

쉬프 염기 가교 산화 젤란검/실크 피브로인 주사형 하이드로젤을 통한 TGF- β 3 지속 전달 및 연골 재생

박선재^{*,#} · 이소윤^{*,#} · 신호수^{*} · 김나경^{*} · 강길선^{*,**,*†} 

^{*}전북대학교 바이오토포융합공학과, ^{**}전북대학교 고분자나노공학과
(2026년 2월 10일 접수, 2026년 4월 11일 수정, 2026년 4월 13일 채택)

Sustained TGF- β 3 Delivery and Cartilage Regeneration via Schiff Base-Crosslinked Oxidized Gellan Gum/Silk Fibroin Injectable Hydrogel

Sunjae Park^{*,#}, Sooyoon Lee^{*,#}, Hosoo Shin^{*}, Nakyung Kim^{*}, and Gilson Khang^{*,**,*†} 

^{*}Department of Bionanotechnology and Bio-Convergence Engineering, Jeonbuk National University,
567 Baekje-daero, Deokjin-gu, Jeonju-si, Jeollabuk-do 54896, Korea

^{**}Department of Polymer Nano Science & Technology, Jeonbuk National University,
567 Baekje-daero, Deokjin-gu, Jeonju-si, Jeollabuk-do 54896, Korea

(Received February 10, 2026; Revised April 11, 2026; Accepted April 13, 2026)

초록: 고령화로 골관절염 유병률이 증가함에 따라 재생에 한계가 있는 관절연골을 재생시킬 수 있는 조직공학적인 전략의 필요성이 대두되고 있다. 본 연구에서는 산화젤란검(OGG)과 실크피브로인(SF)을 쉬프 염기 반응으로 가교한 TGF- β 3 함유 하이드로젤을 개발하였다. 물리화학적 특성 분석을 통해 가교 형성과 다공성 구조를 확인하였으며 SF의 함량 증가에 따라 졸 분율 감소, 팽윤비 저하 및 압축강도의 향상(8.2→23.5 kPa)을 확인하였다. OGS0.5% 하이드로젤 군은 TGF- β 3의 자유 용액 상태 대비 초기 burst release를 효과적으로 조절하고 초기 방출을 억제하고 28일 이상 방출을 유도하여 인간 골수 유래 중간엽줄기세포의 증식 및 연골분화를 촉진하였다. GAG 축적은 2.8배 증가하였고, SOX9, COL2A1, COMP 등 연골 특이적 유전자 발현의 증가를 확인하였다. 본 하이드로젤은 효과적인 연골 재생을 유도할 수 있는 주입가능형 지지체로서의 잠재력을 확인하였다.

Abstract: As osteoarthritis rises with aging, effective strategies for non-regenerative articular cartilage are essential. We developed hydrogels crosslinked with TGF- β 3 using the Schiff base reaction between oxidized gellan gum (OGG) and silk fibroin (SF). We confirmed the formation of crosslinks and the porous structure through physical and chemical property analysis. As the SF content increased, we observed a decrease in sol fraction, a decrease in swelling ratio, and an increase in compressive strength (8.2 kPa→23.5 kPa). Notably, the OGS0.5% hydrogel group effectively modulated the initial burst release of TGF- β 3 compared to the free solution state and sustained release for over 28 days, promoting the proliferation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and cartilage differentiation. The accumulation of GAG was 2.8 times higher, and there was increase in the expression of cartilage-specific genes like SOX9, COL2A1, and COMP. In conclusion, this hydrogel has the potential to be a promising injectable scaffold that can effectively induce cartilage regeneration.

Keywords: oxidized gellan gum, silk fibroin, schiff base reaction, TGF- β 3, cartilage regeneration.

서 론

전 세계적으로 고령화가 가속화됨에 따라 골관절염과 같은 근골격계 퇴행성 질환의 유병률이 급증하고 있다.¹⁻³ 이는 개

인의 삶의 질 저하뿐만 아니라 심각한 사회경제적 부담을 야기한다. 대한민국의 경우 65세 이상 인구에서 골관절염의 평균 유병률은 약 30.2%로 보고되고 있으며, 이는 고령인구의 1/3이 골관절염을 경험하고 있음을 시사한다.⁴ 이러한 전 지구적 과제의 심각성을 반영하듯, 최근 미국 ARPA-H(보건첨단연구기획국)는 ‘조직 재생’ 기술을 핵심전략으로 지목하고 모든 프로젝트 중 골관절염 극복을 위한 프로젝트(Novel Innovations for Tissue Regeneration in Osteoarthritis, NITRO)를 첫 번째로 착수하였다. 이는 골재생 분야의 혁신적 치료법 개

[#]These authors contributed equally to this work.

[†]To whom correspondence should be addressed.

gskhang@jbnu.ac.kr, ORCID[®] 0000-0002-6452-5653

©2026 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

발이 전세계적으로 우선순위를 명확히 보여주고 있다.

특히, 관절 연골은 혈관, 신경 및 림프 조직이 분포하고 있지 않아 재생 능력이 극도로 제한된다.⁵ 현재 임상에서는 이 부프로펜, 나프록센과 같은 비스테로이드성 소염진통제가 가장 흔히 사용되고,^{6,7} 물리 치료 및 인공 관절 치환술도 시행되고 있다.^{8,9} 하지만, 이는 일시적인 통증완화에 그치거나 재수술의 위험이 따르는 등 근본적인 조직 재생에는 한계가 있다.^{10,11}

이러한 한계를 극복하기 위해 세포, 지지체, 성장인자의 세 가지 요소를 융합하여 손상된 조직을 복구하는 조직공학적 접근법이 주목받고 있다.¹²⁻¹⁴ 지지체는 세포가 부착, 증식, 분화할 수 있는 3차원적 물리적 환경을 제공하며¹⁵⁻¹⁷ 특히 수분 함량이 높고 생체 조직과 구조적으로 유사한 하이드로젤 제형이 연골 재생을 위한 최적의 제형으로 평가된다.¹⁸

젤란검(gellan gum, GG)은 음전하를 띠는 카복실기(-COO-)를 가진 선형 다당류이다. 용액이 냉각되면 사슬이 이중나선 구조를 형성하며 이 때 양이온을 추가하면 양이온이 가교 역할을 하며 이중 나선 사이를 연결하고 젤화가 일어난다. 이와 같이 간단한 가교 방법과 더불어 우수한 생체 적합성, 생분해성 덕분에 젤란검은 연골 조직공학용 소재로 연구되어져 왔다. 하지만, 일반적인 젤란검은 42 °C 이상의 높은 온도에서 젤화가 일어난다. 이 때문에 세포를 파종하는 과정에서 열에 의한 세포 손상을 유발할 수 있다.¹⁹ 기계적 강도가 낮고 세포 부착부위가 부족하다는 단점 또한 존재한다.²⁰

따라서 젤란검 단독으로는 성장인자의 방출을 효율적으로 조절할 수 없을 뿐만 아니라 생리적 조건에서 안정적인 기계적 물성을 유지할 수 없기 때문에 이러한 단점을 보완할 수 있는 하이드로젤 시스템 개발이 요구된다. 본 연구에서는 이러한 문제점을 해결하기 위해 젤란검을 과요오드산 나트륨(NaIO₄)으로 산화시키고 알데히드기를 도입하여 산화 젤란검(oxidized gellan gum, OGG)을 제조하였다. 도입된 알데히드기는 실크 피브로인(silk fibroin, SF)의 아민기와 쉬프 염기(Schiff base) 반응을 통해 화학적 가교를 형성함으로써,²¹⁻²³ 젤란검의 높은 젤화 온도를 낮추고 젤란검의 기계적 강도를 보완할 수 있다.

본 연구의 목적은 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cells, MSCs)의 생존율을 높이고 연골분화를 극대화할 수 있는 TGF- β 3 함유 OGG/SF 하이드로젤을 개발하는 것이다. 이를 위해 OGG와 SF의 혼합 비율에 따른 하이드로젤을 제조하여 푸리에 변환 적외선 분광법(FTIR)과 주사전자현미경(SEM)을 통해 화학적 구조 및 내부 다공성 구조를 확인하였다. 또한 압축 강도 시험을 통해 기계적 물성을 확인하고 TGF- β 3의 서방형 방출을 유도하였다. 마지막으로 인간 골수 유래 중간엽줄기세포(hBMSCs)를 하이드로젤 내에 파종하여 세포 독성 및 유전자 발현 분석을 통해 본 하이드로젤이 연골 재생 효율과 조직공학적 응용 가능성을 확인하였다.

실 험

시약 및 재료. 본 연구에 사용된 GG는 Sigma-Aldrich(미국)로부터 구입하였으며, 누에고치(Bombyx mori)는 Kyebong Farm Cheongyang(한국)에서 구입하여 사용하였다. 세포 배양을 위한 소 태아 혈청(FBS), 항생제(Antibiotic-antimycotic), 인산염 완충 식염수(PBS) 및 배양 배지 등은 Gibco(USA)의 제품을 사용하였다. GG의 산화반응에 사용된 과요오드산나트륨과 에틸렌 글라이콜, SF 추출에 사용된 탄산나트륨, 리튬 브로마이드 등 기타 시약은 분석용 등급을 사용하였다.

