

## 실크/PLGA 하이브리드 필름에서 실크가 인간 대동맥 내피세포의 부착과 증식에 미치는 효과

이지혜 · 이소진 · 김슬지 · 김경희 · 김영래 · 송정은 · 이동원<sup>†</sup> · 강길선<sup>†</sup>  
전북대학교 BIN 융합공학과, 고분자 융합소재 연구센터, 고분자 · 나노공학과  
(2012년 7월 6일 접수, 2012년 9월 12일 수정, 2012년 11월 5일 채택)

## Effect of Silk in Silk/PLGA Hybrid Films on Attachment and Proliferation of Human Aortic Endothelial Cells

Jihye Lee, Sojin Lee, Seulji Kim, Kyounghee Kim, Younglae Kim, Jeongeun Song,  
Dongwon Lee<sup>†</sup>, and Gilson Khang<sup>†</sup>

Dept. of BIN Fusion Tech, Polymer Fusion Research Center & Dept. of Polymer Nano Sci Tech, Chonbuk National University,  
567 Baekje-daero, Deokjin, Jeonju 561-756, Korea

(Received July 6, 2012; Revised September 12, 2012; Accepted November 5, 2012)

**초록:** 혈관내피세포는 혈관 안쪽을 덮고 있는 편평한 세포층으로, 혈관의 기능과 혈관평활근세포의 증식을 조절한다. 폴리락타이드글리콜라이드 공중합체(PLGA)는 물성이 좋고 분해속도를 조절하기 좋은 생분해성 합성고분자이며, 여러 형태로 제조하기 쉽다. 누에에서 얻은 실크 피브로인은 18가지 아미노산으로 구성되어 있고 세포의 부착과 세포 기능 유지에 중요하며 화장품, 의료분야 등 다양한 분야에서 응용되고 있다. 본 연구에서는 용매 증발법을 이용하여 0, 10, 20, 40 및 80 wt%의 실크를 이용하여 실크/PLGA 하이브리드 필름을 만들었으며, MTT, SEM, ELISA, 면역세포화학염색법을 실시하였다. 실크/PLGA 하이브리드 필름에서 실크 함량에 따른 인간 대동맥 내피세포의 부착과 증식을 측정하여, 40 wt%의 실크/PLGA 하이브리드 필름에서 세포의 부착과 증식이 가장 높았으며, 이런 결과들은 실크가 세포의 증식에 좋은 영향을 미치고 실크/PLGA 하이브리드 필름의 표면이 인간 대동맥 내피세포의 성장에 알맞은 환경이라는 것을 확인할 수 있었다.

**Abstract:** The vascular endothelial cells are the inner layers of blood vessels. It regulates the function of blood vessels and proliferation of vascular smooth muscle cells. Poly(lactide-co-glycolic acid) (PLGA) is a biodegradable synthetic polymer with a well-controlled degradation rate and an acceptable mechanical strength. It can be easily fabricated into many shapes. Silk consists of 18 amino acids. It found important for attaching cells cultured *in vitro*, and maintaining cell functions. In this study, we fabricated silk/PLGA biomaterial hybrid films of 0, 10, 20, 40 and 80 wt% silk. We performed MTT, SEM, ELISA, and immunocytochemistry analyses. We confirmed the adhesion and the proliferation of HAECs on silk/PLGA according to the content of silk, and 40 wt% silk/PLGA hybrid films have superior adhesion and proliferation properties. These results demonstrate that silk/PLGA hybrid films provide suitable surfaces for HAECs, and there is the effect of silk on cell growth and proliferation.

**Keywords:** human aortic endothelial cells, PLGA, silk, hybrid film.

## 서 론

과거에는 조직과 장기의 손실 또는 손상의 치료로 동종 또는 이종의 조직이나 장기를 이식하였지만 면역학적인 문제와 감염의 위험이 있었다. 이런 문제점의 해결을 위해 연구되어지고 있는 것이 조직공학이다.<sup>1</sup> 조직공학은 인체에서 획득한

조직세포와 적절한 자극요소를 결합하여 만든 생체재료로 제작된 지지체를 이용하여 손상되거나 본래의 기능을 상실한 조직의 세포나 장기를 다시 재생시키거나 건강한 세포로 대체하는 것이다.<sup>2,3</sup> 조직공학을 이용할 때 새로운 장기를 재생하기 위한 필수적인 요소는 세포원, 세포가 부착 및 지지할 수 있는 지지체, 세포의 대사조절을 하는 생체활성분자 등이 있다.<sup>4</sup> 세포이식을 위한 생체재료는 세포의 부착과 증식이 잘 되어야 하며 세포의 기능 또한 보존이 잘 되어야 한다. 이런 생체재료는 조직공학에서 세포의 기능 유지에 도움을 주고

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.  
E-mails: gskhang@jbnu.ac.kr; dlee@jbnu.ac.kr

조직공학 응용에 필수적이다.<sup>5,6</sup>

Poly(lactic-co-glycolic acid)(PLGA)는 polyglycolide(PGA)와 polylactide(PLA)의 공중합체이며, 세포의 부착 및 증식을 유도하고 인체 내에서 생체친화성을 가지며 안전하게 흡수 및 분해되는 조건을 갖춘 생분해성 고분자로서 현재 많이 사용되고 있다. PLGA는 생체 내 가수분해에 의해 젖산과 글리콜산으로 분해되고 결국 이산화탄소와 물로 배출되며,<sup>7</sup> 분자량과 단량체 비율을 조절하여 분해기간을 원하는 대로 조절할 수 있다.<sup>8</sup> 하지만, PLGA는 생분해과정에서 나오는 산성 부산물로 인해 발생하는 염증반응과,<sup>9,10</sup> 소수성 성질로 인한 낮은 세포부착 및 생체활성물질의 결여 및 낮은 세포 활성 등의 단점이 있다.<sup>11</sup>

