

## 농도별 실크스펀지에 따른 피부재생 영향 평가

신재훈 · 이대훈 · 송정은 · 조성준 · 박찬흠\* · 강길선†

전북대학교, BIN융합공학과, 고분자나노공학과, 고분자융합소재연구소

\*한림대학교 의과대학 춘천성심병원 이비인후과

(2016년 3월 21일 접수, 2016년 5월 4일 수정, 2016년 8월 2일 채택)

## Effect of Silk Sponge Concentrations on Skin Regeneration

Jae Hun Shin, Dae Hoon Lee, Jeong Eun Song, Sung Jun Cho, Chan Hum Park\*, and Gilson Khang†

Dept. of BIN Convergence Tech & Dept. of PolymerNanoSci Tech, Chonbuk National University, 567 Baekje-daero, Jeonju 54898, Korea

\*Dept. of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Chuncheon Sacred Heart Hospital, School of Medicine, Hallym University, 77 Sakju-ro, Chuncheon 24253, Korea

(Received March 21, 2016; Revised May 4, 2016; Accepted August 2, 2016)

**초록:** 실크는 천연 생체재료로, 낮은 염증성, 우수한 생체적합성을 가지고 있으며, 다양한 형태로 제조할 수 있다. 본 연구에서는 피부 재생에 있어, 실크 지지체의 효과를 확인하고자 *in vitro*와 *in vivo* 환경에서 실험을 진행하였다. 실크 지지체는 1, 2 및 3%의 스펀지 형태로 동결건조하여 제조하였고, 실크 지지체의 특성을 위해 SEM, FTIR 분석을 실시하였다. 세포 부착 및 증식은 MTT 분석, 염증반응은 RT-PCR을 통해 확인하였다. 또한 피부재생 효과는 전층 결손을 유발시킨 마우스 모델에 실크 지지체를 이식한 뒤 적출하여, 조직학적 평가를 통해 확인하였다. 그 결과, 상처 치유에 있어, 실크 지지체의 응용 가능성을 확인하였다.

**Abstract:** Silk is a well-studied biomaterial, possessing low immunity, high biocompatibility, and easy fabrication into various forms for several clinical applications. Herein, we have performed an *in vitro* (NIH/3T3 cells) and *in vivo* (rat models) study on silk sponges' efficacy for skin regulation. The silk sponges were fabricated with 1, 2 and 3% silk contents via freeze-drying. All the samples physical characteristics were examined by FESEM and FTIR. *In vitro* biological properties including cell adhesion, proliferation and inflammation were confirmed by MTT assay and RT-PCR. Furthermore, the skin regeneration efficiency was examined by histological assessment, where the silk sponges were implanted at full thickness skin wounds in rat models. Considering all the obtained results, the silk sponges can be envisioned as a potential biomaterial for wound healing applications.

**Keywords:** skin regeneration, silk, inflammatory responses, scaffold.

## 서 론

피부는 신체의 외부를 덮고 있는 기관으로, 크게 표피와 진피 그리고 피하조직으로 구성되어 있다. 표피는 체내의 수분 침투를 억제하고, 바이러스 및 균의 감염에 대한 장벽역할을 한다. 진피는 표피 아래에 분포하고 있으며 주로 콜라겐 섬유와 탄력섬유 등의 기질 단백질들로 구성되어 있다.<sup>1-4</sup> 피부의 주요 기능은 피부에 있는 샘(gland)과 혈관, 지방조직은 체온 조절 및 체내 물질 대사, 노폐물 배설 등에 관여하고 있으며, 외적인 요인에 의하여 손상을 입었을 때, 빠르게 상처 부위를 폐쇄하여 손상을 입은 조직의 기능을 회복하는 자연

치유 능력을 갖추고 있다.<sup>5,6</sup>

이러한 주요한 역할을 하고 있는 피부가 외부요인으로 인하여 손상이나 전층 결손이 생기면 생명활동에 매우 치명적이게 된다. 이러한 손상을 치유하기 위한 방법으로 직접적인 수술이나 자가조직을 이용한 치료, 이식용 지지체 등을 이용한 치료법이 꾸준히 개발되고 있다. 이중 자가조직을 이용한 치료법이 체내 부작용 없이 가장 좋은 효과를 나타내는 방법이나 넓은 부위를 치료하고자 할 때 어려움이 많기 때문에 최근에는 조직공학기술을 이용한 생체 적합성 및 생분해성이 뛰어난 고분자를 이용한 연구들이 활발히 이루어지고 있다.<sup>7-11</sup>

천연 고분자는 이러한 좋은 생체 적합성, 생분해성 및 항염증<sup>12-14</sup> 기능을 가지고 있어서 조직공학용 재료로 널리 사용되어 왔다.<sup>15-19</sup> 현재 조직공학에 사용되고 있는 천연 고분자

†To whom correspondence should be addressed.