산화 젤란검 및 실크 피브로인 제조. OGG는 과요오드산나트륨을 이용한 산화 반응을 통해 제조하였다. GG 분말을 90 °C 증류수에 1%(w/v)의 양으로 첨가하여 녹을 때까지 교반하였다. 상온에서 천천히 40 °C까지 식힌 후 과요오드산나트륨 0.05 M을 넣고 4시간동안 교반하였다. 이 후, 에틸렌 글라이콜을 동일 몰량으로 첨가하여 반응을 종결하였다. 이 후, 1.4 kDa 분자량 컷오프 투석막을 통해 4일 동안 투석을 진행하였고 최종 생성물은 동결건조된 형태로 얻었다. OGG의 알데히드 함량은 히드록실아민 염산염법을 이용하여 측정하였으며 식은 (1)과 같다.

$$\text{알데히드 함량}(\%) = 645 \times (V_1 - V_2) \times c \times 10^{-3} / 2W \times 100 \quad (1)$$

(645는 GG의 반복단위 분자량, V₁은 적정에 사용된 NaOH 부피, V₂는 공시험 부피, c는 NaOH 농도, W는 사용된 OGG의 질량)

SF 수용액은 누에고치를 0.02 M 탄산나트륨 수용액에서 끓여 세리신을 제거한 후, 건조된 섬유를 9.3 M 리튬브로마이드 용액에 60 °C, 4시간동안 용해시켜 제조하였다. 용해된 용액은 72시간동안 Snake SkinTM 투석 튜브를 통해 염을 제거하고 최종 농도를 8%(w/v)로 조절하였다.

하이드로젤 제조. 동결건조한 산화젤란검을 1.5%(w/v)으로 90 °C의 증류수에서 녹인 후 균일하게 녹으면 온도를 60 °C로 낮추고 염화칼슘을 용액에 첨가하여 용해시킨다. 염화칼슘이 완전히 용해되면 온도를 40 °C로 맞추어 실크 피브로인 용액을 0.15%, 0.3%, 0.5%(w/v)의 양으로 용액에 첨가하여 혼합하였다. OGG, OGS0.15%, OGS0.3% 및 OGS0.5% 하이드로젤은 혼합 후 상온의 페트리 접시에 분주하여 젤화를 진행하였다. 제작된 젤은 펀치를 이용하여 직경 8 mm에 두께가 4 mm인 원통형 하이드로젤 지지체를 제조하였다.

물리화학적 분석. 본 연구에서 사용된 GG, OGG, SF 및 OGS 하이드로젤을 푸리에 변환 적외선 분광법(ATR-FTIR, Perkin Elmer, Boston, MA, USA)으로 분석하여 물리화학적 변화가 발생했는지 확인하고자 400-4000 cm⁻¹의 파장 범위에서 측정하였다.²⁴

하이드로젤 모폴로지 분석. 본 연구에서 사용된 지지체의 모폴로지 특성을 분석하기 위해 주사전자현미경(Bio-LV SEM,

HITACHI, Japan)을 이용하였다. 샘플을 반으로 잘라 카본테이프 스테르에 고정시킨 후 아르곤가스 하에서 플라즈마 코팅(Quorum Technologies, UK)를 통해 백금 코팅을 진행하였다.

줄 분율 분석. 하이드로젤의 줄 분율은 제작한 하이드로젤을 동결건조하여 초기 무게(W_i)를 측정하였다. 측정된 하이드로젤을 증류수 1 mL에 담가 80 rpm으로 1시간동안 상온에서 인큐베이션하였다. 1시간 후 증류수를 완전히 제거하고 4 °C에서 6시간, -20 °C에서 6시간 그리고 -80 °C에서 12시간 보관하였다. 동결건조된 하이드로젤의 무게(W_d)를 측정하였다. 줄 분율 계산식은 (2)과 같다.

$$\text{줄 분율(\%)} = (W_i - W_d) / W_i \times 100(\%) \quad (2)$$

팽윤 거동 및 질량 변화 분석. 제작한 하이드로젤을 인산염 완충 식염수 1 mL에 담그고 37 °C 인큐베이터에 특정 시점까지 보관하였다. 24시간 후 용액을 완전히 제거한 후 팽윤된 하이드로젤의 중량(W_s)을 측정하였다. 측정된 하이드로젤을 동결건조시킨 후 중량(W_i)을 측정하였다. 질량 팽윤비는 계산식 (3)와 같이 분석하였다.

$$\text{질량 팽윤비(\%)} = W_s / W_i \times 100(\%) \quad (3)$$

질량 변화 분석으로는 제조한 하이드로젤의 무게(W_p)를 측정 후 인산염 완충 식염수에 담가 보관하였다. 특정 시점(1, 7, 14, 21 및 28일)에 용액을 제거하고 중량(W_i)을 측정하였다. 질량 변화를 계산식은 계산식 (4)과 같으며 PBS는 3일마다 교체하였다.

$$\text{질량 변화율(\%)} = (W_p - W_i) / W_p \times 100(\%) \quad (4)$$

유변학적 평가. 하이드로젤의 유변학적 특성 및 젤화 온도는 점도계(Ametek Brookfield, Middleboro, MA, 미국)를 이용하여 측정하였다. 측정을 위해 물 순환조(VCB-07, JONGRO Industrial Co., 한국)를 40 °C로 예열한 후, 5 mL의 하이드로젤 전구체 용액을 점도계 측정 컵에 주입하였다. 이후 순환조의 온도를 20 °C까지 서서히 감소시키면서 점도 변화를 측정하였다.

사출력 평가. 하이드로젤의 사출력은 texture analyzer를 이용하여 평가하였다. 제조된 하이드로젤 전구체 용액을 1 mL 주사기(Kovax-syringe, Korea Vaccine Co., Ltd., 한국)에 채운 후 21 G 바늘로 분석하였다. 이후 젤화를 유도하기 위해 시료를 실온에서 5 분 동안 보관한 뒤, 측정 속도 30 mm/min 및 20 N 로드 조건에서 측정하였다.

압축강도 측정. 하이드로젤의 압축강도를 측정하기 위해서 직경 8 mm, 높이 5 mm인 하이드로젤을 제작하여 PBS에 하루동안 안정화를 시켰다. 압축강도는 텍스처 분석기(FTC, Sterling, Virginia, 미국)로 측정하였다. 시험은 2 mm/min 속도에 10 N의 하중을 가하며 측정하였다.

TGF-β3의 방출 거동 평가. TGF-β3의 방출 거동을 평가하기 위해 동결건조한 OGG를 증류수에 1.5%(w/v)의 농도로 녹인 후 균일한 OGG 하이드로젤 전구체 용액을 제조하였다. 이 후 0.03%(w/v) CaCl₂를 첨가하여 완전히 용해시킨 후, TGF-β3 성장인자(0.98 mg/mL, 대응제약)를 최종 농도 20 ppm이 되도록 첨가하여 혼합하였다.

이어서 SF 용액을 0, 0.15, 0.3 및 0.5%(w/v)의 농도로 각각 첨가하여 혼합한 뒤, 혼합 용액을 실리콘 몰드에 100 μL씩 분주하고 상온에서 젤화를 진행하였다.

이 후 하이드로젤은 6 well 플레이트에 100 μm 셀 스트레이너 위에 올린 후, PBS를 5 mL씩 분주하여 하이드로젤을 잠기도록 하였다. 이후 시료를 셰이커에서 방출 시험을 수행하였다.

측정할 각 시점에서 상등액 5 mL를 회수한 후 동일한 양의 PBS를 보충하였다. 회수한 시료는 ELISA 키트 프로토콜에 따라서 희석한 후 정량 분석하였다.

세포 독성 평가. 하이드로젤의 세포 독성을 평가하기 위해 NIH/3T3 세포를 이용한 MTT 분석을 수행하였다. 하이드로젤 시료와 양성 대조군으로 사용한 라텍스 조각(2.5 cm²/mL)을 RPMI 배지 10 mL에 각각 적신 후, 37 °C 항온조에서 24시간 동안 배양하여 샘플 추출액을 제조하였다. 이후 추출액은 0.45 μm 필터를 이용하여 여과하였다. NIH/3T3 세포는 96 well 플레이트에 웰당 2000 cells의 밀도로 파종하였다. 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였고, 각 배양 시점에서 배지를 제거한 후 MTT 용액(5 mg/mL)을 처리하고 2시간 동안 반응하였고 반응 종료 후 상등액을 제거하고 DMSO를 첨가하여 결정을 완전히 용해시킨 다음, 마이크로플레이트 리더를 이용하여 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

hBMSC 배양. hBMSC는 StemPro™ MSC SFM XenoFree 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 세포는 계대수 5까지 배양한 후 실험에 사용하였다.