실크는 전형적인 천연고분자 물질로서 현재 봉합사와 같은 의료용 재료로 사용되고 있다. 실크는 누에의 견사선에서 생합성된 18종의 아미노산으로 구성되며 누에의 토사에 의하여 섬유배열이 결정되고 중심부에 약 75%의 섬유상 단백질인 피브로인과 중심부의 섬유 부분을 싸고 있는 약 25%의 점성이 있는 세리신 두 성분으로 구성된다.<sup>12,13</sup> 실크를 생체의료용 재료로 사용하는 연구가 활발히 진행되고 있는데 이는 세포의 기질과 구조적, 물리적으로 비슷한 실크의 특성이며, 세포부착과 성장을 촉진시키는 좋은 재료로 평가받고 있기 때문이다.<sup>14,15</sup> 실크는 생체 내에서 염증반응을 거의 일으키지 않으면서 높은 세포부착능력과 증식효과로 인해 생체적합성이 뛰어난 생체재료로서 많은 관심을 받고 있다.<sup>16-18</sup> 또한 실크는 곤충을 통하여 대량으로 얻을 수 있으며 특별한 정제 과정을 거치지 않아도 인체 내에서 거부반응이 거의 일어나지 않고 다양한 형태로 성형할 수 있다.<sup>19</sup> 최근 실크에서 염증성 사이토카인인 종양괴사인자(tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )의 방출을 분석한 결과 낮은 염증반응을 확인할 수 있었다.<sup>20</sup>

혈관내피세포는 혈관 운동성 및 투과성, 혈액 응고 및 분해, 염증세포나 혈관평활근세포의 이동 또는 증식을 조절하여 혈관 항상성 유지에 중요하다.<sup>21</sup> 또한 여러 경로를 통하여 혈관의 기능을 국소적으로 조절하며<sup>22</sup> 혈관 활성호르몬을 활성화시키거나 분해시키는 효소들을 포함한다.<sup>23,24</sup> 혈관내피세포가 손상되면 지질의 침착, 혈관평활근세포의 증식, 혈소판 및 백혈구의 접착, 염증세포의 침윤 및 심각한 혈관확장기능 이상을 유발시킨다.<sup>25</sup>

본 연구에서는 인간 대동맥 내피세포에 실크가 미치는 영향을 확인하기 위해 생체활성이 결여된 PLGA의 단점을 실크의 뛰어난 생체적합성을 이용하여 보완한 실크/PLGA 하이브리드 필름을 함량별로 제조하여 인간 대동맥 내피세포를 파종하여 확인하고자 하였다.

## 실 험

**실크 준비.** 천연 고분자인 *Bombyx mori* 유래의 실크는 동

국대학교 생명과학연구팀(Molecular Biology Laboratory, Dongguk University)에서 제공받아 사용하였다. 실크생사를 작은 조각으로 자르고 세리신을 제거하기 위해 3 wt% 농도의  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  수용액에서 1시간 동안 가열하고 걸러내어 뜨거운 물로 실크가 흰색이 될 때까지 행구어 주고  $\text{CaCl}_2$ 와 에탄올이 포함되어 있는 3차 증류수에 넣고 100 °C에서 2시간 동안 가열한 뒤 3일 동안 투석막(dialysis tubing cellulose membrane, Sigma, USA)을 사용하여 탈미네랄화 시킨다. 투석 후 동결건조한 뒤, 믹서기로 분쇄한 실크를 동결분쇄기(SPEX SamplePrep, Metuchen, NJ, USA)에 넣어 180  $\mu\text{m}$  이하의 분말을 얻었다.

**시약 및 재료.** PLGA(락타이드/글라이콜라이드 몰비 75:25, Resomer® RG 756, Boehringer Ingelheim Chem, Germany)는 평균 분자량 90000 g/mole인 것을 사용하였으며, 메틸렌 클로라이드(MC, Tedia Co In, Phillipsburg, USA)와 이외의 모든 화학약품 및 유기용매는 HPLC 등급으로 사용하였다.

**실크/PLGA 하이브리드 필름 제조.** 실크/PLGA 하이브리드 필름은 용매 증발법을 이용하여 제조하였다. PLGA 0.3 g을 6 mL의 MC에 넣어 용해시킨 후 PLGA 증량의 0, 10, 20, 40 및 80 wt%에 해당하는 실크를 첨가하여 균일하게 혼합하였다(Table 1). 상기의 PLGA와 실크가 혼합된 분산용액(실크/PLGA)을 직경이 50 mm인 유리 접시에 도포하고 잔존 유기용매를 제거하기 위해 상온에서 2~3일 건조시켰다(Figure 1, 2).

**세포 및 배양.** 인간 대동맥 내피세포(HAECs)는 Lonza (USA)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 세포는 MCDB medium 131 liquid(Gibco, USA)와 5% 우태아혈청(FBS, Gibco, USA) 및 1% 항생제(100 units/mL 페니실린과 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  스트렙토마이신), 1% L-glutamine, 0.001 mg/mL Hydrocortizone, 0.002  $\mu\text{g}/\text{mL}$  fibroblast growth factor(FGF), 0.010  $\mu\text{g}/\text{mL}$  epidermal growth factor(EGF), 0.002  $\mu\text{g}/\text{mL}$  insulin-like growth factor(IGF), 0.001  $\mu\text{g}/\text{mL}$  vascular endothelial growth factor(VEGF), 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ascorbic acid가 함유된 배양액으로 37 °C, 5%  $\text{CO}_2$  조건에서 배양하였다. 배양액은 3일에 한 번씩 갈아주어 세포가 80% 정도 증식되었을 때

**Table 1. Processing Conditions for Fabrication of Silk/PLGA Hybrid Films**

Silk content		Size of silk ( $\mu\text{m}$ )	PLGA (g)	MC (mL)
(wt%)	(g)			
0	0			
10	0.03			
20	0.06	< 180	0.3	6
40	0.12			
80	0.24			