E-mail: gskhang@jbnu.ac.kr

©2017 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

로는 콜라겐,<sup>20</sup> 히알루론산,<sup>21</sup> 알지네이트,<sup>22</sup> 실크,<sup>23</sup> 소장 점막 하 조직<sup>24</sup> 등이 있다.

이중 실크는 누에 *Bombyx mori*로부터 만들어지며, 섬유성 단백질인 피브로인과 점착성 단백질인 세리신으로 구성되어 있다. 세리신은 실크 단백질의 25~30%를 구성하고 점착성의 층으로 피브로인을 감싸고 있다.<sup>25-27</sup>  $\beta$ -sheet 구조인 실크 피브로인은 면역반응이 거의 없으며, 우수한 기계적 강도, 생체 적합성 및 생분해성 때문에 많은 생명공학 및 조직공학의 응용에 유용하다.<sup>28,29</sup>

본 연구에서는 실크의 함량에 따른 피부재생의 효과를 알아보기 위해 1, 2, 3% 실크 지지체를 제조하였으며, 상처 치유를 촉진하고 상처면의 삼출액을 조절함으로써, 증발로 인한 수분 손실과 상처의 오염방지를 위해 3차원 스펀지 형태로 제작하였다. 또한 제조한 지지체는 적외선 분광분석, 전자현미경 등의 측정을 통해 형태학적 특성과 물리적 특성을 평가하였으며, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay를 통해 세포 증식률을 확인하고 창상을 유발시킨 동물모델을 통해 창상치료의 효과를 확인하여, 피부재생 소재로서의 가능성을 알아보고자 했다.

## 실 험

**시약 및 재료.** 누에고치는 계봉농장(Kyebong Farm, Korea)에서 구입하였으며 모든 화학 약품 및 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다.

**실크 피브로인 추출.** 실크 수용액은 *Bombyx mori* 누에고치로부터 Kaplan 등의 과정을 따라 준비하였다.<sup>30</sup> 고치를 잘게 잘라 0.02M의 탄산나트륨( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Showa Chemical, Japan)을 포함한 증류수에서 30분간 끓여 세리신을 제거하였다. 세리신이 추출되고 남은 피브로인을 증류수로 세 번 정도 반복하여 행균 후 상온에서 건조하였다. 건조된 실크는 9.3 M의 리튬브로마이드(LiBr, Kanto Chemical, Japan) 용액에 60 °C에서 4시간 동안 용해시켰다. 이후 실크 용액 내의 LiBr을 제거하기 위하여 48시간 동안 증류수에 투석막(SnakeSkin® Dialysis Tubing, 3.5 K MWCO, Thermo Science, USA)을 사용하여 투석하였고, 투석 중 증류수는 5번 교체해 주었다. 투석이 완료된 수용액을 코니컬 튜브에 옮겨 담아 냉장보관하였다.

**지지체 제조.** 지지체를 제조하기 위해, 증류수 질량의 각각 1, 2, 3% 실크 수용액을 넣고, 상온에서 약 2시간 동안 교반 후 이를 48 well plate에 담고 냉장 4시간, 냉동 4시간 후 -80 °C 조건에서 급속 냉동을 1일간 하여준다. 이후 2일간 동결 건조하여 지지체를 제조하였다. 제조된 지지체는 4시간 동안 메탄올 처리하였으며, 이후 다시 증류수를 사용하여 세척하였다. 세척이 완료된 지지체는 2일간 동결 건조하였다.

**공극률 측정.** 지지체에서의 공극률을 측정하기 위해

Archimedes의 유체 변의 측정기법을 통해 측정하였다. 간단히 설명하면, 눈금 실린더에 물을 넣고 초기 부피( $V_1$ )를 측정하였다. 이후 지지체를 넣은 후 10분 뒤의 물의 부피( $V_2$ )를 측정하며, 마지막으로 지지체를 제거한 후 남아있는 물의 부피( $V_3$ )를 측정하였다. 측정된 값을 식 (1)에 대입하여 최종 공극률을 측정하였다.

$$\text{Porosity}(\%) = \frac{V_1 - V_3}{V_2 - V_3} \times 100\% \quad (1)$$

**세포 배양.** 쥐 단핵대식세포(RAW 264.7 mouse leukaemic monocyte macrophage cell line, KCLB40071)와 쥐 배아섬유아세포(NIH/3T3 mouse embryo fibroblast, KCLB21 658)는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 제공받았으며, 쥐 단핵대식세포는 DMEM 고농도 글루코오스(Dulbecco's modified eagle medium, Gibco)에 10% 우태아혈청(FBS), 1% 항생제(antibiotics/antimycotics)가 함유된 배양액을 만들었고, 쥐 배아섬유아세포는 RPMI 1640(roswell park memorial institute medium, Gibco)에 10% FBS, 1% 항생제가 함유된 배양액을 만든 후 세포배양 플라스크에 분주하여 37 °C, 5%  $\text{CO}_2$  조건에서 배양하였다. 배양액은 1일에 한 번씩 교체해주었다.

