

콘드로이틴 황산염을 결합한 I형 콜라겐지지체와 연골세포를 이용한 연골재생

임중재¹ · 손대구² · 손경희² · 양은경³ · 한기환²

듀오 성형외과¹, 계명대학교 의과대학 성형외과학교실², 바이오랜드³

Effect of cultured chondrocyte-seeded chondroitin-sulfate conjugated type I collagen scaffold on cartilage regeneration

Joong Jae Lim, M.D.¹, Daegu Son, M.D.², Kyounghee Sohn, M.D.², EunKyung Yang, Ph.D.³, Kihwan Han, M.D.²

¹Duo Plastic Surgery Clinic, Daegu, Korea,

²Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Keimyung University, Dongsan Medical Center, Daegu, Korea,

³Bioland, Chonan, Korea

Purpose: In this study, porous type I collagen scaffolds were cross-linked using dehydrothermal(DHT) treatment and/or 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide(EDC), in the presence and absence of chondroitin-6-sulfate(CS) and cultured autologous chondrocytes(Chondro) for cartilage regeneration.

Methods: Cartilage defects were created in the proximal part of the ear of New Zealand rabbits. Four prepared types of scaffolds(n=4) were inserted. The groups included Chondro-Collagen-DHT(Group 1), Chondro-Collagen-DHT-EDC(Group 2), Chondro-CS-Collagen-DHT(Group 3), and Chondro-CS-Collagen-DHT-EDC(Group 4). Histomorphometric analysis and cartilage-specific gene expression of the reconstructed tissues were evaluated 4, 8, and 12 weeks after implantation .

Results: EDC cross-linked groups 2 and 4 regenerated more cartilage than other groups. However, calcification was observed in the 4th week after implantation. CS did not increase chondrogenesis in all groups. Cartilage-specific type II collagen mRNA expression increased in the course of time in all groups.

Conclusion: EDC cross-linking methods maintain the scaffold and promote extracellular matrix production of chondrocytes.

Key Words: Collagen type I, Chondrocytes, Chondroitin sulfates

Received November 13, 2006

Revised April 11, 2007

Address Correspondence: Daegu Son, Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Keimyung University, Dongsan Medical Center, 194 Dongsan-dong, Jung-gu, Daegu 700-712, Korea, Tel: 053) 250-7636 / Fax: 053) 255-0632 / E-mail: handson@dsmc.or.kr

I. 서 론

조직공학(tissue engineering)은 최근 10년 사이에 급격하게 성장하고 있는 새로운 연구 분야이다. 인체에서 잃어버린 부분을 대체할 조직을 만들어낸다는 의미에서 보면 성형외과의 재건수술(reconstructive surgery)과 매우 연관성이 많은 분야이며 연구의 성과를 임상에 적용할 때는 서로 협력하여야 할 대상이기도 하다.

새로운 조직대체물을 만들어 내기 위해 반드시 필요한 세 가지의 기본 요소 중에 첫째는 물론 세포이다. 동종, 이 종 혹은 자가세포가 연구에 이용되고 있는데, 최근 배아줄기세포(embryonic stem cell)에 대한 연구성과가 보고되면서 새로운 가능성을 제시하고 있지만 윤리적인 측면에서의 논쟁으로 성체줄기세포(adult stem cell) 연구가 대안으로 떠오르고 있다. 이외에 성장인자(growth factor)와 지지체(scaffold)가 나머지 요소들로 조직공학은 이를 모든 요소를 반드시 필요로 한다.

연골은 비교적 간단한 조직이지만 인체에서 독특한 기능을 수행하고 있다. 조직이나 기관을 보호하거나 뼈 사이에서 관절을 형성하며, 골형성의 형판으로도 작용한다. 또한, 형태를 유지하면서도 동적인 요구가 동시에 필요한 귀나 코에 존재하여 기능적이고 개성적인 모양을 나타낸다. 외상이나 노화 등으로 연골이 파괴된 경우에 연골은 스스로 복구하고 재생하는 능력이 본질적으로 떨어져 있기 때문에 흉터로 낫게 되고 결과적으로 그 형태와 기능을 잃게 된다. 이러한 경우 최상의 치료는 어떠한 방법으로든 파괴된 연골이 다시 재생되도록 하든지 아니면 같은 연골조직을 인체의 다른 부위로부터 채취하여 이식하여야만 그나마 기능적인 재건이 가능하다. 그렇기 때문에 연골조직공학(cartilage tissue engineering)은 정형외과 영역뿐만 아니라 성형외과 영역에서도 아주 긴요하다.

저자들은 천연고분자 지지체로 연골의 세포외기질의 대부분을 구성하고 있는 구조적 생물질(structural biomaterial)인 콜라겐지지체와 연골막을 이용한 연골재생 연구에서 콘드로이틴 황산염(chondroitin-6-sulfate; CS)의 추가는 연골생성에 큰 영향을 미치지 않았고 물리적 가교처리

만한 군에서 더 많은 연골이 생성된 것을 확인한 바 있다.¹ 본 연구의 목적은 배양한 자가 귀연골세포를 물리, 화학적으로 가교 처리한 콘드로이틴 황산염 콜라겐지지체에 추가로 접종하였을 때 연골재생이 더 잘 이루어지는지를 조직학적 및 분자생물학적 방법으로 분석하는 것이다.

II. 재료 및 방법

가. I형 콜라겐지지체의 제작과 물리적 및 화학적 가교 처리

I형 콜라겐지지체는 송아지의 피부에서 추출한 정제된 0.5% atelo-collagen을 원료로 제작하였다. 이 원료에 콜라겐 건조중량의 10%에 해당하는 양의 1% CS를 첨가한 다음, 4°C에서 5분간 1500 rpm으로 교반한 후 -80°C의 저온 냉동고에서 12시간이상 동결시킨 후에 동결건조기를 이용해 48시간이상 건조시켜 지지체를 제작하였다.