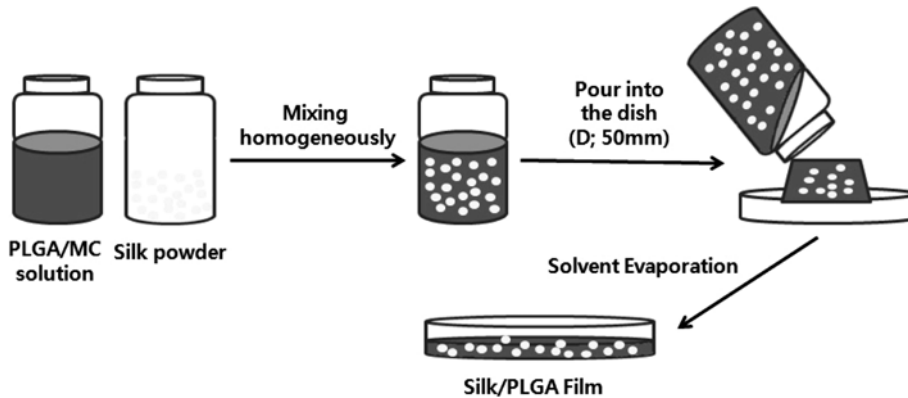


Figure 1. Fabrication process of silk/PLGA hybrid films by solvent evaporation method.

	PLGA	Silk 10%	Silk 20%	Silk 40%	Silk 80%
Morphology					
Thickness (mm)	0.07	0.10	0.12	0.15	0.20

Figure 2. Gross pictures of PLGA and silk/PLGA hybrid films with thickness values of PLGA and silk/PLGA hybrid films.

계대배양하였고, 6대째 세포를 사용하였다.

**접촉각 측정.** 지지체의 친수성은 세포의 초기 부착물에 영향을 미치고, 이는 세포의 증식이 향상되는 결과로 사용되며<sup>26</sup> 실크/PLGA 하이브리드 필름의 친수성을 평가하기 위해 증류수를 떨어뜨려 접촉각을 측정하였다. 물접촉각 측정기 (Tantec™, CAM-PLUSmicro, USA)를 이용하여 각각의 필름에 10 µL의 증류수를 떨어뜨려 시료의 표면과 물방울이 이루는 각도를 측정하였다. 일반적으로 시료와 물방울이 이루는 각도가 클수록 소수성을 띠며 각도가 작을수록 친수성을 나타낸다. 각 시료에서 무작위로 영역을 선택하여 5회 분석을 실시한 후 평균값을 취하여 사용하였다. 또한 시료의 시간별 물 흡수정도를 측정하기 위해 증류수를 떨어뜨리고 0, 5, 10, 15 및 20분 간격으로 접촉각을 측정하여 물 흡수성 정도를 확인하였다.

**세포 증식률 분석.** 실크/PLGA 하이브리드 필름에서 HAECs의 부착도 및 증식률을 알아보기 위하여 미토콘드리아의 탈수소 효소작용에 의하여 청자색을 띠는 비수용성의 MTT 포마준(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, Sigma, USA) 분석법으로 확인하였다. 2×10<sup>4</sup> 세포/필름농도로 파종하고 1, 4 및 7일 배양한 후 배양액을 정확히 1 mL씩 교환한 후 MTT 시약(50 mg/mL)을 100 µL씩 넣고 4시간 동안 배양한다. 4시간 후 배양액을 제거하고 각 well에 디메틸설폭사이드(DMSO, Sigma, USA)를 1 mL씩 넣고 결정이

다 녹을 때까지 초음파세척기로 1시간 동안 용해시켰다. 용액을 피펫팅하여 96-well에 100 µL씩 넣고 흡광도 측정을 위해 ELISA 플레이트 리더(E-max, Molecular Device, USA)를 이용해 570 nm의 파장에서 측정하였다.

**세포 부착형태 분석.** 실크/PLGA 하이브리드 필름에서 HAECs의 부착 및 형태를 알아보기 위해 SEM(Model S-2250N, Hitach Co., Tokyo, Japan)을 이용하여 이미지를 측정하였다. 실크/PLGA 하이브리드 필름에 2×10<sup>4</sup> 세포/필름농도로 파종 후, 1, 4 및 7일 배양한 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척하였다. 이를 2.5% 글루타르알데하이드(Sigma, USA)로 24시간 고정시킨 후 알코올 구배용액(50, 60, 70, 80, 90 및 100%)을 이용하여 각 30분씩 탈수과정을 진행하였다. 각 시료를 잘라 샘플폴더에 고정시키고 플라즈마 스퍼터(Emscope, Model SCs 500K, UK)를 이용하여 아르곤 가스 하에서 약 200 µm의 두께로 백금코팅을 실시한 후 주사 전자 현미경 Bio-LV SEM(SN-3000 Hitachi, Japan)을 이용하여 각각 다른 농도의 실크/PLGA 하이브리드 필름에서 시간에 따른 세포의 부착 거동을 관찰하였다.

**염증 사이토카인 분석.** 실크/PLGA 하이브리드 필름으로 생성된 염증의 정도와 세포배양 후 분비되는 염증 매개 사이토카인 TNF-α(BD opt EIA™ TNF-α ELISA set; 10600 pg/mL)의 농도를 측정하여 비교 분석하기 위해 효소면역검사(ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay)를 시행하였다.