연골 분화 평가. 세포 배양 후 하이드로젤 내 glycosaminoglycan (GAG) 함량을 분석하였다. 이 후, PBS로 세척한 후 RNAiso Plus(Takara, 일본)를 이용하여 세포를 파쇄하였고 원심 분리 후 균질화시켰다. 균질화된 용액을 glycosaminoglycan assay 키트(Chondrex, 미국)를 이용하여 정량화하였다.

연골 분화 관련 유전자 발현을 확인하기 위해 실시간 유전자 증폭 검사(RT-PCR)를 수행하였다. 하이드로젤로부터 추출한 mRNA는 cDNA로 합성된 후, SYBR Green PCR Master Mix(Applied biosystems, 미국)과 StepOnePlus™ Real-Time PCR System(Applied biosystems, 미국)을 이용하여 증폭 반응을 수행하였다. 연골 특이적 유전자인 COMP, COL2A1 및 SOX9의 발현을 분석하였으며, 모든 유전자 발현 수준은 하우스키핑 유전자인 GAPDH를 기준으로 표준화하였다.

통계분석. 모든 실험의 결과 값은 평균 ± 표준 편차로 나타냈으며, 통계 분석을 위해 일원 분산 분석(One-way ANOVA)을

수행하고 Tukey's HSD 사후 검정을 통해 군 간 유의성을 확인하였다. 유의 수준은 $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)로 표기하였다.

결과 및 토론

산화 젤란검의 합성 및 화학적 분석. GG의 구조적 안정성을 부여하기 위해 과요오드산나트륨을 이용한 산화반응을 수행하였다. OGG의 알데히드 치환도는 약 4.14%로 확인하였다. 이는 GG의 반복 단위 내 인접한 수산기가 알데히드기 (-CHO)로 치환되었음을 의미하며 약 4%의 치환도는 GG 본연의 다당류 골격을 유지하며 SF와 충분한 화학적 가교를 형성할 수 있는 상태로 사료된다. 제조된 하이드로젤의 분자 간 상호작용 및 가교 형성 여부는 FTIR을 통해 확인하였다.

순수한 GG의 특징 피크는 3310 cm^{-1} (O-H 신축 진동), 2920 cm^{-1} (C-H 신축 진동), 1604 cm^{-1} (C=O 신축 진동) 및 1029 cm^{-1} (C-O-C 신축 진동)에서 측정되었다.²⁵ OGG와 OGS0.15%, OGS0.3%, OGS0.5%에서도 이와 유사하게 3300 cm^{-1} 부근의 O-H 신축 진동, 2900 cm^{-1} 부근의 C-H 신축 진동, 1650 cm^{-1} 부근의 C=O 신축 진동 및 1030 cm^{-1} 부근의 C-O-C 신축 진동을 확인하였다. GG에 비해 OGG와 OGS0.15%, OGS0.3%, OGS0.5%의 C=O 신축 진동의 폭이 넓은 것을 확인하였다. 이는 알데히드기의 특징적인 피크로 GG의 산화 과정이 원활히 이루어져 알데히드기가 도입되었음을 의미한다. SF는 1642 cm^{-1} (아마이드 I 밴드), 1549 cm^{-1} (아마이드 II 밴드) 그리고 1239 cm^{-1} (아마이드 III 밴드)에서 특징적인 피크를 나타낸다.²⁶ OGG와 다르게 OGS0.15%, OGS0.3%, OGS0.5% 군에서 각각 1542 cm^{-1} , 1537 cm^{-1} , 1534 cm^{-1} 에서 N-H와 C-N 신축 진동의 아마이드 II 밴드가 관찰되어 SF의 존재를 확인하였다. 일반적으로 실크 피브로인은 물에 용해되는 준안정 형태의 무작위 코일과 α -나선 구조의 실크 I, 물에 녹지

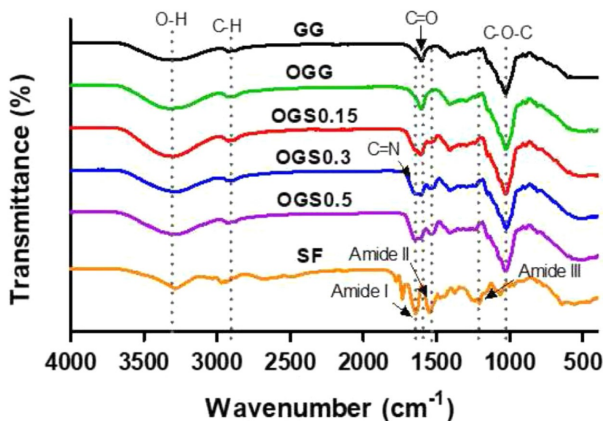


Figure 1. FTIR spectra of pristine GG, oxidized GG (OGG), SF, and the prepared hydrogels in the range of $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$.

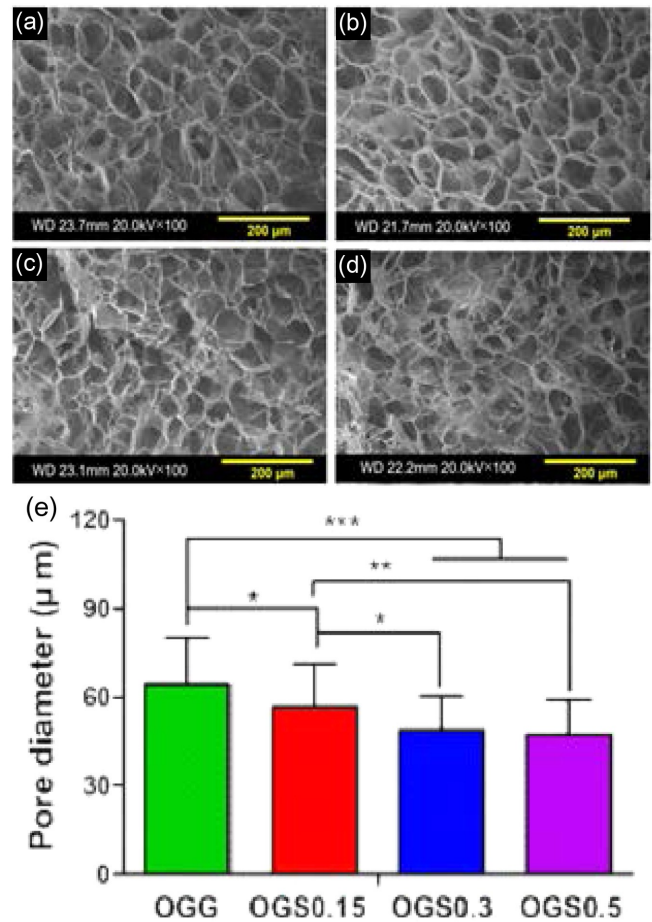


Figure 2. Morphological characterization of the hydrogels: (a) OGG; (b) OGS0.15%; (c) OGS0.3%; (d) OGS0.5% (scale bar = $200\text{ }\mu\text{m}$); (e) average pore diameter of each hydrogel group (values are expressed as mean $\pm$ standard deviation; $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)).

않는 안정적인 β -시트 구조의 실크 II로 나뉘며, 아마이드 I, 아마이드 II 및 아마이드 III 밴드의 범위와 β -시트 구조가 우세한 것으로 보인다. 또한 OGS0.15%, OGS0.3%, OGS0.5% 군의 1650 cm^{-1} 부근의 C=O 신축 진동이 실크 피브로인의 함량이 증가함에 따른 위치 이동을 확인했다. 이는 수소 결합의 형성으로 인한 진동 주파수의 변화를 보인다. 또한 OGS0.15%, OGS0.3%, OGS0.5%군의 1640 cm^{-1} 부근에서 미세한 피크를 통해 GG 알데히드기와 SF와의 이민 결합을 확인하여 쉬프 염기 반응이 일어났을 것으로 확인된다.²⁷

미세 다공성 구조 및 형태학적 관찰. 하이드로젤에서의 기공의 크기와 기공 연결성은 세포의 침투, 영양분 확산 및 대사 노폐물 배출을 결정짓는 요인이다.²⁸ SEM을 통해 관찰한 하이드로젤의 단면은 모든 실험군에서 다공성 구조를 확인하였다.