물리적 가교는 동결 건조된 콜라겐지지체를 110°C 진공 오븐에서 72시간동안 dehydrothermal(DHT) 처리하여 실시하였다. 화학적 가교는 DHT 처리가 끝난 절편을 실온에서 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide(EDC) 용액에 4시간동안 넣어 처리한 다음, 0.1 M Na₂HPO₄용액으로 1시간동안 씻은 후 정제수로 습윤 시켰다. 이후에 한 차례 더 -80°C의 저온냉동고에서 12시간이상 동결시킨 후에 동결건조기를 이용해 48시간이상 건조시켜 제작하였다.

나. 동물실험

1) 연골채취 및 연골세포배양

실험동물로는 체중이 2,000 - 3,500 g 사이의 백색 미성숙가토(young female New Zealand white rabbit) 13마리를 대상으로 하였다. 연골은 항상 왼쪽 귀의 근위부에서 채취하였는데, 채취할 곳의 약간 외측에서 전면의 피부에 15번 칼로써 연골에는 손상을 가하지 않도록 조심하면서 연골막까지 절개하고 연골막하부(subperichondrium)로 골막기자를 이용하여 일으켜 연골을 노출시켰다. 직경 6 mm의 천공기(punch)로 후면의 연골막이 손상되지 않도록 연골에만 천공한 후 골막기자로 후면의 연골막을 분리하여 연골을 채취하여 연골막이 잘 보존되도록 하였다.

2) 연골세포-지지체 복합체 형성

연골막이 제거된 연골을 항생제가 포함된 완충액(phosphate buffer saline)으로 세척한 후 잘게 썰어 collagenase type II가 2 mg/ml의 농도로 포함된 DMEM 10 ml에 넣어 진탕하면서 37°C의 수조에서 8시간 이상 조직분해를 시행하였다. 세포부유액을 400 μm² 나일론 망사로 걸러서 작은 연골 덩어리들을 제거하고 완충용액으로 2회 세척하-

Table I. Component of Chondrocytes Culture Media

| Components | Amounts |
|---|---------|
| DMEM(Dulbecco's modified Eagle's media) | 850 mL |
| FBS(Fetal bovine serum) | 150 mL |
| Sodium bicarbonate | 2.4 g |
| Antibiotics | 10 mL |
| Nonessential amino acid | 5 mL |
| Proline | 0.046 g |
| Ascorbic acid | 0.05 g |
| Chondrogenic media | 1 L |

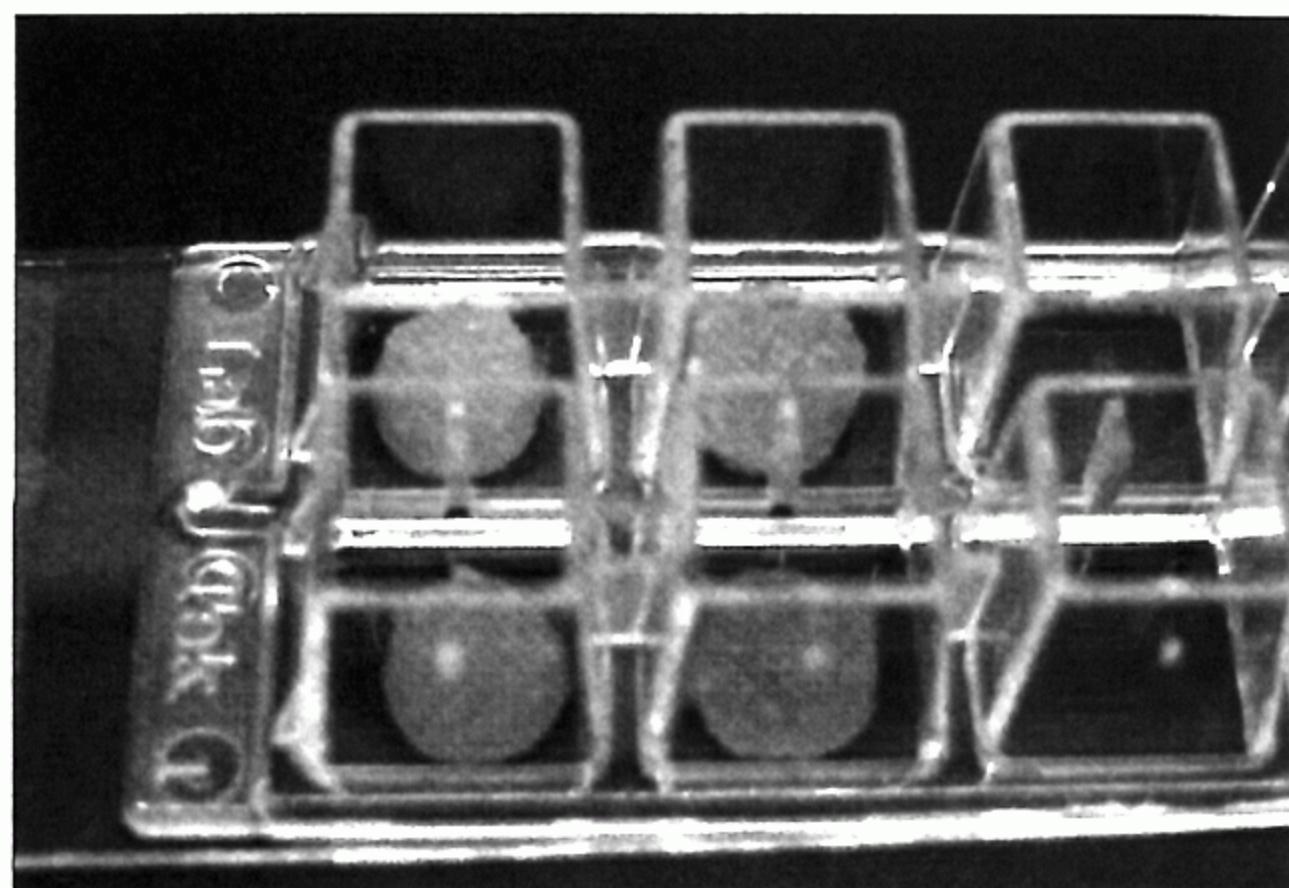


Fig. 1. Chondrocyte-collagen scaffold complex.