PLGA 필름과 실크/PLGA 하이브리드 필름에 HAECs를  $2 \times 10^4$  세포/필름농도로 파종하였으며 양성대조군으로는 HAECs와 염증 유발 물질인 리포폴리사카라이드(Sigma, USA)를 TCP(tissue culture plate)에서 함께 배양하였으며 음성대조군으로는 HAECs 만을 배양하였다. 파종 후 4일간 배양하였으며, 배양액을 취하여 원심분리(10000 rpm, 15분)하여 얻은 상층액을  $-80^\circ\text{C}$ 에서 동결하였다. 효소면역검사를 실행하고 시료 회수 후 96 well plate에 100  $\mu\text{L}$ 씩 옮겨 ELISA 플레이트 리더를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**면역세포화학적 염색.** 각각의 필름에서 배양한 세포의 증식을 비교하고 HAECs에서 특이적으로 발현하는 단백질을 확인하고자 VE-cadherin을 이용하여 면역화학염색을 수행하였다. 염색은 3-amino-9-ethyl carbazole(ACE) 방법으로 수행되었다. 실크/PLGA 하이브리드 필름에 HAECs를  $2 \times 10^4$  세포/필름농도로 파종하여 1, 4 및 7일 배양한 후 PBS로 세척하고 10% 포르말린 용액으로 고정하여  $4^\circ\text{C}$ 에서 하루 동안 보관하였다. 24시간 반응 후 각 시료에 희석액과 100대 1로 희석시킨 rabbit VE-cadherin(Santa Cruz Biotechnology, California, USA) 항체를 넣고 1시간 동안 반응, 2차 항체로 anti-rabbit immunoglobulin antibody(Immunotech, France)를 첨가하여 다시 반응시켰다. 그 후, avidin-biotin-peroxidase(Immunotech, France)를 넣고 실온에서 30분 동안 반응시키고 chromogen(Immunotech, France)로 발색시킨 후 현미경을 통하여 100 배율에서 관찰한다.

**mRNA 분리 및 RT-PCR.** HAECs의 특이적 발현 유전자의 발현 정도를 확인하고자 역전사 증합효소연쇄반응(RT-PCR)을 수행하였다. 실크/PLGA 하이브리드 필름에 세포를 파종한 후 정해진 날짜에 1 mL의 Trizol(Invitrogen, USA)을 첨가하여 5분 동안 배양한 후 1.5 mL의 튜브에 넣어 200  $\mu\text{L}$ 의 chloroform(Sigma, USA)을 첨가하고  $4^\circ\text{C}$ , 12000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 RNA를 분리하였다. 상층액을 취하여 500  $\mu\text{L}$ 의 isopropanol(Sigma, USA)과 5  $\mu\text{L}$ 의 Polyacryl Carrier™(Molecules Res)로 RNA를 침전시켰다. 분리된 RNA에 Oligo(dT) primer(Invitrogen, USA), 5X first strand buffer(Invitrogen, USA), dNTP(dGTP, dATP, dTTP, dCTP, Gibco,

USA), RNase inhibitor(Invitrogen, USA), SuperScript™ RNase H reverse transcriptase(Invitrogen, USA) 및 DNase/RNase free water(Gibco, USA)를 첨가하여 authorized thermal cycler(TP 600, Takara Bio Inc., Japan)를 통하여 cDNA로 역전사시켰고, 이렇게 역전사시킨 cDNA를 2 unit Taq DNA polymerase를 포함한 PCR master kit(Roche, Germany)를 이용하여 각 primer(GAPDH, eNOS, PECAM-1, KLF<sub>2</sub>)를 신장시켜 원하는 DNA의 특정 영역을 증폭시켰다. Primer 염기서열 조건은 Table 2에 나타내었다. PCR 후 증폭된 DNA를 1.5 w/v% 아가로스겔(Sigma, USA)에 100 V에서 25분 동안 전기영동을 한 후, 상대적 발현을 SYBR 녹색형광(SYBR™, Green Nucleic Acid Gel Stain, Cambrex, UK)으로 시각화하였으며, 300 nm 자외선 조사기(Vilber Lourmat ETX-20.M, France)로 촬영하여 RNA의 발현정도를 확인하였다.

**통계학적 분석.** 각 실험의 통계학적 분석은 Student's t-test를 시행하여 *p*값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 것으로 하였다.

## 결과 및 토론

**친수성 평가.** 실크/PLGA 하이브리드 필름에 증류수를 떨어뜨려 접촉각을 측정하였다. 시료와 물방울이 이루는 각도가 작을수록 친수성을 나타내고 측정한 결과를 Figure 2에 나타내었다. PLGA 필름의 표면은 소수성 성질을 띠고 있기 때문에 친수성인 물을 이용한 접촉각 측정에서 가장 높은 접촉각을 보였다. 실크/PLGA 하이브리드 필름은 실크의 함량이 높아질수록 낮은 접촉각을 보였다. 실크함량에 수분 친수성의 차이가 나타나는 이유는 글리신, 알라닌 등 18종의 아미노산이 다양하게 존재하는 실크가<sup>27</sup> PLGA와 혼합되어 필름의 수분 흡수율을 증가시킨 것으로 사료된다. 따라서 필름 위에 세포를 파종해 배양할 경우 PLGA는 세포와 필름 사이에 직접적인 상호작용이 이루어지지 않지만 실크/PLGA 하이브리드 필름에서는 실크가 PLGA의 소수성을 보완하여 수분 흡수율을 증가시키고<sup>17</sup> 세포와의 친화력으로 세포의 부착을 돕고 실크에 포함되어 있는 여러 사이토카인으로 세포활성을

**Table 2. Primers and Protocol for Thermal Cycling**

Transcript	<i>T<sub>m</sub></i> (°C)		Sequences	Fragment size (bp)
GAPDH	56.7	Forward:	ACC ACA GTC CAT GCC ATC A	450
		Reverse:	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA	
PECAM-1	62	Forward:	GTC GGA CAG TGG GAC GTA TAT CT	143
		Reverse:	ACT TCG ATG GTC TGT CCT TTT ATG A	
eNOS	60	Forward:	AAT CCT GTA TGG CTC CGA GA	119
		Reverse:	GGG ACA CCA CGT CAT ACT CA	
KLF <sub>2</sub>	66	Forward:	CAT GTG CCG TTT CAT GTG CAG C	224
		Reverse:	AGA CCT ACA CCA AGA GTT CGC ATC	

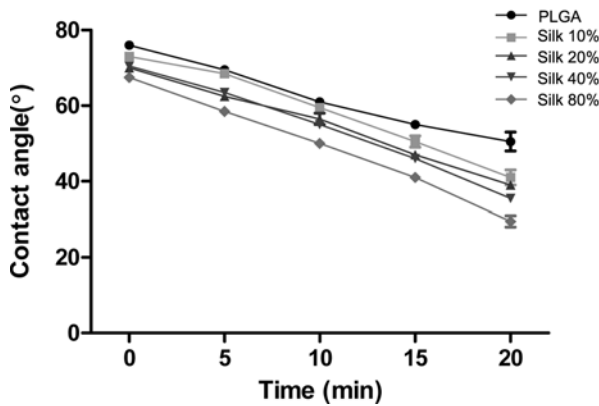


Figure 3. Contact angles of PLGA film and silk/PLGA (0, 10, 20, 40 and 80%) hybrid films.