**세포 증식률 측정.** 세포독성과 세포증식능력을 발색 측정으로 정량하기 위해 MTT(3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma-Aldrich, USA) 분석법을 시행하였다. 제조된 스펀지에 NIH/3T3를  $1 \times 10^5$ 개 농도로 파종하여 배양 1, 2, 3일째에 MTT 용액(5 mg/mL stock in PBS)을 100  $\mu\text{L}$ 씩 넣고 4시간 동안 37 °C, 5%  $\text{CO}_2$  조건에서 배양하였다. 4시간 후 스펀지를 48 well plate에 옮겨 디메틸설폭사이드(DMSO, Sigma-Aldrich, USA)용액을 1 mL씩 넣어 결정이 완전히 녹을 때까지 초음파 세척기로 용해한 후 96 well plate에 시료를 각각 100  $\mu\text{L}$ 씩 분주하고 570 nm 흡광도로 측정하였다.

**RNA 발현도 확인.** 염증 사이토카인의 mRNA 발현여부를 알아보기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 쥐 단핵대식세포를  $1 \times 10^6$ 개 농도로 파종 후 1, 2, 3일째에 회수된 스펀지에 500  $\mu\text{L}$ 의 trizol(Invitrogen™ Life Technologies Co., Groningen, Netherlands)을 첨가하여 5분 동안 인큐베이션한 다음 1.5 mL의 EP 튜브에 넣어 100  $\mu\text{L}$  클로로포름(Sigma-Aldrich, USA)을 첨가한 후 4 °C, 12000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 mRNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 Oligo(dT)12-18 프라이머(Invitrogen™), 5×first strand buffer(Invitrogen™), dNTP(dGTP, dATP, dTTP, dCTP, Gibco), RNase inhibitor(Invitrogen™), Superscript™ RNase H 역전사트랜스크립타이스(Invitrogen™), DNase/RNase free water(Gibco)를 첨가하여 authorized thermal cycler(TP600, Takara Bio Inc., Japan)를 통하여 cDNA로 역전사하였다. 역전사시킨 cDNA를

GAPDH, TNF- $\alpha$ , COX-2, IL-1 $\beta$ 을 PCR 수행을 하였다. PCR 후 증폭된 DNA를 1%(w/v) 아가로스겔에 전기영동을 한 후, 300 nm 자외선 조사기로 사진촬영을 하여 GAPDH, TNF- $\alpha$ , COX-2, 및 IL-1 $\beta$  mRNA 밴드의 발현정도를 확인하였다.

**창상 실험.** 창상 실험을 위한 지지체는 12 well plate를 사용하여 제작하였으며, 창상 크기와 지지체의 크기를 맞추기 위해 펀치를 이용해서 직경 2 cm로 제작하였다. 실험 동물은 Sprague-Dawley rat(SD rat, 4 weeks, female)을 이용하여 실험하였다. 랫은 줄레틸과 도미토를 2:1 비율로 혼합한 용액을 30  $\mu$ L 사용하여, 근육 주사로 전신 마취하였다. 랫의 등부분 털을 제거한 후, 직경 2 cm 크기의 원형 창상을 만들어 지지체를 처치하지 않은 군, 메디폼 군, 1% 실크 지지체를 처치한 군으로 실험을 진행하였다. 이때 일정한 크기의 전층 피부 결손창상을 만들기 위해 한 명의 실험자가 시행하였고, 마우스의 피부는 일정하게 당김으로써 창상의 크기가 개체 별로 차이가 나지 않도록 하였다. 피부 결손 부위는 실리콘막으로 덮어 봉합하여, 살균처리해주고, 조직액이 고인 상태에서 창상이 마르지 않도록 유지시켰다.

**육안적 상처 변화 관찰.** 상처의 치료과정을 관찰하기 위하여 창상 유발 시점부터 1주일 간격으로 카메라를 이용하여 각 군별로 일정거리에서 촬영하여 상처의 변화를 육안으로 관찰하였고, 객관적인 지표를 나타내기 위하여 Image J (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) 프로그램을 이용해 상처 면적의 크기 변화를 측정했다. 창상 치유율은 식 (2)를 이용하여 표시하였다.

$$\text{Percentage of wound size reduction (\%)} = \frac{(A_0 - A_t)}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

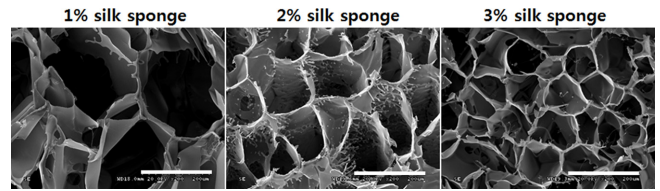
(A<sub>0</sub>: 초기 창상 면적, A<sub>t</sub>: 측정일 창상 면적)

**조직학적 평가.** 수술 후 1, 2, 4주에 실험동물은 안락사시켜 정상피부와 이식편 아래의 근육층까지 포함하여 이식편을 생검하였다. 각 주당 실험군마다 4개씩 이식편을 얻었다. 이식편은 10% 포름알데히드에 고정된 다음, 파라핀 블록으로 제작하여 4  $\mu$ m의 두께로 박절하여 poly-L-lysine(PLL) 코팅 슬라이드에 고정하였다. 조직 절편은 탈 파라핀 과정을 거친 후 조직학적 평가를 위하여 H&E 염색을 실시하였다.