였다. 채취한 연골세포를 10,000/cm² 세포밀도로 배양접시에 뿌려 일차 배양하였고, 15% 태우혈청(fetal bovine serum)이 첨가된 연골배양액을 이용하여 3-4일 마다 교환했으며(Table I), 세포유착이 일어날 정도로 증식이 되면 Trypsin-EDTA로 처리하여 세포를 분리하여 3차례 계대배양 하였다(Fig. 1). 배양한 연골세포를 10⁴개/μL의 농도로 각각의 지지체에 주입하여 37°C 배양기에서 24시간 배양한 후 결손부위에 이식하였다.

3) 복합체 이식

왼쪽 귀에서 채취하여 준비한 연골세포-지지체 복합체가 준비되었을 때 오른쪽 귀에서 같은 방법으로 수술하여 동일한 4개의 연골결손을 만든 후 위에서 미리 준비한 복합체를 이식하였다.

실험동물은 4군으로 나누었고 각 군당 4개의 복합체(n=4)를 이식하였다. 모든 군에서 연골세포를 파종하였으며; 1군은 물리적 가교 처리한 콜라겐지지체(Chondro-Collagen-DHT), 2군은 물리적 가교에 화학적 가교를 추가

Table II. Summary of Comparative Groups

| Group | Cross-linking | Chondroitin-6-sulfate | Chondrocytes |
|----------------------------|---------------|-----------------------|--------------|
| 1군 Chondro-Collagen-DHT | DHT | - | Chondrocytes |
| 2군 Chondro-Collagen-EDC | DHT & EDC | - | Chondrocytes |
| 3군 Chondro-CS-Collagen-DHT | DHT | CS | Chondrocytes |
| 4군 Chondro-CS-Collagen-EDC | DHT & EDC | CS | Chondrocytes |

DHT, dehydrothermal; EDC, 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide; CS, chondroitin-6-sulfate; Chondro, Chondrocytes.

한 콜라겐지지체(Chondro-Collagen-EDC), 3군은 물리적 가교 처리한 콘드로이틴 황산염 콜라겐지지체(Chondro-CS-Collagen-DHT) 그리고 4군은 물리적 가교에 화학적 가교를 추가한 콘드로이틴 황산염 콜라겐지지체(Chondro-CS-Collagen-EDC)를 이식하였다(Table II). 창상감염을 방지하기 위해 수술 당일, 술후 5일 간격으로 항생제(ceftazol sodium) 15 mg/kg을 둔부에 주사하였다. 실험동물들은 각각 이식 4주, 8주, 그리고 12주에 안락사 시킨 다음 조직을 생검하여 관찰하였다.

다. 동물실험의 조직학적 관찰

술후 4주, 8주, 12주일에 조직학적 관찰을 위하여 생검한 조직은 헤마톡실린-에오신염색(hematoxylin and eosin stain) 및 알시안 블루염색(alcian blue stain)을 한 다음, Axiovert 200 Microscope(Carl Zeiss, Gottingen, Germany)으로 연골생성 정도를 관찰하였다. 각 주당 실험군마다 4개씩의 조직을 얻어 2개는 조직학적 관찰($n=2$)을 위하여, 2개는 RNA($n=2$)를 분석하기 위하여 사용하였다.

라. 생성된 연골의 정량분석(Quantitative histomorphometric analysis)

생검조직 1개당 3개의 횡절편(longitudinal section)을 선택하여 연골이 생성된 면적을 Zeiss Axiovert 200 Microscope과 연결된 AxioVision Rel. 4.3 image software로 측정하여 분석하였다. 통계처리는 Mann-Whitney U test로, 통계적 유의수준은 p 값이 0.05 미만으로 하였다. 자료처리는 통계처리전문프로그램인 SPSS(statistical package for the social science) WIN 12.0을 사용하였다.

마. 연골세포의 type I 및 type II collagen의 mRNA의 발현 정도 측정

1) RNA 분리와 역전사 반응(transcriptase reaction)

지지체내로 자라 들어온 연골세포의 type I과 type II collagen의 생성정도를 분석하기 위해 술후 4, 8, 12주에 이식된 지지체만을 연골막과 함께 천공하여 채취하였다.

채취한 조직을 TRI Reagent(Sigma Chemiacl Co., St. Louis, Mo, U.S.A.)에서 homogenizer로 분쇄한 후 총 RNA를 분리하고 First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas, V. Graiciuno, Lithuania)를 이용하여 cDNA를 합성하였다.

2) 증합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)
증합효소 연쇄반응에 사용된 collagen type I, II 그리고, 내부 대조군 유전자인 glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)의 sense primer와 antisense primer에 대한 primer sequences는 손대구 등¹의 논문에서 기술한 방법과 동일한 방법으로 시행하였으며, 내부대조유전자인 GAPDH의 PCR product를 기준으로 하여, collagen type I, II의 생성정도를 상대적으로 비교, 분석하였다.

III. 결 과

가. 조직학적 관찰

술후 4주에 모든 군에서 가장자리에서부터 연골이 재생되기 시작하였는데, 3군(Chondro-CS-Collagen-DHT)과 4군(Chondro-CS-Collagen-EDC)에서 우수하였다. 1군과 2, 3군에서 4주에 골화가 관찰되었다. 물리적 가교한 지지체에 화학적 가교처리를 추가한 4군(Chondro-CS-Collagen-EDC)에서는 지지체가 많이 남아 있었다(Fig. 2). 술후 8주에 2군(Chondro-Collagen-EDC)과 4군(Chondro-CS-Collagen-EDC)에서 연골재생이 많았고, 골화는 1, 3군에서 많이 관찰되었다. 4군에는 아직까지 지지체가 많이 남아있었다(Fig. 3). 12주에 2군과 4군에서 연골생성이 많았고, 1군과 2군에서 골화가 더 많이 진행되었다. 2군과 4군에서는 아직도 지지체가 남아 있었는데 4군에서 가장 잘 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

나. 재생된 연골의 정량분석

술후 4주에 3군에서 1군($p=0.009$), 2군($p=0.009$)에 비해서, 4군에서 1군($p=0.009$), 2군($p=0.028$)에 비해서 연골생성이 많았고, 8주에는 2군이 1군($p=0.009$), 3군($p=0.009$)에 비