SF의 함량이 증가함에 따라 기공의 크기는 감소하고 기공의

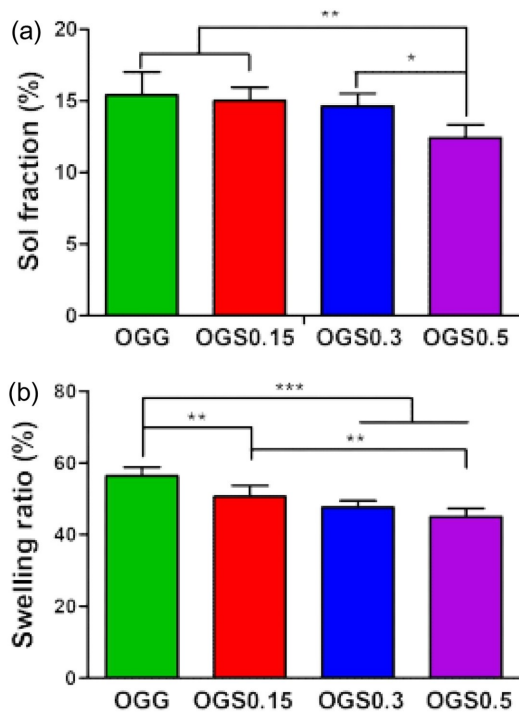


Figure 3. Physicochemical characterization of the hydrogels: (a) sol fraction (%); (b) swelling ratio (%) (PBS, 37 °C, dry weight measured after 24 h of swelling). Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation (n=6); p < 0.05 (*), p < 0.01 (**), p < 0.001 (***).

밀도가 증가하는 경향성을 확인하였다. 이는 SF 도입에 따라 형성된 쉬프 염기 가교가 기공 네트워크를 더 촘촘하게 만들고, 동결건조 과정에서 용매가 결정화 될 때 얼음 결정의 크기가 제한되었기 때문이라고 사료된다. 비록 기공 크기는 다소 감소하였으나, OGS0.5% 군에서 관찰할 수 있는 균일한 기공 구조는 하이드로젤의 비표면적을 넓혀 세포의 부착 효율을

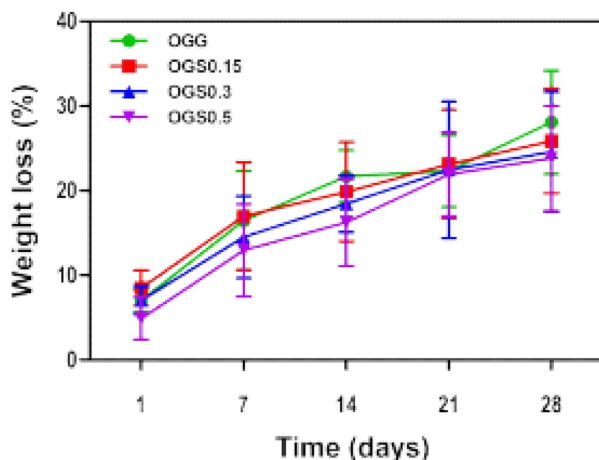


Figure 4. Degradation profiles of the hydrogels (%).

높일 수 있는 미세환경을 제공할 수 있을 것이다.

줄 분율 및 팽윤 거동. 하이드로젤에서 줄 분율은 가교되지 않고 용매로 용출되는 고분자 사슬의 비율을 의미한다. 이는 곧 가교도를 나타내는 것이다.²⁹ 분석 결과 SF를 포함하지 않은 OGG 단독 하이드로젤은 가장 높은 줄 분율을 나타내었고 SF 함량이 증가할수록 줄 분율은 유의미하게 감소하였다.

이는 SF가 OGG 사슬 간을 연결하는 가교제로서 효과적으로 작용하였음을 의미한다. 모든 하이드로젤은 연골 조직과 유사한 높은 함수율을 보였으나,^{30,31} SF의 함량이 증가함에 따라 팽윤비는 점진적으로 감소하였다. 친수성이 강한 젤란검과 달리 SF 내의 소수성 도메인(β -sheet 구조)이 하이드로젤 매트릭스의 전체적인 친수성을 조절하여 과도한 팽윤을 방지한 것으로 사료된다.^{32,33}

질량 변화 거동 분석. 지지체는 새로운 조직이 재생되는 속도에 맞춰서 분해되어야 한다.³⁴

PBS 내에 침지한 환경에서 28일간 수행한 질량 변화거동 분석 결과 OGG 하이드로젤은 약 28.1% 질량이 감소하였다. 반면, OGS0.5% 하이드로젤은 약 23.8%로 분해 속도가 지연되었다. OGG는 이온 가교로 인한 가수 분해로 인해 빠른 분해가 일어나지만 SF가 도입된 군에서는 쉬프 염기 결합이 하이드로젤 네트워크 내에 물 분자의 침투를 지연시켜 가수분

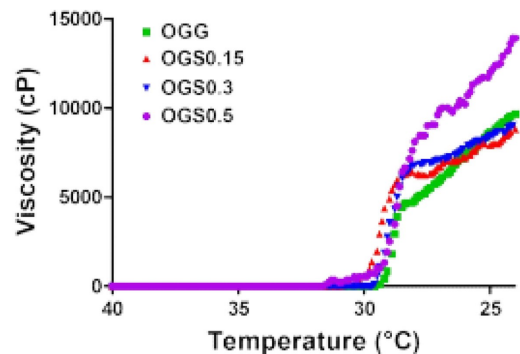


Figure 5. Viscosity changes of the hydrogels as a function of temperature.

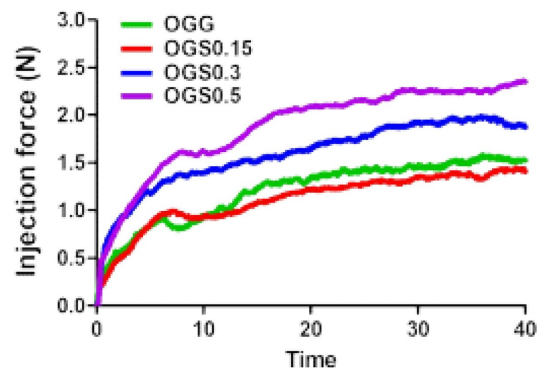


Figure 6. Injection force profiles of the hydrogels as a function of time.

해 속도를 느리게 유도한다. 연골 조직재생에는 일반적으로 수주 이상의 시간이 소요된다.³⁵ 4주까지도 약 75% 이상의 질량을 유지하는 OGS 하이드로젤은 줄기세포가 연골로 분화하고 세포의 기질을 충분하게 형성할 수 있는 시간을 제공할 수 있을 것으로 사료된다.^{36,37}

점도 및 사출력 평가. 젤화 온도는 세포 캡슐화에 적합한 온도인지 판단 지표이다.³⁸ 젤화 온도는 세포의 부착, 분화 등에 영향을 주고³⁹ 젤화 온도가 낮을 경우에는 체내 이식에도 어려움이 존재한다. 하이드로젤의 젤화 온도를 점도 측정을 통해 평가하였다.

OGG 하이드로젤은 29 °C 부근에서 젤화가 이루어졌으며, OGS 하이드로젤 군들의 경우 30-31 °C 부근에서 젤화가 이루어졌다. 이는 SF의 도입이 GG 사슬 간의 소수성 상호작용을 촉진하고 젤화에 필요한 에너지 장벽을 변화시켰기 때문으로 해석된다. 특히 OGS0.5% 군에서 관찰된 가장 높은 점도는 SF 단백질 내의 β -sheet 구조가 하이드로젤 내에서 물리적으로 강도를 보강하는 역할을 수행하여 전체적인 네트워크의 점탄성을 향상시켰음으로 사료된다.⁴⁰⁻⁴²

주사 용이성을 평가하기 위한 사출력 측정 결과 OGS0.15% 및 OGS0.3% 군은 OGG와 유사한 수준의 낮은 사출력을 보여 미세 침습술에 적합함을 확인하였다.

가교밀도가 가장 높았던 OGS0.5% 군에서는 상대적으로 높은 사출력을 나타냈으나 21 G 주사 바늘을 통해 확인했을 때 임상 시술에서 허용되는 범위로 여겨지는 20 N 내외에 있어 적용 가능함을 확인하였다. 높은 점탄성은 주입 시 다소 저항으로 작용할 수 있으나, 주입된 이후에는 지지체의 유실을 방지할 수 있고 형태를 유지하는데 유리하게 작용될 것이라 사료된다.^{43,44}

압축강도 및 기계적 특성 분석. 관절 연골의 경우, 일상적인 활동을 하다 보면 체중의 수배에 달하는 압축 하중과 전단력을 받는 조직이다. 그렇기 때문에 지지체의 기계적 강도도 연골 재생 효율을 결정짓는 요소로 판단된다.⁴⁵ 압축 응력

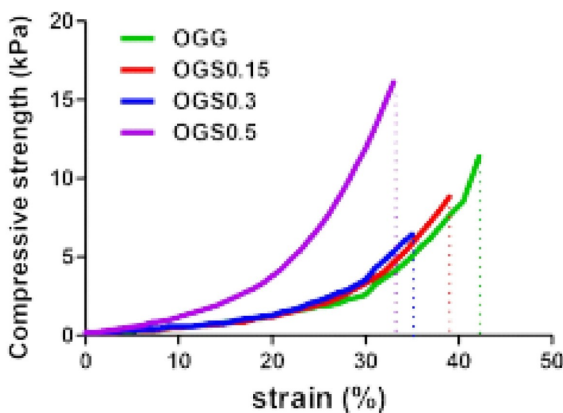


Figure 7. Compressive stress-strain curves of the hydrogels.