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

### 결과 및 토론

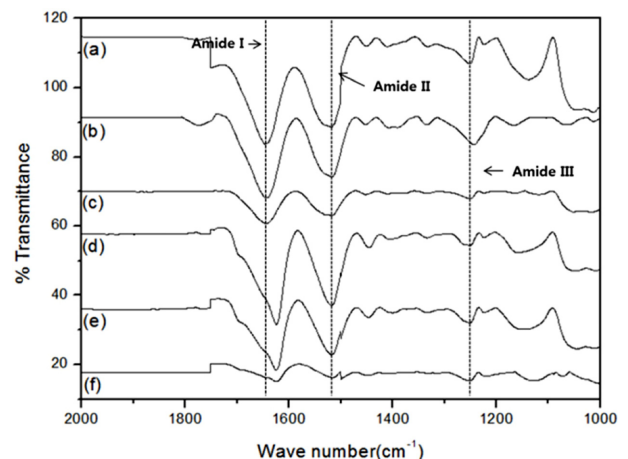
**SEM 관찰.** Figure 1은 각각 1, 2, 3%의 실크 지지체의 단면을 SEM으로 관찰한 것이다. 관찰 결과 3개의 지지체 모두 비슷한 형태의 다공을 가지고 있으며, 표면 또한 비교적 매



**Figure 1.** SEM microphotographs of 1%, 2% and 3% silk sponge (scale bar=200  $\mu$ m).

끄러운 표면을 갖는 것을 확인할 수 있다. 1% 실크 지지체는 242.19 $\pm$ 26.06, 2%는 127.38 $\pm$ 37.55, 3%는 110.54 $\pm$ 23.13  $\mu$ m의 다공의 크기를 가졌다. 또한 공극률을 측정하였을 때, 1%는 73.06 $\pm$ 2.1%, 2%는 71.72 $\pm$ 2.2%, 3%는 70.85 $\pm$ 1.1%의 공극률을 보였다. 1% 실크 스펀지는 3%에 비하여 다공의 크기가 약 2배 이상 큰 다공을 가지고 있는 것을 볼 수가 있으며, 공극률 또한 다른 군에 비해 약 5% 정도 더 많은 공극률을 가지는데, 이는 실크의 함량이 다른 군에 비하여 적기 때문에 지지체의 다공 및 공극률이 커진 것으로 사료된다.

**FTIR 분석.** 실크 스펀지의 구조적인 분석을 위해 적외선 분광 광도계를 이용하여 실크 스펀지의 스펙트럼을 관찰하였다(Figure 2). FTIR 분석 결과, 세가지의 Amide I(1630~1650  $\text{cm}^{-1}$ ), Amide II(1520~1540  $\text{cm}^{-1}$ ) 및 Amide III(1230~1270  $\text{cm}^{-1}$ )와 관련한 특징적인 피크가 나타났다.<sup>31</sup> 일반적으로, 실크 피브로인은  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet, 랜덤코일의 세가지 구조로 구성되어있다. 이 중  $\alpha$ -helix 구조는 수용성이지만, 이와 반대로  $\beta$ -sheet 구조는 다양한 용매에 불용성이다.<sup>32</sup> 보통의 경우 랜덤코일과  $\alpha$ -helix는 1660, 1540, 및 1235  $\text{cm}^{-1}$ 에서 피크가 나타나고,  $\beta$ -sheet 1630, 1530  $\text{cm}^{-1}$ 에서 피크가 나타난다.<sup>33</sup> 실험에 사용한 실크 스펀지는 메탄올을 사용하여 물에 녹지 않도록 처리를 하여  $\alpha$ -helix 구조에서 불용성의  $\beta$ -

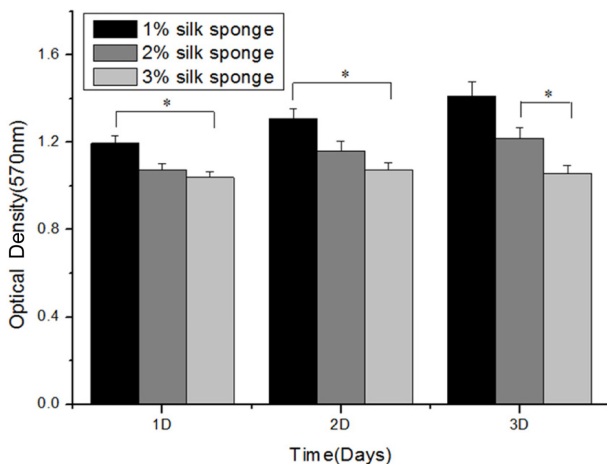


**Figure 2.** FTIR spectra of silk sponge before any processing treatments: (a) 1% silk sponge; (b) 2% silk sponge; (c) 3% silk sponge. FTIR spectra of silk sponge after being processed with methanol: (d) 1% silk sponge; (e) 2% silk sponge; (f) 3% silk sponge.