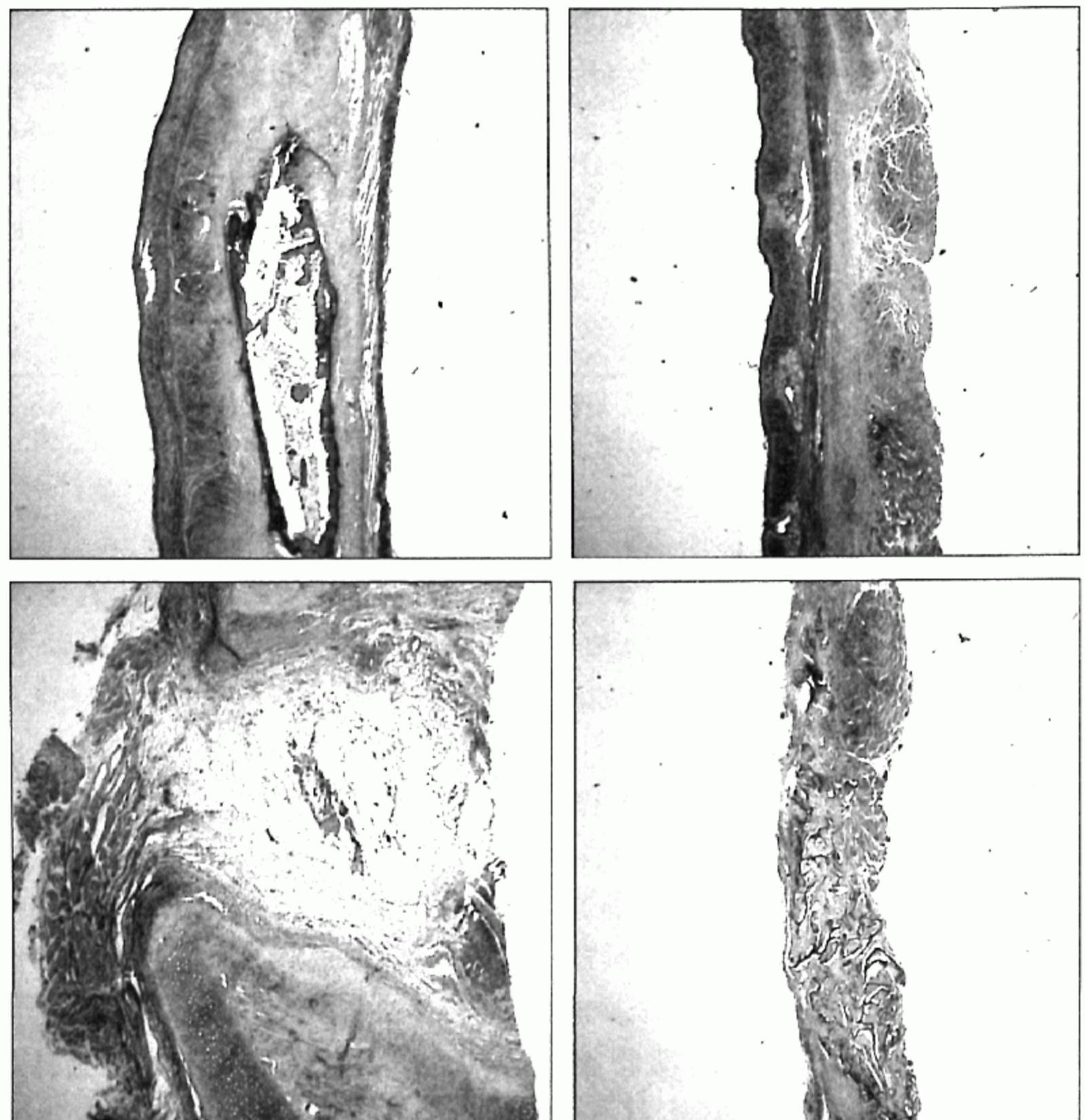


Fig. 2. Histological sagittal sections of Chondro-Collagen-DHT group (Above, left), Chondro-Collagen-EDC group (Above, right) and Chondro-CS-Collagen-DHT group (Below, right) and coronal section of Chondro-CS-Collagen-DHT (Below, left) from the center of implant at 4 weeks (H&E, $\times 40$). Note that in the Chondro-CS-Collagen-DHT group (Below, left) and Chondro-CS-Collagen-EDC group (Below, right) more cartilaginous tissue has been formed in the peripheral area of the scaffold. Chondro, Chondrocyte; DHT, dehydrothermal; EDC, 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide; CS, chondroitin-6-sulfate.

