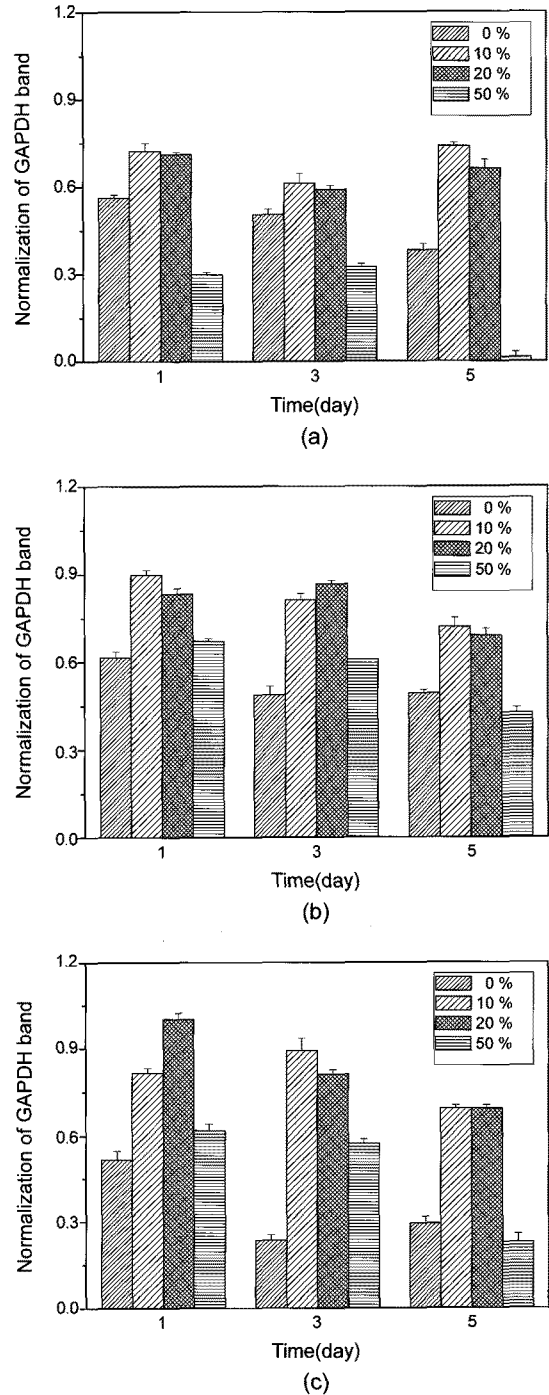


Figure 6. Relative gene expression level of NF, NSE, and s-100 normalized by that of GAPDH: (a) NF; (b) NSE; (c) s-100.

결론

본 연구에서는 세포의 행동을 조절하는 미량의 분자와 세포의 이동, 부착, 그리고 자가집결을 조절하는 많은 양의 단백질 기질을 포함하는 케라틴을 함량별(0, 10, 20, 그리고 50 wt%)로 함유하는 케라틴/PLGA 필름을 제조하여 SC를 배양한 후 세포의 증식 거동 및 표현형 유지를 관찰하였으며 SC의 증식과 표현형 유지에 적합한 케라틴의 함유량을 찾고자 하였다. 접촉각 측정 결과 PLGA 필름과 비교하여 케라틴 함유량이 증가할수록 낮은 접촉각을 보였으며 초기접촉각 측정에서 20과 50% 케라틴/PLGA 필름이 다른 필름에 비하여 작은 접촉각을 보였다. 이것은 세포의 부착 및 퍼짐에 좋은 결과를 예상할 수 있었고 세포 계수와 SEM 관찰을 통하여 그 결과를 확인할 수 있었다. 그러나, 50 wt%가 함유된 케라틴/PLGA 필름에서 3일 이후로 세포 증식률이 감소하였고 세포형태와 신경세포 단백질 마커의 발현 정도에서도 세포의 표현형 유지가 미약함을 확인하였다. 그러나, 케라틴 10, 20 wt%가 함유된 케라틴/PLGA 필름에서는 지속적인 세포 증식률과 신경세포의 뚜렷한 형태를 보였으며, NF, S-100의 높은 mRNA 발현을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 케라틴 10, 20 wt%가 함유된 케라틴/PLGA 필름은 SC 성장과 표현형 유지에 긍정적인 영향을 미침을 확인하였다. 현재 본 연구팀에서는 케라틴 0, 20 그리고 50 wt%가 함유된 다양한 함유량의 3차원 케라틴/PLGA 지지체 상에서 케라틴이 신경세포의 성장거동 및 표현형 유지에 미치는 영향과 골수간엽줄기세포의 신경세포화로의 분화에 미치는 영향에 관한 연구가 진행 중에 있다.