sheet 구조로서 전이가 일어나도록 하였다. 따라서 FTIR 결과를 보았을 때 Amide I과 Amide II 피크가 메탄올 처리 이후 wavenumber 값이 감소하였으며, 이로 인해 실크 스펀지 내의  $\beta$ -sheet 구조가 뚜렷하게 나타남을 증명했다.

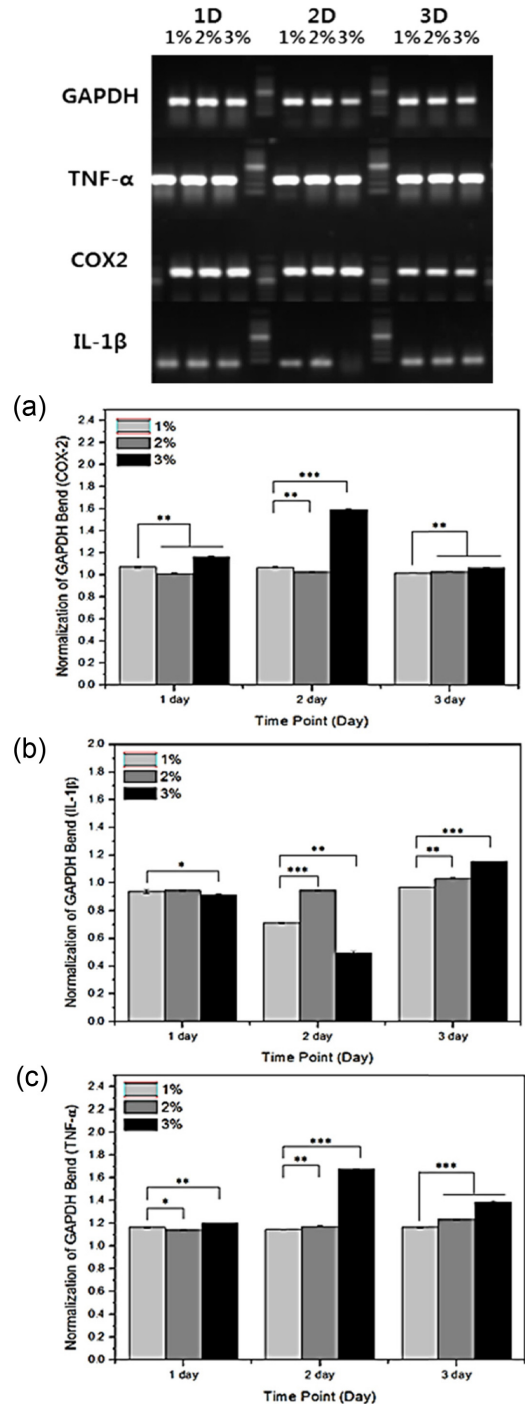
**세포 증식률.** Figure 3은 실크 스펀지에 NIH/3T3 세포를 파종하여 세포 증식률을 측정하기 위해 *in vitro*상에서 MTT 분석을 시행하였다. 각각의 스펀지에 세포를  $1 \times 10^5$ 개씩 파종하여 4시간, 1, 2, 3일 후에 측정하였다. 1, 2, 3% 실크 스펀지에서의 세포 증식률을 관찰한 결과, 1, 2 및 3일차에 1% 실크 스펀지는 각각  $1.19 \pm 0.03$ ,  $1.30 \pm 0.04$ ,  $1.412 \pm 0.06$ , 2% 실크 스펀지는  $1.07 \pm 0.02$ ,  $1.15 \pm 0.04$ ,  $1.21 \pm 0.04$ , 3% 실크 스펀지는  $1.03 \pm 0.02$ ,  $1.07 \pm 0.03$ ,  $1.05 \pm 0.03$  값을 나타냈다. 모든 군에서 시간이 지날수록 세포 증식률이 좋음을 확인할 수 있었다. 그러나 1% 실크 스펀지는 나머지 2, 3% 실크 스펀지에 비해 세포 증식률이 모든 타임 포인트에서 세포증식률이 증가한 것을 확인할 수 있는데 이는 SEM 이미지 관찰 결과에서 보면 1% 실크 스펀지가 2, 3% 실크 스펀지에 비해 다공의 크기가 더욱 크고 공극률이 더 높았기 때문에 지지체 내에서의 세포의 이동이 원활하여 세포의 부착 및 증식 능력이 증가 되었을 것이라 사료된다.<sup>34</sup>