증가시켜 활발한 세포증식을 유도할 것으로 사료된다.

**세포 증식을 확인.** 세포 독성검사인 MTT 분석을 통하여 실크 함량에 따른 실크/PLGA 하이브리드 필름 표면에서 HAECs의 부착 및 증식 정도를 확인하기 위해 1, 4 및 7일째에 관찰하였고 그 결과를 Figure 3에 나타내었다. 분석 결과 PLGA 필름보다 실크/PLGA 하이브리드 필름에서 높은 세포 성장률을 관찰할 수 있었다. 세포 증식 정도는 모든 실크/PLGA 하이브리드 필름에서 PLGA 필름보다 높은 부착을 보였고 특히 40 wt% 실크/PLGA 하이브리드 필름에서 가장 높은 성장을 나타내었다. 실크/PLGA 하이브리드 필름에서는 세포가 시간이 지남에 따라 경향성 있게 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 이와 같은 결과는 세포가 PLGA 필름에서는 소수성 성질에 의하여 필름에 부착하기 어렵고 PLGA가 분해되면서 내놓는 산 때문에 세포가 잘 자랄 수 있는 환경으로 적합하지 않은 것으로 사료된다. 반면에, 실크/PLGA 하이브리드 필름에서는 실크가 세포와 친화력이 있는 재료이고 PLGA보다 상대적으로 낮은 계면에너지지를 가져 수분친화력이 강하기 때문에 세포의 부착을 돕고<sup>28-30,32</sup> 실크에 포함되어 있는 사이토카인이 세포 활성을 증가시켜 활발한 세포 증식을 유도한 것으로<sup>31</sup> 사료된다.

**세포 부착형태 확인.** 실크 함량에 따른 실크/PLGA 하이브리드 필름화 표면에서 HAECs의 부착도, 세포의 형태 및 증식을 육안으로 관찰하기 위해 SEM을 이용하였고 그 결과를 Figure 4에 나타내었다. 배양 1일째에 필름에서의 세포 부착을 관찰했을 때 PLGA 필름에서는 세포의 초기 부착률이 낮아 세포들이 간격을 두고 떨어져 있는 모습이 관찰되어 세포-세포간 상호작용이 적을 것이 예상되었으며, 배양 4, 7일째에도 PLGA 필름에서의 세포 증식률이 실크/PLGA 하이브리드 필름에서보다 낮았다. 실크/PLGA 하이브리드 필름에서 세포의 초기 부착률은 40 wt% 실크/PLGA 하이브리드 필름에서 가장 높았으며, 10, 20 그리고 80 wt% 실크/PLGA 하이브리드 필름에서는 비슷한 세포 부착을 보였으며 모두 필

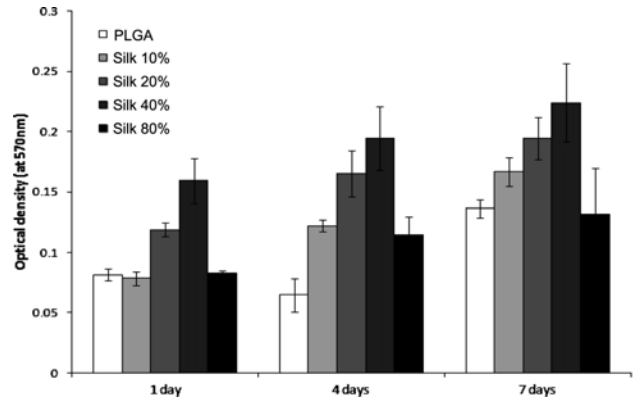


Figure 4. Cell proliferation of HAECs on PLGA and silk/PLGA hybrid films analyzed by MTT assay on 1, 4 and 7 days post-seeding.

름에 잘 부착된 형태를 확인할 수 있었다. 10, 20, 특히 40 wt% 실크/PLGA 하이브리드 필름에서 초기 부착뿐만 아니라 시간이 지남에 따라 세포가 안정화됨은 물론 세포가 잘 증식하는 것도 육안으로 관찰할 수 있었다. 이는 세포의 부착 환경이 표면의 거칠기와 수분 친화도의 상호작용과 관련이 있고,<sup>28-30,32</sup> 실크가 PLGA보다 강한 수분 친화력을 가지고 있기 때문으로 사료된다.

**염증반응.** 실크 함량에 따른 실크/PLGA 하이브리드 필름의 염증 완화 정도를 측정하기 위해 ELISA 분석법을 이용하여 TNF- $\alpha$ 의 방출을 비교, 분석하였고 그 결과를 Figure 5에 나타내었다. TNF- $\alpha$ 는 생체 내에서 여러 사이토카인으로 인한 산화적 스트레스로 인해 촉진되는 염증반응을 유도하는 유전자이며<sup>33</sup> 염증단계에서 중추적 역할을 한다고 알려져 있다.<sup>34</sup> TNF- $\alpha$  단백질은 음성 대조군에서 아주 낮게, 양성 대조군에서는 아주 높게 검출되었다. 양성 대조군과 비교하여 PLGA 필름에서 낮은 농도의 TNF- $\alpha$  단백질이 검출되었고 이는 백혈구나 혈관세포에 작용하여 항원이 제거된 것으로 예상된다. 함량별 실크/PLGA 하이브리드 필름도 양성 대조군과 비교하여 아주 낮은 농도의 TNF- $\alpha$  단백질이 검출되었고 이는 PLGA 필름에서의 검출량보다 낮은 수치를 보였다. 이 결과에서 실크 함량이 높을수록 TNF- $\alpha$  단백질이 낮게 검출되었고, 특히 80 wt% 실크/PLGA 하이브리드 필름에서는 음성 대조군과 비슷하게 검출되어 실크가 TNF- $\alpha$  단백질의 생성을 억제한다는 것을 알 수 있었다.