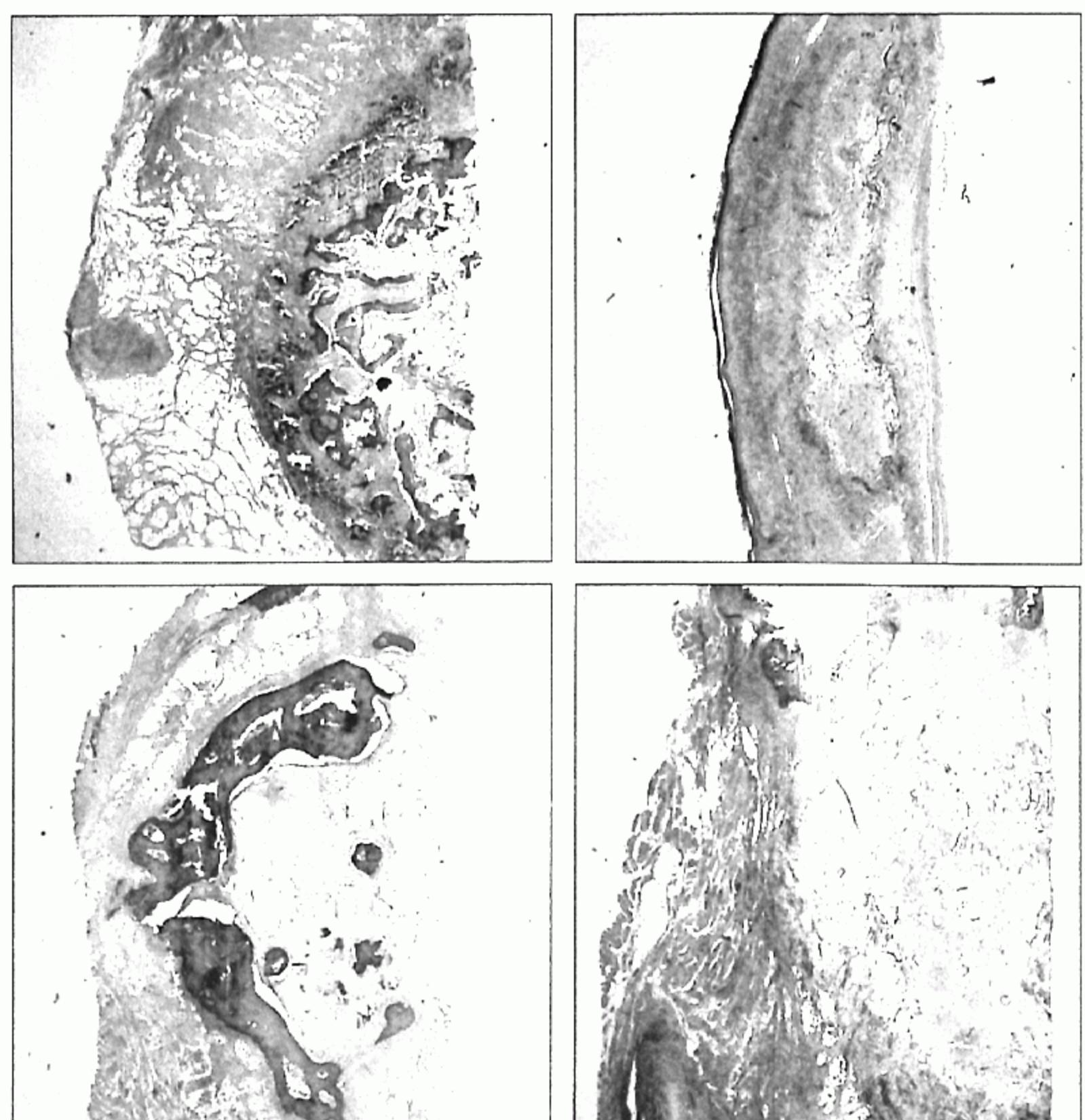


Fig. 3. Histological coronal sections of Chondro-Collagen-DHT group (Above, left), Chondro-CS-Collagen-DHT (Below, left) and Chondro-CS-Collagen-EDC group (Below, right) and sagittal section of Chondro-Collagen-EDC group (Above, right) from the center of implant at 8 weeks (H&E, $\times 40$). Chondro-Collagen-EDC group (Above, right) and Chondro-CS-Collagen-EDC group (Below, right) showed cartilage regeneration in the whole area of the scaffolds. In the Chondro-Collagen-DHT group (Above, left) and Chondro-CS-Collagen-DHT group (Below, left) showed more calcification than other groups. Chondro, Chondrocyte; DHT, dehydrothermal; EDC, 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide; CS, chondroitin-6-sulfate.