**염증 사이토카인 발현도 분석.** 1, 2, 3% 실크 스펀지에서의 염증의 발현 정도를 측정하기 위해서 스펀지에 RAW 264.7 세포를 파종한 뒤 1, 2, 3일 후에 GAPDH, TNF- $\alpha$ , COX-2, IL-1 $\beta$  염증 사이토카인의 mRNA 발현도를 Figure 4에 나타내었다. 각 일차별 밴드사이에 있는 밴드는 DNA Ladder (Takara Bio Inc, Japan)으로 그림상으로 약 4~5개의 띠로 분리된 것을 확인할 수 있으며, 밴드의 위치를 통해 샘플의 무게를 짐작할 수 있다. GAPDH는 house keeping gene으로 염증 사이토카인의 발현량을 표준화시켜 비교하였다. 염증 사

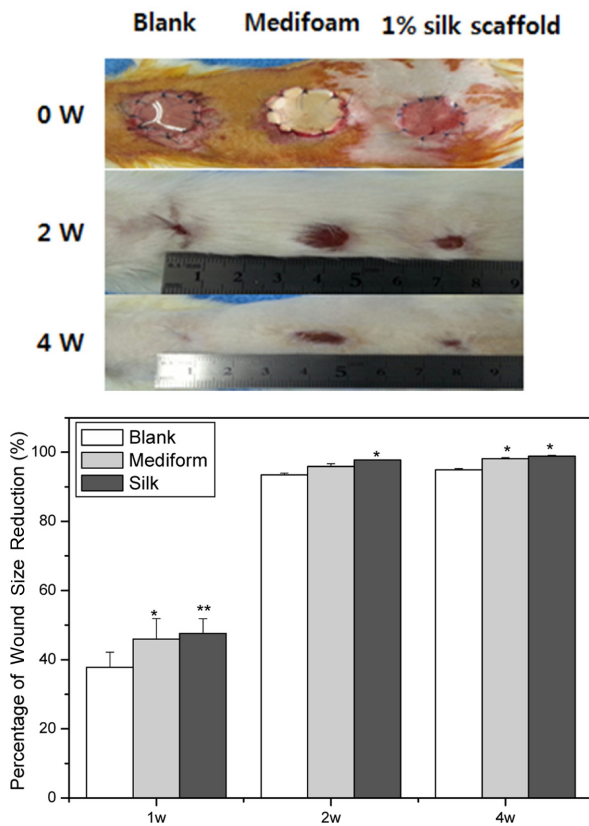


**Figure 3.** Cell viability of NIH/3T3 in 1%, 2% and 3% silk sponge was analyzed by MTT assay after 1, 2 and 3 days post-seeding *in vitro* (\* $p < 0.05$ ).

이토 카인은 1일차에 비해 2, 3일차로 시간이 지날수록 발현 정도가 10% 감소함을 볼 수 있으며 특히 1% 실크 스펀지의 발현도가 2, 3% 실크 스펀지에 비하여 발현량이 다른 군보



**Figure 4.** RT-PCR of GAPDH, TNF- $\alpha$ , COX2, IL-1 $\beta$  of the 1%, 2% and 3% silk sponge was analyzed for 1, 2 and 3 days post-seeding *in vitro*. And gene expression profiles of (a) COX-2; (b) IL-1 $\beta$ ; (c) TNF- $\alpha$  (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

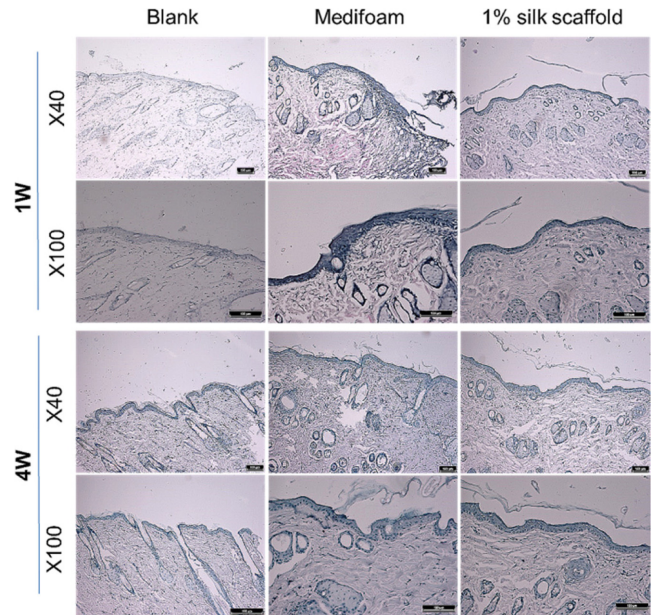


**Figure 5.** Gross observation of wounds treated by medifoam and 1% silk sponge.

다 낮은 것을 확인할 수 있다. 이는 같은 크기의 1, 2, 3% 실크 스펀지이지만 함량이 1% 실크 스펀지가 2, 3%에 비해 적기 때문으로 사료된다.