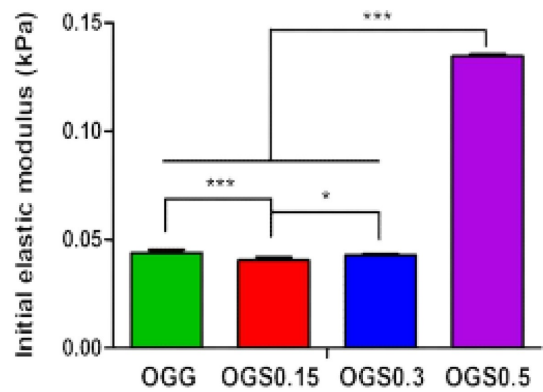


Figure 8. Initial compressive elastic modulus of each hydrogel group (values are expressed as mean $\pm$ standard deviation (n=6); p < 0.05 (*), p < 0.001 (***)).

-변형률 곡선 분석 결과 SF의 함량이 증가할수록 하이드로젤의 최대 압축 응력과 OGG 단독군에 비해 높은 초기 탄성계수를 나타냈다.

이는 Ca^{2+} 에 의한 GG의 이온 가교와 쉬프 염기 공유 결합이 존재하여 이중 네트워크 시스템이 외부 응력을 효과적으로 분산시켰을 것으로 사료된다.⁴⁶ SF 함량이 높을수록 과단 변형률이 감소하는 것을 확인하였다.

이는 고분자 사슬의 유동성이 제한되기 때문에 강성이 높아져 이러한 결과를 나타냈음을 의미한다.⁴⁷⁻⁴⁹

TGF- β 3 방출 거동 평가. 성장인자의 효율적인 전달은 조직 재생을 가속화할 수 있다.⁵⁰ TGF- β 3는 수용성이기 때문에 주입할 경우, 주입 부위에서 머무르지 못하고 반감기도 짧아 효율적인 재생을 이끌어내지 못하는 단점이 존재한다.⁴⁶ 따라서 TGF- β 3를 하이드로젤 내에 담지하여 조성에 따라 방출 패턴을 분석하였다.

SF 함량이 높은 OGS0.5% 군은 약 77.52%의 가장 높은 누적

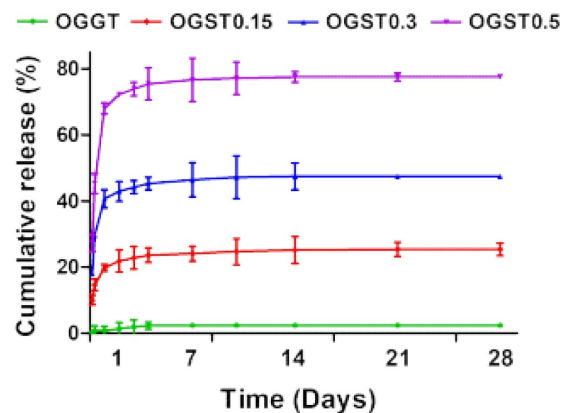


Figure 9. Cumulative release profiles of TGF- β 3 from the hydrogels (values are expressed as mean $\pm$ standard deviation (n=6)).

방출률을 확인할 수 있었다. 다만 SF가 없는 OGG 단독군에서는 2.36%의 미미한 방출률을 확인했다.

이러한 상반된 결과를 분석해보면 그 원인은 고분자 매트릭스와 TGF- β 3 간의 정전기적 상호작용에 기인한 것으로 사료된다.⁵¹ GG의 반복 단위에 존재하는 카복실기(-COO-)는 생리적 pH에서 음이온성을 나타내며, 염기성 등전점(pI $\approx$ 8.9)을 가진 TGF- β 3는 생리적 pH(7.4) 조건에서 순 양전하를 띠는 것으로 보고되어 있다.⁵² 따라서 OGG 매트릭스 내 음이온성 카복실기와 양전하의 TGF- β 3 사이에 정전기적 인력이 형성될 수 있으며, 이는 음이온성 다당류 하이드로젤에서 양전하 단백질의 방출이 정전기적 상호작용에 의해 지연되는 것으로 보고된 기존 연구와 일치한다.⁵³ 이러한 상호작용이 OGG 단독군에서 관찰된 극히 제한적인 방출에 기여한 것으로 추정된다.

방출 프로파일 측면에서 고려할 때, OGS0.5% 군은 초기 2일간의 급격한 방출 이후 2주 이상 지속적인 방출 양상을 보였다. 초기의 높은 방출량은 줄기세포의 초기 분화신호를 활성화하는데 유리하며 2주 이상의 지속적인 방출은 연골

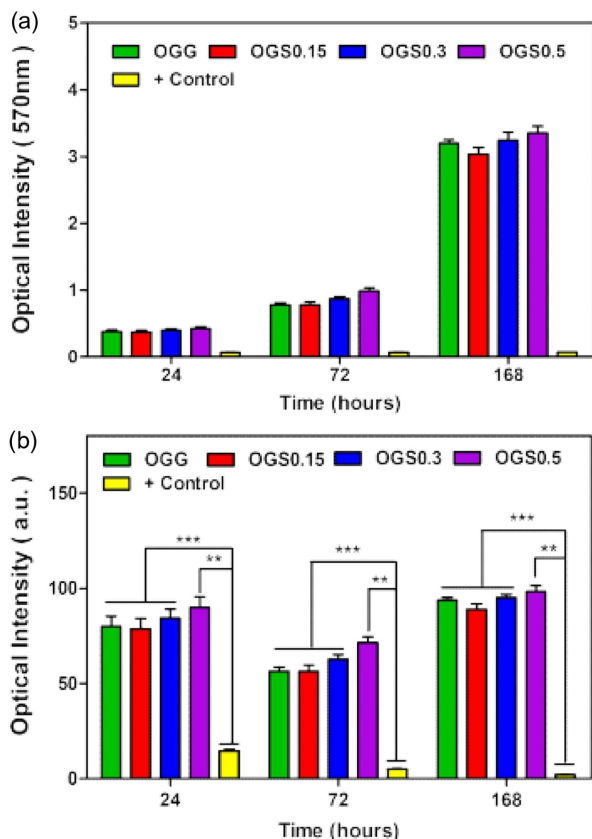


Figure 10. Cytocompatibility analysis by MTT assay: (a) absorbance for cell viability measurement; (b) cell viability relative to the negative control (values are expressed as mean $\pm$ standard deviation (n=6); $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)).

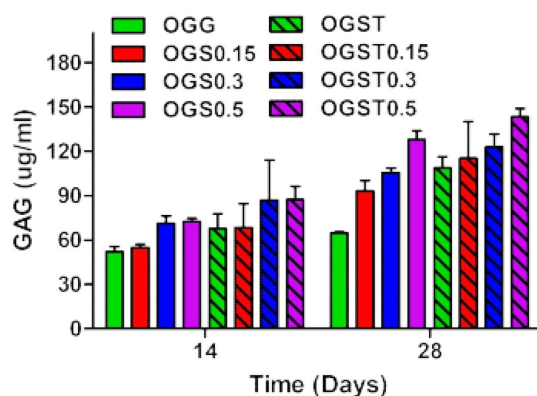


Figure 11. Biochemical characterization by quantitative analysis of glycosaminoglycan (GAG) content (values are expressed as mean $\pm$ standard deviation (n=6)).

기질 형성을 충분히 할 시간을 확보해줄 수 있다. 따라서 OGS0.5% 군은 GG 단독군의 약물 방출 억제 현상을 해결하고, 성장인자 전달 효율을 극대화할 수 있는 전달시스템임을 확인하였다.

세포독성 및 증식 거동. NIH/3T3 섬유아세포를 사용하여 용출물 기반 MTT 분석한 결과 양성대조군을 제외한 모든 군에서 배양 기간동안 세포 사멸이 관찰되지 않아 개발된 하이드로젤 시스템이 생물학적 안전성을 가짐을 확인하였다.

특히 OGG 산화 과정에서 도입된 알데히드는 잠재적인 세포 독성을 가질 수 있을 것으로 사료되었으나, 본 연구에서는 SF의 아미노기와 쉬프 염기 가교를 형성하며 소모되어 세포 생존에 부정적인 영향을 미치지 않은 것으로 확인하였다.