**특정 단백질 발현확인.** HAECs에서 발현되는 특정한 단백질 발현을 확인하고 각각의 필름에서 배양한 세포의 증식을 비교하기 위해서 HAECs를 배양한 PLGA 필름과 실크/PLGA 하이브리드 필름에 AEC 방법을 이용하여 면역세포화학적 염색을 수행하였다. 내피세포에서 많이 발현되는 VE-cadherin을 1차 항체로 사용하여 HAECs를 관찰하였고 염색을 통해 나온 결과를 Figure 6에 나타내었다. PLGA 필름과 함량별 실크/PLGA 하이브리드 필름을 비교하였을 때 PLGA 필름과

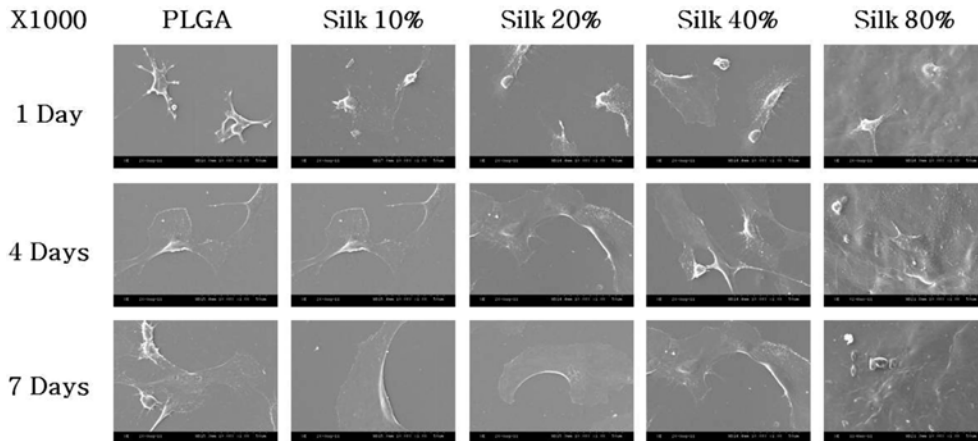


Figure 5. SEM microphotography of adhered HAECs on the surfaces of PLGA and silk/PLGA hybrid films.

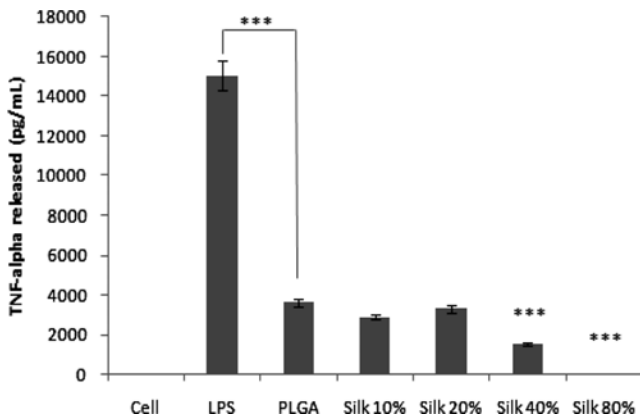


Figure 6. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to investigate TNF- $\alpha$  as a cytokine involved in systemic inflammation.

10, 20 wt% 실크/PLGA 하이브리드 필름에서는 다른 함량에 비해 발색이 약하게 나타나는 것을 Figure 7에서 확인할 수 있었다. 발색은 40 wt%에서 가장 넓게 분포되어 있었고, 실크 함량이 높은 실크/PLGA 하이브리드 필름일수록 발색이

더 진하고 선명하게 된 것을 확인할 수 있었다. 이는 실크가 세포의 부착에 미치는 영향으로 실크/PLGA 하이브리드 필름에서 더 많은 세포가 부착 및 증식하는 것으로 사료된다.

**mRNA 발현확인.** 실크가 함유된 PLGA 필름에서 실크가 HAECs의 mRNA에 주는 영향을 확인하고자 각 필름에 세포를 파종한 후 4일째에 RNA 분리 및 RT-PCR을 수행하였다. NO(nitric oxide) 생성 효소인 eNOS(endothelial NOS)와 ERK-5(extracellular signal-regulated kinase 5)라는 효소에 의해 활성화되는 KLF<sub>2</sub>(Krüppel-like factor 2), 세포부착분자인 PECAM-1(platelet-endothelial cell adhesion molecule-1)의 mRNA 발현정도를 확인하여 housekeeping gene인 GAPDH의 밴드와 표준화하여 Figure 8에 나타내었다. 혈관이완과 혈소판 응집, 심혈관 항상성의 메카니즘 조절과 관련 있는 NO 생성효소인 eNOS의 발현을 측정된 결과 실크/PLGA 하이브리드 필름보다 PLGA 필름에서 eNOS의 발현이 현저히 낮았다. 이는 PLGA 필름보다 실크/PLGA 하이브리드 필름에서 세포 내 NO 생성력이 더 우수한 것으로 볼 수 있다. 빠른 혈액의 흐름은 ERK-5라는 효소를 활성화시키고, 활성화된 ERK-5는 eNOS를 통해 NO를 생성하여 혈관을 확장시킨다. 또