**창상 부위 육안 관찰.** Figure 5에서 창상을 유발시킨 후 처치하지 않은 군(blank), 1% 실크 스펀지와 메디폼을 각각 처치한 군을 1주 간격으로 촬영하여 상처의 면적변화를 관찰하였다. 그 결과 1주, 2주, 그리고 4주에 blank 군은 37.8±4.36, 93.46±0.49, 94.91±0.38, 메디폼 군은 45.96±5.88, 95.89±0.79, 98.1±0.29, 1% 실크 스펀지 군은 47.53±4.27, 97.76±0.06, 98.85±0.27% 값의 창상 치유율을 나타냈다. 모든 군에서 시간에 따라 상처가 수축되는 것을 확인할 수 있었고, 특히 1주의 경우 1% 실크 스펀지와 메디폼 군의 경우 초기 창상 치유율은 blank 군보다 높은 치유율을 보였다. 2주 이상이 되면 창상치유율은 현저히 높아지면서, 4주 이상이 되면 상처면적이 90%이상 치유된 것을 확인할 수 있다. 이러한 관찰 결과, 1% 실크 스펀지 군은 다른 군에 비해 빠른 치유율을 보이기 때문에, 상처 치료 효과가 좋다고 판단하였다.

**조직학적 평가.** H&E 염색 결과는 Figure 6에 나타내었다. 1주차의 세 가지 군 모두 표피층의 재생이 이루어지고 있으나 blank 군의 표피는 다른 메디폼과 1% 실크 스펀지에 비하여 그 재생정도가 적었으며, 메디폼은 1% 실크 스펀지에



**Figure 6.** Skin stained with H&E for histological observation. Randomly selected areas of dermis from each sample were examined at a magnification of 40X, 100X for 1 and 4 weeks (Yellow arrow is pointing to epithelial layer).

비하여 진피층의 조직재생이 덜 이루어짐을 알 수 있다. 또한 표피층의 재생을 보았을 때 blank 군과 메디폼 군은 그 두께가 균일하지 않고 중간에 끊어진 형태를 보이는데 이에 반해 1% 실크 지지체의 표피층 두께는 다른 군과 비슷하지만 끊이지 않고 연결되어있는 것을 볼 수가 있다. 4주차는 1주차에 비해 피부 손상 부위가 감소되고, 더 많이 재생된 것을 볼 수가 있다. 특히 1% 실크 지지체군에서 표피세포의 형성 정도와 두께의 균일도가 blank 군과 메디폼 군에 비하여 더 좋은 것을 확인할 수 있었으며, 진피층 또한 1% 실크 스펀지 군이 나머지 2개의 군에 비해 재생이 더 많이 이루어진 것을 볼 수 있었다. 이는 합성고분자인 메디폼에 비해서 천연고분자를 이용하여 만든 실크 스펀지가 생체 적합성이 더 뛰어나며, 초기 창상의 수축을 증가시켜 세균이나 다른 외부 요인으로부터 발생할 수 있는 2차 감염을 예방시킬 수 있기 때문으로 사료된다.

## 결론

본 연구에서는 실크를 사용하여 각각 1, 2, 3%의 실크함량을 가지는 스펀지 형태의 지지체를 제작하였으며, 실크 스펀지에서의 염증 완화 효과를 *in vitro* 환경에서 실시하였다. 실크 스펀지를 FTIR을 통해 실크의 성질을 가지고 있음을 확인하였고, SEM 분석을 통해 각각의 스펀지의 다공 크기를 비교하였으며, MTT를 통하여 세포의 초기 부착률과 증식률

을 확인하고, RT-PCR을 통하여 발현도를 확인하였다. 이 모든 *in vitro* 결과에서 1% 실크 스펀지가 가장 우수한 결과를 나타내었기 때문에 *in vivo* 실험에는 1% 실크 스펀지만을 사용하여 연구를 진행하였다. 쥐의 등부위에 창상을 유발시킨 후 blank 군, 메디폼 군과 1% 실크 스펀지 군을 비교하였다. 창상부위 육안 관찰과 H&E 면역 염색 결과 1% 실크 스펀지가 blank와 메디폼 군에 비하여 우수한 피부 재생률을 보였으며, 표피층 두께의 균일성과 진피층의 세포의 재생 정도가 다른 군에 비해 잘 이루어진 것을 확인하였다. 따라서 1% 실크 스펀지는 외부 노출을 차단하고 감염을 예방하고, 염증 반응을 억제할 수 있으므로 창상치료제로서의 가능성을 확인하였다.