SF 함량이 증가할수록 세포 증식률이 유의미하게 향상되는 것을 확인하였는데 이는 GG와 같은 다당류 소재는 세포 부착 부위가 없는 반면, 단백질 소재인 SF는 세포막 수용체인 인테그린과 상호작용할 수 있는 소수성 도메인을 함유하고 있기 때문으로 분석된다.⁵³⁻⁵⁵

글리코사미노글리칸(GAG) 정량 분석. hBMSCs의 기능적 연골 분화 효율을 평가하기 위해 연골 조직의 압축 저항성과

Table 1. Primer Sequences Used for Real-Time PCR Analysis

Gene	Primer Sequence
GAPDH	F: 5'-ACTTTGTGAAGCTCATTTCCTGGTA-3'
	R: 5'-GTGGTTTGAGGGCTCTTACTCCTT-3'
COMP	F: 5'-GATTCCGGGCCTTCCAGAC-3
	R: 5'-GGTCGCTGTTTCATGGTCTGC-3'
COL II	F: 5'-TGGGTGTTCTATTTATTTATTGTCTTCCT-3'
	R: 5'-GCGTTG GACTCA CACCAGTTAGT-3'
SOX9	F: 5'-AGTACCCGCACCTGCACAAC-3'
	R: 5'-CGCTTCTCGCTCTCGTTCAG-3'

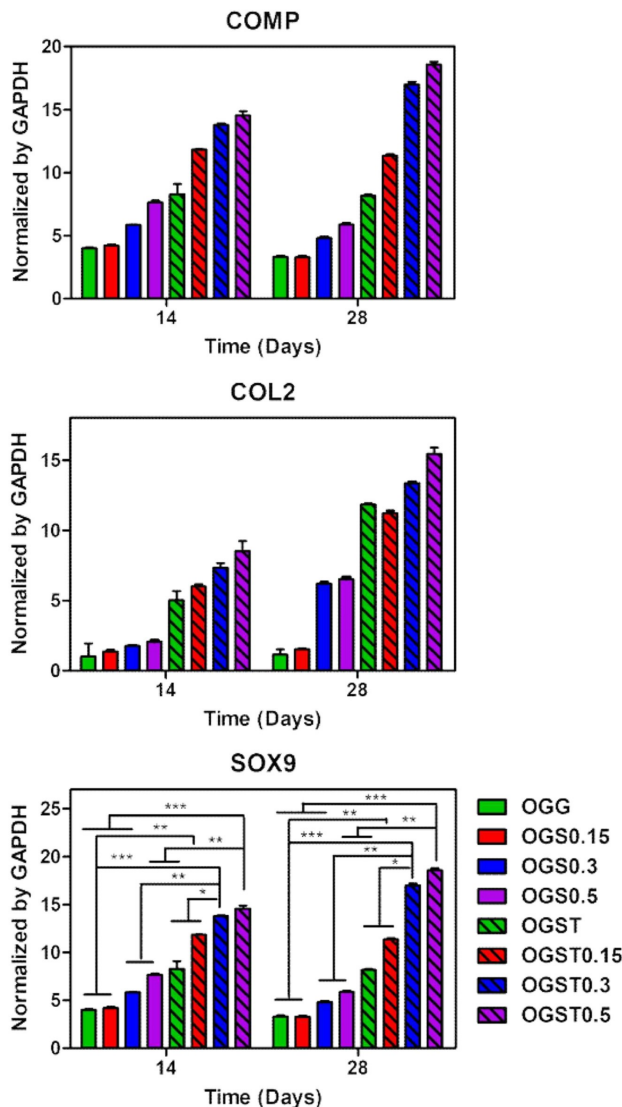


Figure 12. Expression of cartilage-specific genes analyzed by RT-PCR: (a) SOX9; (b) COL2A1; (c) COMP (values are expressed as mean $\pm$ standard deviation (n=3); one-way ANOVA followed by Tukey's HSD post hoc test; $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)).

탄성을 나타내는 세포외기질(ECM)의 주요 성분인 GAG (glycosaminoglycan)의 축적량을 정량 분석하였다.

배양 28일 차에 두 가지 유의미한 생체재료학적 상관관계가 관찰되었다. 성장인자가 존재하지 않는 조건에서도 SF 함량이 0%에서 0.5%로 증가함에 따라 GAG 생성량이 증가하였다. 이는 앞선 기계적 특성 평가에서 확인된 바와 같이 SF의 도입으로 향상된 지지체의 강성이 줄기세포에 물리적 자극을 전달하여 세포 내 골격을 재배열하고 연골 분화 신호 전달 경로를 활성화했기 때문이라고 해석된다.^{56,57} 성장 인자가 탑재된 OGST 실험군에서는 전반적으로 높은 GAG 함량을 보

였다. 특히 OGST0.5% 군에서 압도적인 GAG 축적량을 보였는데 이는 OGST0.5% 하이드로젤의 조밀한 가교 네트워크가 TGF- β 3의 초기 과다 방출을 억제하고 4주 이상의 지속적 방출을 유도함으로써 줄기세포가 성숙한 연골 세포로 분화하고 기질을 합성하는데 필요한 생화학적 신호를 장기간 안정적으로 공급했다고 사료된다.^{53,58-61}

연골 특이적 유전자 발현 분석. Real-time PCR을 이용하여 hBMSCs의 연골 분화 기전을 분자생물학적 수준에서 검증하기 위해 연골 특이적 마커(SOX9, COL2A1, COMP)의 발현을 분석하였다.

연골 분화 초기에 발현되어 COL2A1과 같은 하위 기질 유전자의 전사를 유도하는 마스터 전사 인자인 SOX9가 대부분의 군에서 배양 시간이 경과함에 따라 발현이 감소하는 경향을 보였는데 이는 줄기세포가 초기 분화 단계를 지나 성숙한 연골 세포로 전이되며 기질 합성 단계로 대사가 전환되는 자연스러운 과정으로 해석된다.⁶²⁻⁶⁵ 다만 OGST0.3% 및 OGST0.5% 군은 28일 차에도 비교적 높은 SOX9 발현을 유지하여 지속적인 분화 자극이 이루어지고 있음을 시사했다. 연골 기질을 구성하는 단백질인 COL2A1과 COMP의 경우 모든 군에서 4주 차에 발현량이 급격히 증가하였다. 특히 OGST0.5% 군에서 다른 군 대비 월등히 높은 발현 수준을 보였는데, 이는 GAG 정량과 유사한 상관관계를 나타낸다. 본 연구에서 개발된 OGS0.5% 하이드로젤과 TGF- β 3의 서방형 전달 시스템은 섬유 연골의 지표인 Type I Collagen 발현 유도가 아닌, 초자연골에 특이적인 COL2A1의 선택적 고 발현을 효과적으로 유도함으로써, 골관절염 환경에서 이상적인 연골 조직 재생을 촉진할 수 있는 유망한 치료 전략임을 시사한다.⁶⁵

결론

본 연구에서는 OGG와 SF를 쉬프 염기 반응으로 가교하고 TGF- β 3를 함유시켜 주입 가능한 하이드로젤 시스템을 개발하여 골관절염 부위에서의 연골 재생 효율을 극대화하고자 하였다.

개발된 하이드로젤 시스템에서는 SF의 함량이 증가함에 따라 기계적 안정성이 유의미하게 향상됨을 확인하였다. OGG0.5% 군에서의 압축강도는 23.5 kPa로 OGG 단독군 대비 약 2.8배 증가하였으며 줄 분율은 18.3%에서 8.7%로 감소하여 가교 네트워크가 충분히 형성되었음을 확인하였다. 또한 가교 과정에서 다공성 구조가 형성됨에 따라 세포 부착, 영양분 확산 및 대사 노폐물 배출에 유리한 미세환경을 제공할 수 있음을 보였다. 마지막으로 적절한 젤화 온도와 21 G 주사 바늘을 통한 주입 가능성을 확인함으로써 최소 침습적 임상 시술에 적합함을 입증하였다.

특히 주목할 만한 점은 하이드로젤에서의 TGF- β 3 방출 거

동이다. OGS0.5% 하이드로젤군에서는 TGF- β 3의 자유 용액 상태 대비 초기 방출을 효과적으로 조절하고, 28일 이상 지속적인 방출 양상을 나타냄으로써 줄기세포의 초기 분화 신호 활성화와 연골 기질 형성에 필요한 생화학적 환경을 제공함을 확인하였다.

Real-time PCR을 이용한 연골 특이적 마커(SOX9, COL2A1, COMP)의 발현 분석에서도 OGS0.5% 하이드로젤군은 유전자 발현을 상향조절하여 초자연골로의 분화를 유도할 수 있음을 확인하였다. 또한 연골 특이적 세포외기질인 GAG 축적량도 2.8 배 증가시켰다.

본 연구의 한계점으로는 *in vitro* 실험에만 국한되었다는 점이며, 향후 *in vivo* 관절 연골 결손 모델을 통해 실제 연골 결손 부위에 주입하여 조직학적 재생 효율, 염증 반응 등을 장기적으로 평가하는 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한 하이드로젤의 분해 산물에 대한 독성 평가와 규모가 큰 결손 부위에도 적용 가능성을 확인해야 한다.

결론적으로 본 연구에서 개발한 하이드로젤 시스템은 기계적 물성, 주입 가능성, 안정적인 성장인자 방출이 동시에 구현됨으로써 골관절염 치료를 위한 차세대 주사형 생체재료로서 높은 잠재력을 확인하였다. 이는 최소 침습적 임상을 가능케 할 뿐만 아니라 효과적인 연골 재생을 유도할 수 있는 혁신적인 치료 전략으로 향후 임상 중개연구를 통해서 골관절염 환자의 삶의 질 향상에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글: 이 논문은 2022년도 전북대학교 연구교수 연구비 지원 및 전북테크노파크의 2025년도 첨단바이오육성 R&D 지원사업의 지원을 받아 수행되었음.