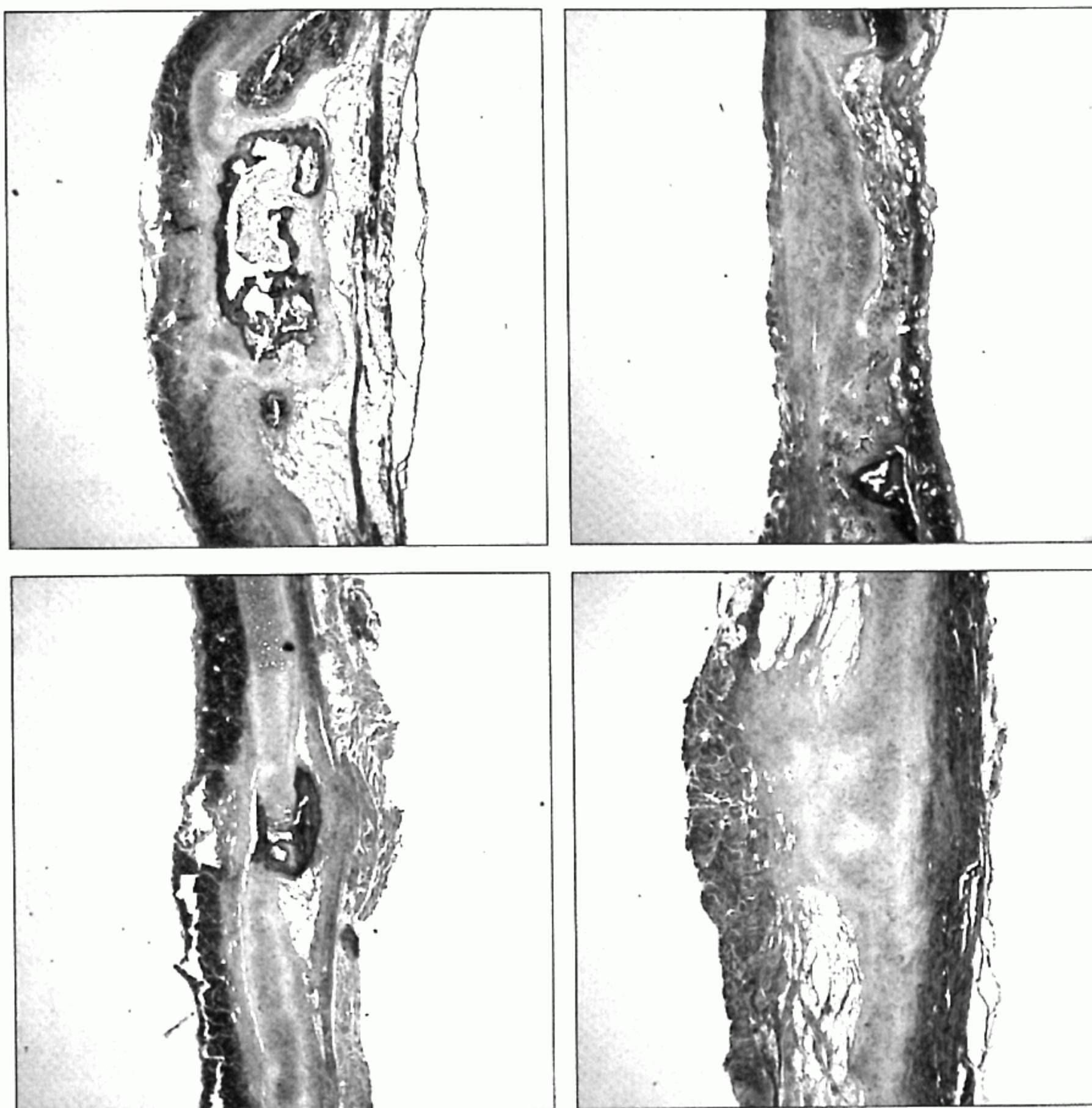


Fig. 4. (Above, left) Histological sagittal sections of Chondro-Collagen-DHT group, (Above, right) Chondro-Collagen-EDC group, (Below, left) Chondro-CS-Collagen-DHT and (Below, right) Chondro-CS-Collagen-EDC groups from the center of implant in the 12th week (H&E, $\times 40$). (Above, left) Chondro-Collagen-DHT group and (Above, right) Chondro-Collagen-EDC group showed progression of calcification. Chondro, Chondrocyte: DHT, dehydrothermal; EDC, 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide; CS, chondroitin-6-sulfate.

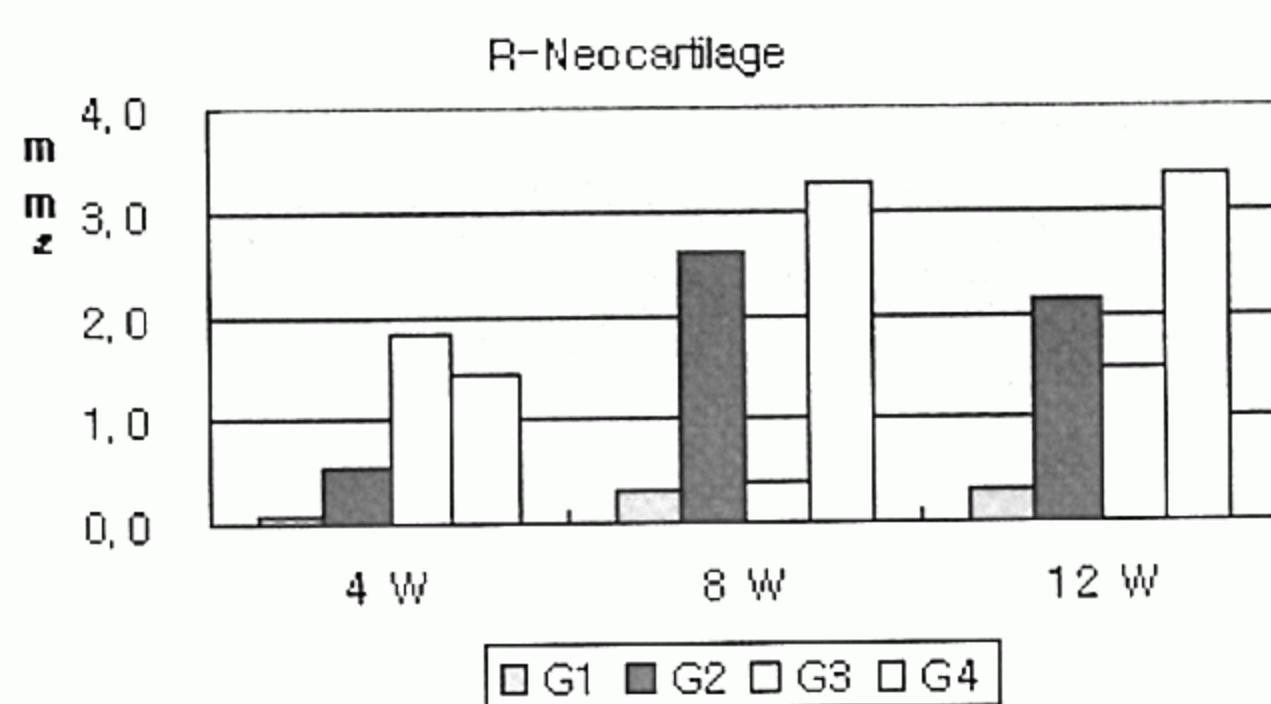


Fig. 5. Histomorphometric analysis of regenerated cartilage showed more cartilage regeneration in DHT and EDC groups.

해서, 4군이 1군($p=0.009$), 3군($p=0.009$)에 비해서 연골생성이 많았다. 12주에는 2, 3군이 1군($p=0.009$)에 비해서, 4군이 1군($p=0.009$), 2군($p=0.009$), 3군($p=0.009$)에 비해서 연골생성면적이 많았다. 즉, 물리적 가교에 화학적 가교처리를 추가한 군에서 더 많은 연골이 생성되었다(Fig. 5).

다. 연골세포의 type I형 및 type II collagen의 mRNA 발현 정도

1, 2, 3, 4군에서 4, 8, 12주 후 내부대조유전자인 GAPDH를 기준으로 한 type I, II collagen의 생성정도는 type I collagen의 mRNA발현은 시간이 경과함에 따라 발현되는 양이 전체적으로 감소하였다. 그러나 type II collagen의 경우 4주에서 8주로 가면서 모든 군에서 증가하였는데, 12주에는 4군(Chondro-CS-Collagen-EDC)을 제외하고 모두 감소하였다(Fig. 6).