**감사의 글:** 이 연구는 농림수산물부 생명산업기술개발사업(112007-05-4-SB010)과 한국연구재단 바이오·의료기술개발사업(2012M3A9C6050204)의 지원을 받아 수행된 연구입니다.

## 참 고 문 헌

1. W. Friess, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **45**, 113 (1998).
2. K. W. Ng, *Inter. J. Tissue Regen.*, **4**, 29 (2013).
3. S. J. Hollister, *Nat. Mater.*, **4**, 518 (2005).
4. A. Leal-Egana and T. Scheibel, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **55**, 155 (2010).
5. A. D. Metcalfe and M. W. Ferguson, *J. R. Soc. Interface*, **4**, 413 (2007).
6. O. J. Lee, J. M. Lee, H. J. Jin, and C. H. Park, *Inter. J. Tissue Regen.*, **1**, 68 (2010).
7. F. M. Wood, *Intl. J. Biochem. Cell Biol.*, **56**, 133 (2014).
8. S. Xu, L. Sang, Y. Zhang, X. Wang, and X. Li, *Mater. Sci. Eng. C, Mater. Biol. Appl.*, **33**, 648 (2013).
9. W. Lee, J. C. Debasitis, V. K. Lee, J. H. Lee, K. Fischer, K. Edminster, J. K. Park, and S. S. Yoo, *Biomaterials*, **30**, 1587 (2009).
10. F. Han, Y. Dong, Z. Su, R. Yin, A. H. Song, and S. M. Li, *Int. J. Pharm.*, **476**, 124 (2014).
11. J. A. Gerstenhaber, R. Brodsky, R. B. Huneke, and P. I. Lelkes, *Wound Medicine*, **5**, 9 (2014).
12. Q. Ye, K. Ohsaki, K. Li, D. J. Li, C. S. Zhu, T. Ogawa, S. Tenshin, and T. Takano-Yamanoto, *Auris Nasus Larynx*, **28**, 131 (2007).
13. C. Liu, Z. Xia, and J. T. Czemuszka, *Chem. Eng. Res. Des.*, **85**, 1051 (2007).
14. A. J. Singer and R. A. Clark, *N. Engl. J. Med.*, **341**, 738 (1999).
15. S. R. Caliani, M. A. Ramirez, and B. A. C. Harely, *Biomaterials*, **32**, 8990 (2011).
16. A. Aszodi, K. R. Legate, I. Nakchbandi, and R. Fassler, *Annu. Rev. Biol.*, **22**, 591 (2006).
17. J. E. Song, R. Kim, J. H. Lee, H. M. Kim, C. M. Kim, D. Lee, and G. Khang, *Intl. J. Tissue Regen.*, **4**, 17 (2013).
18. J. Brinckmann, *Top. Curr. Chem.*, **247**, 1 (2005).
19. R. M. Boehler, S. Shin, A. G. Fast, R. M. Gower, and L. D. Shea, *Biomaterials*, **34**, 5431 (2013).
20. H. M. Powell, D. M. Supp, and S. T. Boyce, *Biomaterials*, **29**, 834 (2008).
21. Y. Qian, L. Li, C. Jiang, W. Xu, Y. Lv, L. Zhong, K. Cai, and L. Yang, *Intl. J. Biol. Macromol.*, **79**, 133 (2015).
22. J. E. Song, A. R. Kim, C. J. Lee, N. Tripathy, K. H. Yoon, D. Lee, and G. Khang, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **26**, 181 (2015).
23. B. M. Moon, D. K. Kim, H. J. Park, H. W. Ju, O. J. Lee, J. H. Kim, J. M. Lee, J. S. Lee, and C. H. Park, *Macromol. Res.*, **22**, 1268 (2014).
24. K. S. Han, H. Ko, N. Jang, J. Song, and G. Khang, *Macromol. Res.*, **22**, 1253 (2014).
25. Y. Q. Zhang, *Biotechnol. Adv.*, **20**, 91 (2002).
26. B. B. Mandal and S. C. Kundu, *Biomaterials*, **30**, 2956 (2009).
27. B. K. Gu, M. S. Kim, S. J. Park, and C. H. Kim, *Intl. J. Tissue Regen.*, **2**, 83 (2011).
28. S. Sahoo, S. L. Toh, and J. C. Goh, *Biomaterials*, **31**, 2990 (2010).
29. A. Vasconcelos, G. Freddi, and A. Cavaco-Paulo, *Biomacromolecules*, **9**, 1299 (2008).
30. D. N. Rockwood, R. C. Preda, T. Yucel, X. Wang, M. L. Lovett, and D. L. Kaplan, *Nat. Protoc.*, **6**, 1612 (2011).
31. B. C. Dash, B. B. Mandal, and S. C. Kundu, *J. Biotechnol.*, **144**, 321 (2009).
32. S. Mobini, B. Hoyer, M. Solati-Hashjin, A. Lode, N. Nosoudi, A. Samadikuchaksaraei, and M. Gelinsky, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **101**, 2392 (2013).
33. H. J. Jin, J. Park, R. Valluzzi, P. Cebem, and D. L. Kaplan, *Biomacromolecules*, **5**, 711 (2004).
34. J. W. So, J. W. Jang, S. H. Kim, J. H. Choi, J. M. Rhee, B. H. Min, and G. Khang, *Polym. Korea*, **32**, 6 (2008).