이해상충: 저자(들)는 이해상충이 없음을 선언합니다.

참 고 문 헌

- Chen, X.; Tang, H.; Lin, J.; Zeng, R. Temporal Trends in the Disease Burden of Osteoarthritis from 1990 to 2019, and Projections Until 2030. *PLoS One*, **2023**, 18, e0288561.
- Grote, C.; Reinhardt, D.; Zhang, M.; Wang, J. Regulatory Mechanisms and Clinical Manifestations of Musculoskeletal Aging. *J. Orthop. Res.* **2019**, 37, 1475-1488.
- Mobasheri, A. Applications of Proteomics to Osteoarthritis, a Musculoskeletal Disease Characterized by Aging. *Front. Phys.* **2011**, 2, 108.
- Emami, A.; Namdari, H.; Parvizpour, F.; Arabpour, Z. Challenges in Osteoarthritis Treatment. *Tissue and Cell*. **2023**, 80, 101992.
- Ao, R.; Liang, W.; Wang, Z.; Li, Q.; Pan, X.; Zhen, Y.; An, Y. Delivery Strategies of Growth Factors in Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, **2025**, 31, 374-389.
- Karaarslan, N.; Batmaz, A. G.; Yilmaz, I.; Ozbek, H.; Caliskan, T.; Yasar Sirin, D.; Kaplan, N.; Oznam, K.; Ates, O. Effect of Naproxen on Proliferation and Differentiation of Primary Cell Cultures Isolated from Human Cartilage Tissue. *Exp. Therap. Med.* **2018**, 16, 1647-1654.
- Ratcliffe, A.; Azzo, W.; Saed-nejad, F.; Lane, N.; Rosenwasser, M. P.; Mow, V. C. *In vivo* Effects of Naproxen on Composition, Proteoglycan Metabolism, and Matrix Metalloproteinase Activities in Canine Articular Cartilage. *J. Orthop. Res.* **1993**, 11, 163-171.
- O'driscoll, S. W. Current Concepts Review-the Healing and Regeneration of Articular Cartilage. *JBJS*, **1998**, 80, 1795-1812.
- Gomoll, A. H.; Filardo, G.; De Girolamo, L.; Espregueira-mendes, J.; Maccacci, M.; Rodkey, W. G.; Steadman, J. R.; Zaffagnini, S.; Kon, E. Surgical Treatment for Early Osteoarthritis. Part I: Cartilage Repair Procedures. *Knee Surgery, Sports Traumatol. Arthroscopy*, **2012**, 20, 450-466.
- Solchaga, L. A.; Goldberg, V. M.; Caplan, A. I. Cartilage Regeneration Using Principles of Tissue Engineering. *Clinical Orthop. Related Res.* **2001**, 391, S161-S170.
- Liu, Y.; Shah, K. M.; Luo, J. Strategies for Articular Cartilage Repair and Regeneration. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, 9, 770655.
- Whitaker, M. J.; Quirk, R. A.; Howdle, S. M.; Shakesheff, K. M. Growth Factor Release from Tissue Engineering Scaffolds. *J. Pharm. Pharmacol.* **2001**, 53, 1427-1437.
- Gugoo, M. B.; Amarpal; Sharma, G. T.; Aithal, H. P.; Kinjavdekar, P. Cartilage Tissue Engineering: Role of Mesenchymal Stem Cells Along with Growth Factors & Scaffolds. *Indian J. Med. Res.* **2016**, 144, 339-347.
- Rahmani, D.; Bakhshayesh, A.; Babaie, S.; Tayefi Nasrabadi, H.; Asadi, N.; Akbarzadeh, A.; Abedelahi, A. An Overview of Various Treatment Strategies, Especially Tissue Engineering for Damaged Articular Cartilage. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnol.* **2020**, 48, 1089-1104.
- Carletti, E.; Motta, A.; Migliaresi, C. Scaffolds for Tissue Engineering and 3D Cell Culture. *3D Cell Culture: Methods and Protocols*, **2010**, 17-39.
- Dutta, R. C.; Dutta, A. K. Cell-interactive 3D-scaffold; Advances and Applications. *Biotechnol. Adv.* **2009**, 27, 334-339.
- Wang, W.; Caetano, G.; Ambler, W. S.; Blaker, J. J.; Frade, M. A.; Mandal, P.; Diver, C.; Bartolo, P. Enhancing the Hydrophilicity and Cell Attachment of 3D Printed PCL/graphene Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials*, **2016**, 9, 992.
- Babaniamansour, P.; Salimi, M.; Dorkoosh, F.; Mohammadi, M. Magnetic Hydrogel for Cartilage Tissue Regeneration as Well as a Review on Advantages and Disadvantages of Different Cartilage Repair Strategies. *BioMed Res. Int.* **2022**, 2022, 7230354.
- Gong, Y.; Wang, C.; Lai, R. C.; Su, K.; Zhang, F.; Wang, D.-A. An Improved Injectable Polysaccharide Hydrogel: Modified Gellan Gum for Long-term Cartilage Regeneration *In Vitro*. *J. Mater. Chem.* **2009**, 19, 1968-1977.
- Bacelar, A. H.; Silva-correia, J.; Oliveira, J. M.; Reis, R. L. Recent Progress in Gellan Gum Hydrogels Provided by Functionalization Strategies. *J. Mater. Chem. B*, **2016**, 4, 6164-6174.
- Xu, J.; Liu, Y.; Hsu, S.-H. Hydrogels Based on Schiff Base