감사의 글: 본 연구는 세포응용사업단(SC4110) 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. N. Zhang, H. Yan, and X. Wen, *Brain Res. Rev.*, **49**, 48 (2005).
2. J. Palace, *J. Neurol. Sci.*, **265**, 21 (2008).
3. R. Jandial, I. Singec, V. J. Duenas, A. L. Ho, M. L. Levy, and E. Y. Snyder, *Inter. Congress Series*, **1302**, 154 (2007).
4. C. D. Mills, A. J. Allchorne, and R. S. Griffin, *Mol. Cell. Neurosci.*, **36**, 185 (2007).
5. M. Nissinen, H. Honkanen, O. Lahti, M. Kangas, J. Peltonen, and S. Peltonen, *Mol. Cell. Neurosci.*, **37**, 568 (2008).
6. T. Imaizumi, K. L. Lankford, and J. D. Kocsis, *Brain Research*, **854**, 70(2000).

7. B. Movaghara, T. Tiraihia, and S. A. Mesbah-Naminb, *Cell Biology International*, **30**, 569 (2006).
8. P. J. Kingham, D. F. Kalbermatten, D. Mahay, S. J. Armstrong, M. Wiberg, and G. Terenghi, *Experimental Neurology*, **207**, 267 (2007).
9. C. Salis, C. P. Setton, E. F. Soto, and J. M. Pasquini, *Experimental Neurology*, **207**, 85 (2007).
10. C. Miller, H. Shanks, A. Witt, G. Rutkowski, and S. Mallapragada, *Biomaterials*, **22**, 1263 (2001).
11. Y. H. An, H. Wan, and Z. S. Zhang, *Biomed. Environ. Sci.*, **16**, 90 (2003).
12. M. C. Dodla and R. V. Bellamkonda, *Biomaterials*, **29**, 33 (2008).
13. D.M Gilbert, *Med. Sci. Monit.*, **10**, 99 (2004).
14. M. Firouzi, P. Moshayedi, H. Saberi, H. Mobasheri, F. Abolhassani, I. Jahanzad, and M. Raza, *Neuroscience Letters*, **402**, 66 (2006).
15. P. Sierpinski, J. Garrettb, J. Mab, P. Apel, D. Klorig, T. Smith, L. A. Koman, A. Atala, and M. v. Dyke, *Biomaterials*, **29**, 118 (2008).
16. K. S. Stenn, S. M. Prouty, and M. Seiberg, *J. Dermatol. Sci.*, **7**, 109 (1994).
17. A. Tachibana, Y. Furuta, and H. Takeshima, *Biotechnology*, **93**, 165 (2002).
18. E. J. Kim, J. H. Song, M. S. Kim, J. M. Rhee, C. H. Han, G. Khang, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 41 (2004).
19. G. Khang, E. K. Jeon, and J. M. Rhee, *Macromol. Res.*, **11**, 334 (2003).
20. A. Y. Oh, S. H. Kim, M. S. Kim, S. J. Lee, J. J. Yoo, J. M. Rhee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **32**, 403 (2008).
21. W. Y. Jang, S. H. Kim, I. W. Lee, M. S. Kim, J. M. Rhee, G. Khang, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **2**, 100 (2005).
22. Y. H. An, H. Wan, Z. S. Zhang, and L. H. ZHU, *Biomed. Environ. Sci.*, **16**, 90 (2003).
23. M. E. Pannunzio, I. M. Jou, A. Long, T. C. Wind, G. Beck, and G. Balian, *J. Neurosci. Methods*, **149**, 74 (2005).
24. S. M. Kim, S. H. Kim, C. M. Kim, A. Y. Oh, M. S. Kim, G. Khang, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **4**, 179 (2007).
25. S. M. Kim, S. H. Kim, S. W. Park, A. Y. Oh, G. A. Kim, J. M. Rhee, and G. Khang, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **5**, 117 (2008).