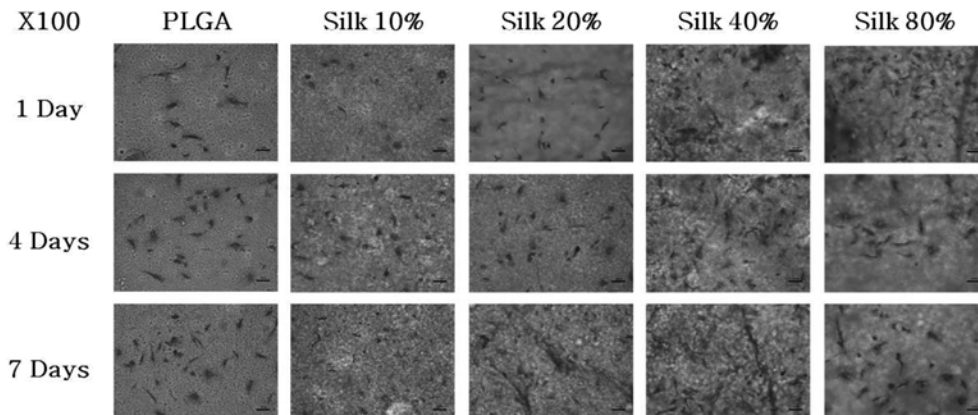
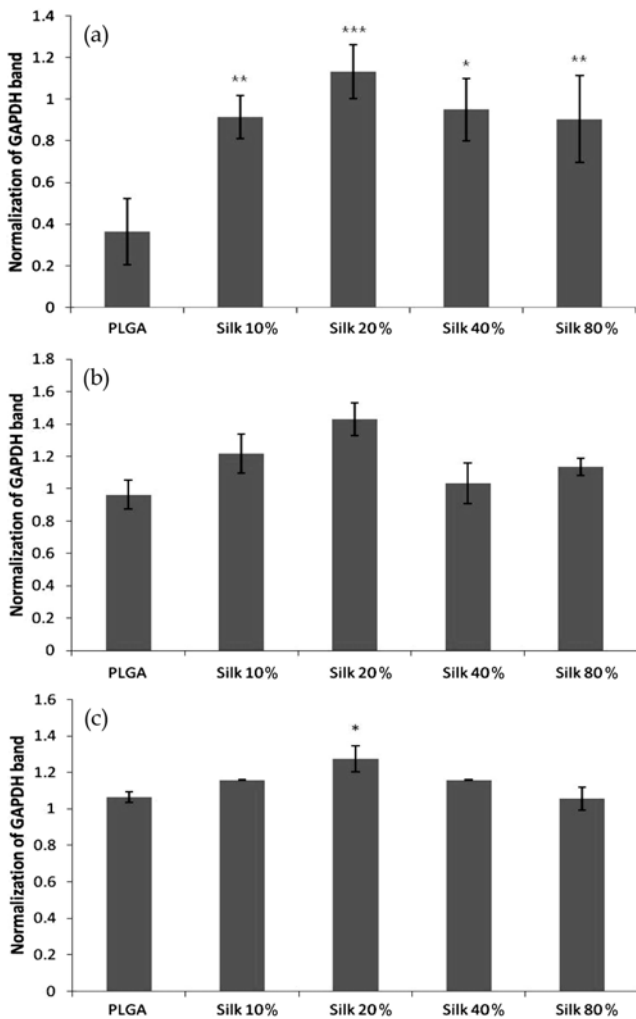


Figure 7. Immunocytochemical staining of HAECs on PLGA and silk/PLGA hybrid films after 1, 4 and 7 days.



**Figure 8.** Relative gene expression amounts of eNOS normalized by the intensity of GAPDH mRNA on PLGA and silk/PLGA hybrid films(\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001): (a) eNOS; (b) KLF<sub>2</sub>; (c) PECAM-1.

ERK-5는 KLF<sub>2</sub>를 활성화시켜 손상된 혈관 벽에 염증성 면역세포가 달라붙는 것을 차단한다. 이 KLF<sub>2</sub>의 발현을 확인해 본 결과 PLGA 필름보다 실크/PLGA 하이브리드 필름에서 더 많이 발현되고 특히 20 wt%의 실크/PLGA 하이브리드 필름에서 가장 높았다. 혈관내피세포에서만 발현되고 혈관 내 백혈구가 손상된 조직으로 가는 과정에 중요한 작용을 하는 혈소판 내피세포부착 분자인 PECAM-1도 20 wt% 실크/PLGA 하이브리드 필름에서 가장 많이 발현됐다.

## 결론

PLGA는 세포의 부착 및 증식을 유도하고 생체친화성을 가지며 분자량과 단량체 비율을 조절하여 분해기간을 조절할 수 있는 생분해성 고분자이다. 하지만, PLGA의 생분해과정

에서 나오는 산부산물로 인한 염증반응, 소수성 성질로 인한 낮은 세포 부착, 생체활성물질의 결여 및 낮은 세포 활성 등의 단점을 가진다. 이런 PLGA의 단점 보완과 생체 활성의 부여, 세포 활성을 높이기 위해 천연고분자인 실크를 첨가하여 용매 증발법으로 실크/PLGA 하이브리드 필름을 제조하였다. 실크는 전형적인 천연고분자 물질로 세포의 기질과 구조적, 물리적으로 비슷하며, 세포부착과 성장 촉진, 낮은 염증반응과 높은 세포부착능력으로 생체재료로서 많은 관심을 받고 있다. 세리신을 제거한 재생 실크 피브로인은 얇은 필름이나 3차원 지지체로 사용이 가능하며 여러 조직 공학적 응용에 적합한 물질로 연구되고 있다.<sup>35</sup>

본 연구에서는 실크/PLGA 하이브리드 필름이 HAECs의 부착 및 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실크를 함량별로 첨가하여 실크/PLGA 하이브리드 필름을 만들었고, 세포를 파종하여 MTT, SEM, ELISA, 면역세포화학적 염색, RT-PCR 측정을 하였다. 실험 결과 PLGA 필름보다 실크/PLGA 하이브리드 필름에서 세포의 부착과 증식률이 좋았으며 그 중에 40 wt% 실크/PLGA 하이브리드 필름이 가장 우수한 것을 확인하였다. 또한 염증 사이토카인의 정량화를 위한 ELISA 분석 결과 염증유발자인 TNF- $\alpha$ 의 방출이 실크 함량이 높은 필름일수록 낮은 수치를 보였고, RT-PCR을 통한 eNOS, KLF<sub>2</sub>, PECAM-1의 발현도 PLGA 필름보다 실크/PLGA 하이브리드 필름에서 더 높은 수치를 나타냈다. 이런 결과들을 통해 실크가 PLGA의 단점을 보완하고 세포의 부착과 증식에 긍정적인 영향을 미치며, 실크/PLGA 하이브리드 필름이 조직공학적 응용이나 재생에 좋은 생체재료라고 판단된다.