- Linkages for Biomedical Applications. *Molecules*, **2019**, *24*, 3005.
22. Cao, L.; Cao, B.; Lu, C.; Wang, G.; Yu, L.; Ding, J. An Injectable Hydrogel Formed by *In Situ* Cross-linking of Glycol Chitosan and Multi-benzaldehyde Functionalized PEG Analogues for Cartilage Tissue Engineering. *J. Mater. Chem. B*, **2015**, *3*, 1268-1280.
23. Liu, J.; Li, J.; Yu, F.; Zhao, Y. X.; Mo, X. M.; Pan, J. F. *In Situ* Forming Hydrogel of Natural Polysaccharides Through Schiff Base Reaction for Soft Tissue Adhesive and Hemostasis. *International J. Biological Macromol.* **2020**, *147*, 653-666.
24. Hifumi, H.; Ewing, A. V.; Kazarian, S. G. Atr-ftir Spectroscopic Imaging to Study the Drying and Dissolution of Pharmaceutical Polymer-based Films. *Int. J. Pharm.* **2016**, *515*, 57-68.
25. Xu, X.; Li, B.; Kennedy, J. F.; Xie, B. J.; Huang, M. Characterization of Konjac Glucomannan-gellan Gum Blend Films and Their Suitability for Release of Nisin Incorporated Therein. *Carbohydr. Polym.* **2007**, *70*, 192-197.
26. Chatterley, A. S.; Laity, P.; Holland, C.; Weidner, T.; Woutersen, S.; Giubertoni, G. Broadband Multidimensional Spectroscopy Identifies The Amide Ii Vibrations In Silkworm Films. *Molecules*, **2022**, *27*, 6275.
27. Fabbriizzi, L. Beauty In Chemistry: Making Artistic Molecules With Schiff Bases. *J. Organic Chem.* **2020**, *85*, 12212-12226.
28. Murphy, C. M.; O'brien, F. J. Understanding the Effect of Mean Pore Size on Cell Activity in Collagen-glycosaminoglycan Scaffolds. *Cell. Adhesion Migration*, **2010**, *4*, 377-381.
29. Wong, R. S. H.; Ashton, M.; Dodou, K. Effect of Crosslinking Agent Concentration on the Properties of Unmedicated Hydrogels. *Pharmaceutics*, **2015**, *7*, 305-319.
30. Maroudas, A. Biophysical Chemistry of Cartilaginous Tissues with Special Reference to Solute and Fluid Transport. *Biorheology*, **1975**, *12*, 233-248.
31. Spiller, K. L.; Maher, S. A.; Lowman, A. M. Hydrogels for the Repair of Articular Cartilage Defects. *Tissue Eng. Part B: Rev.* **2011**, *17*, 281-299.
32. Jin, H.-J.; Park, J.; Karageorgiou, V.; Kim, U.-J.; Valluzzi, R.; Cebe, P.; Kaplan, D. L. Water-stable Silk Films with Reduced β -sheet Content. *Adv. Funct. Mater.* **2005**, *15*, 1241-1247.
33. Zhang, X.; Xiao, L.; Ding, Z.; Lu, Q.; Kaplan, D. L. Engineered Tough Silk Hydrogels Through Assembling β -sheet Rich Nanofibers Based on a Solvent Replacement Strategy. *ACS Nano*, **2022**, *16*, 10209-10218.
34. Hutmacher, D. W. Scaffolds in Tissue Engineering Bone and Cartilage. *Biomaterials*, **2000**, *21*, 2529-2543.
35. Mason, J. M.; Breitbart, A. S.; Barcia, M.; Porti, D.; Pergolizzi, R. G.; Grande, D. A. Cartilage and Bone Regeneration Using Gene-enhanced Tissue Engineering. *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007)*, **2000**, *379*, S171-S178.
36. Bryant, S. J.; Anseth, K. S. Controlling the Spatial Distribution of ECM Components in Degradable PEG Hydrogels for Tissue Engineering Cartilage. *J. Biomed. Mater. Res. Part A: An Official J. Soc. Biomater., Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, **2003**, *64*, 70-79.
37. Williams, C. G.; Kim, T. K.; Taboas, A.; Malik, A.; Manson, P.; Elisseeff, J. *In vitro* Chondrogenesis of Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells in a Photopolymerizing Hydrogel. *Tissue engineering*, **2003**, *9*, 679-688.
38. Lee, H.; Fisher, S.; Kallos, M. S.; Hunter, C. J. Optimizing Gelling Parameters of Gellan Gum for Fibrocartilage Tissue Engineering. *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* **2011**, *98*, 238-245.
39. Brun-graepi, A. K.; Andriola, S.; Richard, C.; Bessodes, M.; Scherman, D.; Merten, O.-W. Thermoresponsive Surfaces for Cell Culture and Enzyme-free Cell Detachment. *Prog. Polym. Sci.* **2010**, *35*, 1311-1324.
40. Zhu, Z.; Ling, S.; Yeo, J.; Zhao, S.; Tozzi, L.; Buehler, M. J.; Omenetto, F.; Li, C.; Kaplan, D. L. High-strength, Durable All-silk Fibroin Hydrogels with Versatile Processability Toward Multifunctional Applications. *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28*, 1704757.
41. Jiang, C.; Wang, X.; Gunawidjaja, R.; Lin, Y.-h.; Gupta, M. K.; Kaplan, D. L.; Naik, R. R.; Tsukruk, V. V. Mechanical Properties of Robust Ultrathin Silk Fibroin Films. *Advanced Functional Materials*, **2007**, *17*, 2229-2237.
42. Gil, E. S.; Hudson, S. M. Effect of Silk Fibroin Interpenetrating Networks on Swelling/deswelling Kinetics and Rheological Properties of Poly(N-isopropylacrylamide) Hydrogels. *Biomacromolecules*, **2007**, *8*, 258-264.
43. Tanaka, F. Thermoreversible Gelation of Associating Polymers. *Phys. A: Statistical Mechanics and Its Appl.* **1998**, *257*, 245-255.
44. Loebel, C.; Rodell, C. B.; Chen, M. H.; Burdick, J. A. Shear-thinning and Self-healing Hydrogels as Injectable Therapeutics and for 3D-printing. *Nat. Protocols*, **2017**, *12*, 1521-1541.
45. Schlichting, K.; Schell, H.; Kleemann, R. U.; Schill, A.; Weiler, A.; Duda, G. N.; Epari, D. R. Influence of Scaffold Stiffness on Subchondral Bone and Subsequent Cartilage Regeneration in an Ovine Model of Osteochondral Defect Healing. *Am. J. Sports Med.* **2008**, *36*, 2379-2391.
46. Guvendiren, M.; Lu, H. D.; Burdick, J. A. Shear-thinning Hydrogels For Biomedical Applications. *Soft Matter*, **2012**, *8*, 260-272.
47. Gong, J. P. Why are Double Network Hydrogels So Tough?. *Soft Matter*, **2010**, *6*, 2583-2590.
48. Sun, J.-Y.; Zhao, X.; Illeperuma, W. R. K.; Chaudhuri, O.; Oh, K. H.; Mooney, D. J.; Vlassak, J. J.; Suo, Z. Highly Stretchable and Tough Hydrogels. *Nature*, **2012**, *489*, 133-136.
49. Vasita, R.; Katti, D. S. Growth Factor-delivery Systems For Tissue Engineering: A Materials Perspective. *Exp. Review Med. Devices*, **2006**, *3*, 29-47.
50. Ren, X.; Zhao, M.; Lash, B.; Martino, M. M.; Julier, Z. Growth Factor Engineering Strategies for Regenerative Medicine Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *7*, 469.
51. Schug, K. A.; Lindner, W. Noncovalent Binding Between Guanidinium and Anionic Groups: Focus on Biological-and Synthetic-based Arginine/guanidinium Interactions with Phosph[on]ate and sulf[on]ate Residues. *Chem. Reviews*, **2005**, *105*, 67-114.
52. Pellaud, J.; Schote, U.; Arvinte, T.; Seelig, J. Conformation and

- Self-association of Human Recombinant Transforming Growth Factor- β 3 in Aqueous Solutions. *J. Biological. Chem.* **1999**, 274, 7699-7704.
53. Tae, G.; Scatena, M.; Stayton, P. S.; Hoffman, A. S. Peg-cross-linked Heparin is an Affinity Hydrogel for Sustained Release of Vascular Endothelial Growth Factor. *J. Biomater. Sci., Polym. Edition*, **2006**, 17, 187-197.
 54. Sawatjui, N.; Damrongrungruang, T.; Leeanansaksiri, W.; Jearanaikoon, P.; Hongeng, S.; Limpaboon, T. Silk Fibroin/gelatin-chondroitin Sulfate-hyaluronic Acid Effectively Enhances *In Vitro* Chondrogenesis of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Mater. Sci. Eng. C*, **2015**, 52, 90-96.
 55. Madappura, A. P.; Madduri, S. A Comprehensive Review of Silk-fibroin Hydrogels for Cell and Drug Delivery Applications in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Computational and Struct. Biotechnol. J.*, **2023**, 21, 4868-4886.
 56. Steward, A. J.; Kelly, D. J. Mechanical Regulation of Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *J. Anatomy*, **2015**, 227, 717-731.
 57. Müller, P.; Langenbach, A.; Kaminski, A.; Rychly, J. Modulating the Actin Cytoskeleton Affects Mechanically Induced Signal Transduction And Differentiation in Mesenchymal Stem Cells. *PLoS One*, **2013**, 8, e71283.
 58. Lefebvre, V.; Huang, W.; Harley, V. R.; Goodfellow, P. N.; De Crombrughe, B. SOX9 is a Potent Activator of the Chondrocyte-specific Enhancer of the Pro α 1 (II) Collagen Gene. *Molecul. Cellular Biology*, **1997**, 17, 2336-2346.
 59. Ng, L.-J.; Wheatley, S.; Muscat, G. E.; Conway-campbell, J.; Bowles, J.; Wright, E.; Bell, D. M.; Tam, P. P.; Cheah, K. S.; Koopman, P. SOX9 Binds Dna, Activates Transcription, and Coexpresses With Type II Collagen During Chondrogenesis in the Mouse. *Developmental Biology*, **1997**, 183, 108-121.
 60. Hattori, T.; Muller, C.; Gebhard, S.; Bauer, E.; Pausch, F.; Schlund, B.; Bosl, M. R.; Hess, A.; Surmann-schmitt, C.; Von Der Mark, H.; De Crombrughe, B.; Von Der Mark, K. SOX9 is a Major Negative Regulator of Cartilage Vascularization, Bone Marrow Formation and Endochondral Ossification. *Development*, **2010**, 137, 901-911.
 61. Matsusaki, M.; Sakaguchi, H.; Serizawa, T.; Akashi, M. Controlled Release of Vascular Endothelial Growth Factor From Alginate Hydrogels Nano-coated With Polyelectrolyte Multilayer Films. *J. Biomat. Sci. Polym. Ed.* **2007**, 18, 775-783.
 62. Ferretti, M.; Marra, K. G.; Kobayashi, K.; Defail, A. J.; Chu, C. R. Controlled *In Vivo* Degradation of Genipin Crosslinked Polyethylene Glycol Hydrogels Within Osteochondral Defects. *Tissue Eng.* **2006**, 12, 2657-2663.
 63. Moiola, Eduardo K.; Mao, J. J. Chondrogenesis Of Mesenchymal Stem Cells by Controlled Delivery of Transforming Growth Factor- β 3. In: 2006 International Conference of the Ieee Engineering in Medicine and Biology Society. *IEEE*, **2006**, 2647-2650.
 64. Singh, A.; Elisseeff, J. Biomaterials For Stem Cell Differentiation. *J. Mater. Chem.* **2010**, 20, 8832-8847.
 65. Lee, J. H.; Kim, P. Y.; Pyun, Y. C.; Park, J.; Kang, T. W.; Seo, J. S.; Lee, D. H.; Khang, G. Cartilage Regeneration Using Transforming Growth Factor-beta 3-loaded Injectable Crosslinked Hyaluronic Acid Hydrogel. *Biomaterials Science*, **2024**, 12, 479-494.

출판자 공지사항: 한국고분자학회는 게재된 논문 및 기관 소속의 관할권 주장과 관련하여 중립을 유지합니다.