IV. 고 칠

최근 미리 배양한 자가연골을 관절연골 결손에 이식하는 방법이 새로운 수술기법으로 소개되면서 임상적으로도 받아들여질 만한 수술로 간주되고 있다.^{2,3} 이러한 이유로 여러 가지의 천연과 합성고분자 물질들이 연골재생의 지지체로 연구되었는데, 합성고분자 물질로는 PLA,⁴ PGA,⁵ PLGA⁶ 등이, 천연고분자 지지체로는 hydrogel,⁷ alginate,⁸

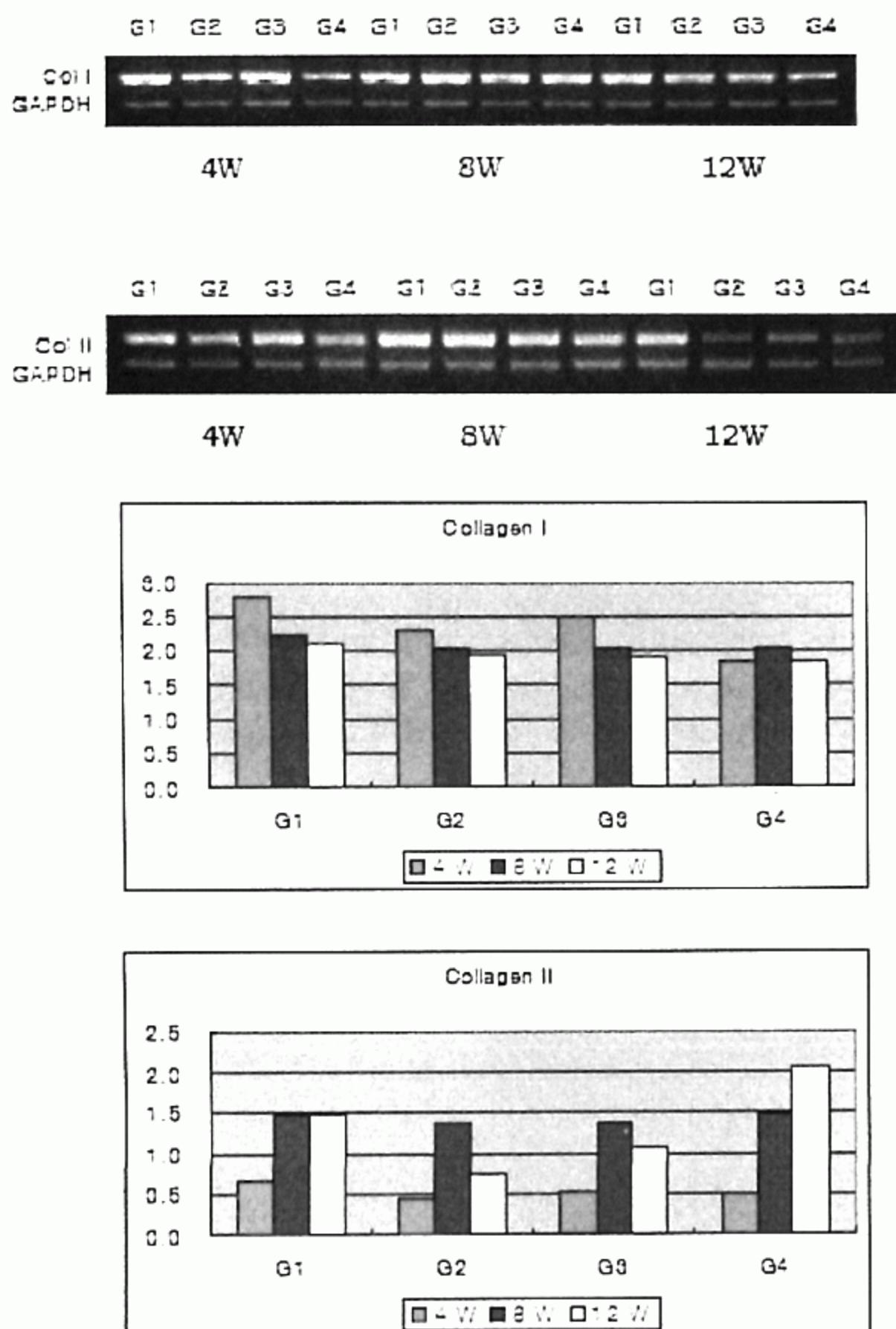


Fig. 6. RT-PCR profile of mRNA for GAPDH and type I and II collagen showed increasing over time in all groups except Chondro-CS-Collagen-EDC group in contrast to that of type I collagen, which was decreasing.

hyaluronic acid,⁹ collagen^{10,11} 등이 연골세포의 운반체로 적합한 것으로 연구되었다.

콜라겐의 순도나 지지체의 구조적인 면 외에 화학적인 방법으로 GAG를 부착하거나 가교처리를 하는 것이 세포와 조직의 재형성에 큰 영향을 주는 것으로 알려져 있다.¹² 왜냐하면 지지체는 세포가 자라 들어와 충분한 세포외기질을 만들기 전까지는 흡수되어 붕괴되지 않아야 제 역할을 할 수 있기 때문이다. 물리적 가교처리가 콜라겐지지체의 안정에 결정적인 역할을 하지는 않는다고 한다. 그러나 콜라겐지지체에 콘드로이틴 황산염을 결합하고 물리적 가교와 화학적 가교를 같이 하였을 경우에는 지지체의 표면은 다소 찌그러지만 장력이 증가하고 단백질 분해효소에 의한 붕괴가 감소한다고 한다.¹³ 이번 연구에서 물리적 가교에 화학적 가교처리를 추가하였던 2군과 4군에서 상대적으로 연골이 많이 생성되었다. 그 이유는 이미 파종한 연골세포가 충분히 세포외기질을 만들기까지 지지체가 흡수되지 않고 잘 유지되었기 때문으로 판단하였다(Fig. 5). 일반적으로, 콜라겐에 GAG를 부착하여 collagen-GAG

복합체를 만드는 방법은 낮은 산도(pH)에서 두 물질을 침전시키는 것이다. 이어서 물리적 가교와 화학적 가교처리를 추가함으로써 GAG가 공유결합으로 고정되게 된다. GAG인 CS는 물결합력을 증가시켜 장력을 떨어뜨려 지지체의 구조가 개방되도록 하여 조직의 재형성에 도움을 줄 것으로 생각하지만, 지지체의 형태와 붕괴에는 관계가 없다.¹² 또한 CS는 파종한 연골세포의 증식과 총 proteoglycan의 양을 증가시키고 연골세포의 표현형을 지키는 역할을 한다.¹³ 그러나 이 연구에서는 CS의 유무와 연골생성의 정도와는 관계가 없는 것으로 나타났다.