**감사의 글:** 본 연구는 세계수준의 연구중심대학(WCU R31-20029)과 근골격계바이오장기센터(A040003) 및 세포응용사업단(SC4110)의 연구지원에 의하여 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

## 참고 문헌

1. H. N. Park, J. B. Lee, and I. K. Kwon, *Int. J. Tissue Reg.*, **1**, 10 (2010).
2. R. Langer and D. A. Tirrell, *Nature*, **428**, 487 (2004).
3. J. H. Lee, S. J. Park, H. J. Chun, and C. H. Kim, *Int. J. Tissue Reg.*, **1**, 1 (2010).
4. S. Petit-Zeman, *Nature Biotech.*, **19**, 201 (2001).
5. A. Atala, *J. Endourol.*, **14**, 49 (2000).
6. N. Zhang, H. Yan, and X. Wen, *Brain Res. Reviews*, **49**, 48 (2005).
7. G. Khang, E. K. Jeon, J. M. Rhee, I. Lee, S. J. Lee, and H. B. Lee, *Macromol. Res.*, **11**, 334 (2003).
8. X. S. Wu, in *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, Part A: Materials*, D. L. Wise, D. J. Trantolo, D.

- E. Altobelli, M. J. Yaszemski, J. D. Gresser and E. R. Schwartz, Editors, Marcel Dekker, New York, Vol 1, p 1015 (1995).
9. E. I. Shishatskaya, T. G. Volova, A. P. Puzyr, O. A. Mogilnaya, and S. N. Efremov, *J. Mater. Sci : Mater. Med.*, **15**, 719 (2004).
  10. T. Volova, E. Shishatskaya, V. Sevastianov, S. Efremov, and O. Mogilnaya, *Biochem. Eng. J.*, **16**, 125 (2003).
  11. Y. Iwasaki, S. Sawada, N. Nakabayashi, G. Khang, H. B. Lee, and K. Ishihara, *Biomaterials*, **20**, 2185 (1999).
  12. N. Minoura, S. Aiba, Y. Gotoh, M. Tsukada, and Y. Imai, *J. Biomed. Mater. Res.*, **29**, 1215 (1995).
  13. G. Altman, R. L. H. Horan, J. Moreau, I. Martin, J. Richmond, and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, **23**, 4131 (2002).
  14. D. H. Reneker and I. Chun, *Nanotechnology*, **7**, 216 (1996).
  15. O. J. Lee, J. M. Lee, H. J. Jin, and C. H. Park, *Int. J. Tissue Reg.*, **1**, 68 (2010).
  16. N. Minoura, M. Tsukada, and M. Nagura, *Polymer*, **31**, 265 (1990).
  17. N. Minoura, S. Aiba, M. Higuchi, Y. Gotoh, M. Tsukada, and Y. Imai, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **208**, 511 (1995).
  18. M. Santin, A. Motta, G. Freddi, and M. Cannas, *J. Biomed. Mater. Res.*, **46**, 382 (1999).
  19. H. Y. Kweon and C. S. Cho, *Int. J. Indust. Entomol.*, **3**, 1 (2001).
  20. B. Panilaitis, G. H. Altman, J. Chen, H. J. Jang, V. Karageorgiou, and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, **24**, 3079 (2003).
  21. B. M. Egan, G. Lu, and E. L. Greene, *PLEFA*, **60**, 411 (1999).
  22. Z. J. Bosnjak, *Anesthesiology*, **79**, 1392 (1993).
  23. R. F. Furchgott, *Circ. Res.*, **53**, 557 (1983).
  24. V. J. Dzau, *Am. J. Med.*, **77**, 31 (1984).
  25. H. O. Steinberg, M. Tarshoby, R. Monestel, G. Hook, J. Cronin, A. Johnson, B. Bayazeed, and A. D. Baron, *J. Clin. Invest.*, **100**, 1230 (1997).
  26. H. L. Kim, H. N. Yoo, H. J. Park, Y. G. Kim, D. W. Lee, Y. S. Kang, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **35**, 7 (2011).
  27. H. Liu, H. Fan, Y. Wang, S. L. Toh, and J. Goh, *Biomaterials*, **29**, 662 (2008).
  28. J. K. Park, *NICE*, **21**, 613 (2003).
  29. D. J. Mooney, L. Cima, R. Langer, L. K. Hansen, D. E. Ingber, and J. P. Vacanti, *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.*, **252**, 345 (1992).
  30. A. G. Mikos and J. S. Temenoff, *Elec. J. Biotech.*, **3**, 1 (2000).
  31. E. H. Jo, S. J. Kim, S. J. Cho, G. Y. Lee, O. Y. Kim, E. Y. Lee, W. H. Cho, D. W. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **35**, 289 (2011).
  32. J. C. Keller, G. B. Schneider, C. M. Stanford, and B. Kellogg, *Implant Dentistry*, **12**, 175 (2003).
  33. P. A. Baeuerle and T. Henkel, *Annu. Rev. Immunol.*, **12**, 141 (1994).
  34. N. Y. Kim, H. J. Kim, J. H. Lee, E. K. Lee, O. H. Kang, D. Y. Kwon, H. S. So, K. N. Lee, and M. S. Chong, *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, **25**, 227 (2011).
  35. M. K. Sah and K. Pramanik, *IJESD*, **1**, 404 (2010).