연골세포를 단층(monolayer)의 환경에서 배양하면 곧 원래의 표현형을 잃어버리게 되기 때문에¹⁴ 3차원 지지체에서 배양하여야 세포가 성장하고, 표현형을 유지하며, 특정한 기질을 축적할 수 있음이 여러 학자들에 의하여 연구되었다.¹⁵ 이번 연구에서 연골세포를 지지체에 파종하였을 때, 파종하지 않고 실험하였던 앞의 실험에서와 동일하게 CS의 추가는 연골생성에 큰 영향을 미치지 않았지만, 전체적으로 더 많은 연골이 생성되었고, collagen type II mRNA의 발현이 시간이 지날수록 증가하였던 것으로 미루어 보아 8주까지는 표현형을 잘 유지하고 있는 것으로 생각된다(Fig. 6). 그러나 연골세포를 파종한 이번 실험의 경우 연골은 많이 만들어 졌지만, 4주부터 일찍 골화가 시작되었다. 이것은 파종한 연골세포가 토끼귀의 연골에서 유래한, 다시 말하면 이미 분화가 많이 진행된 세포이기 때문에 일찍 노화되었기 때문에 추측하였다.

앞의 실험¹과 비교하여 고찰하여 보면, 연골세포를 파종하지 않았을 때는 물리적 가교처리만한 군에서 더 많은 연골이 생성되었지만 연골세포를 추가한 이번 실험에서는 물리적 가교에 화학적 가교 처리를 추가한 지지체에서 상대적으로 더 많은 연골이 생성되었다. 이는 연골을 파종하지 않았을 때는 연골막에서 분화한 연골세포가 지지체 내로 잘 자라들어 갈 수 있도록 지지체가 찌그러지지 않고 개방되어 있는 것이 중요하며, 파종을 추가하였던 이번의 실험에서는 연골세포가 연골을 생성할 수 있도록 지지체가 견고하게 오래 유지되는 것이 더 중요한 요소로 생각되었다.

V. 결 론

CS의 추가는 연골생성에 큰 영향을 미치지 않았다. 물리적 가교에 화학적 가교처리를 추가한 군에서 연골생성이 많았다. 지지체에 CS와 화학적 가교를 추가한 군에서는 12주에도 지지체가 많이 남아있었다.

결론적으로, type I atelo-collagen의 가교처리 방법과 연골세포의 접종이 연골생성에 영향을 주며, 연골세포를 추가할 경우 연골생성은 많이 되지만 골화가 빨리 시작하는

경향이 있어, 연골세포의 노화를 방지하는 연구가 앞으로 더 필요할 것으로 생각한다.

REFERENCES

- Son DG, Lim JJ, Sohn KH, Yang EK: The effect of various methods of cross-linking in type I collagen scaffold on cartilage regeneration. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 33: 723, 2006
- Breinan H, Minas T, Hsu HP, Nehrer S, Sledge CB, Spector M: Effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model. *J Bone Jt Surg* 79-A: 1439, 1997
- Lee CR, Grodzinsky AJ, Hsu HP, Spector M: Effects of a cultured autologous chondrocyte-seeded type II collagen scaffold on the healing of a chondral defect in a canine model. *J Orthopaedic Research* 21: 272, 2003
- Freed LE, Hollander AP, Martin I, Barry JR, Langer R, Vunjak-Novakovic G: Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system. *Exp Cell Res* 240: 58, 1998
- Kim WS, Vacanti JP, Cima L, Mooney D, Upton J, Puelacher WC, Vacanti CA: Cartilage engineered in predetermined shapes employing cell transplantation on synthetic biodegradable polymers. *Plast Reconstr Surg* 94: 233, 1994
- Rhie JW, Ahn TJ, Park JG, Sohn JY, Cho HS, Lim P: Culture of chondrocytes on scaffolds with different pore network of PLGA and PLLA. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 30: 237, 2003
- van Susante JL, Buma P, Schuman L, Homminga GN, van den Berg WB, Veth RP: Resurfacing potential of heterologous chondrocytes suspended in fibrin glue in large full-thickness defects of femoral articular cartilage: an experimental study in the goat. *Biomaterials* 20: 1167, 1999
- Hauselmann HJ, Masuda K, Hunziker EB, Neidhart M, Mok SS, Michel BA, Thonar EJ: Adult human chondrocytes cultured in alginate from a matrix similar to native human articular cartilage. *Am J Physiol* 271: C742, 1996
- Aigner J, Tegeler J, Hutzler P, Campoccia D, Pavesio A, Hammer C, Kastenbauer E, Naumann A: Cartilage tissue engineering with novel nonwoven structured biomaterial based on hyaluronic acid benzyl ester. *J Biomed Mater Res* 42: 172, 1998
- Chvapil M, Kronenthal L, van Winkle W: Medical and surgical applications of collagen. *Int Rev Connect Tissue Res* 6: 1, 1973
- Pachence JM: Collagen-based devices for soft tissue repair. *J Biomed Mater Res* 33: 35, 1996
- Pieper JS, Oosterhof A, Dijkstra PJ, Veerkamp JH, van Kuppevel TH: Preparation and characterization of porous crosslinked collagenous matrices containing bioavailable chondroitin sulphate. *Biomaterials* 20: 847, 1999
- van Susante JL, Pieper J, Buma P, van Kuppevel TH, van Beuningen H, van Der Kraan PM, Veerkamp JH, van den Berg WB, Veth RPH: Linkage of chondroitin-Sulfate to type I collagen scaffolds stimulates the bioactivity of seeded chondrocytes *in vitro*. *Biomaterials* 22: 2359, 2001
- Honorati MC, Cattini L, Facchini A: IL-17, IL1-beta and TNFalfa stimulate VEGF production by dedifferentiated chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 12: 683, 2004
- Grigolo B, Roseti L, Fiorini M, Fini M, Giavaresi G, Aldini NN, Giardino R, Facchini A: Transplantation of chondrocytes seeded on a hyaluronan derivative (Hyaff®-11) into cartilage defects in rabbits. *Biomaterials* 22: 2417, 2001