

실크/PLGA 하이브리드 지지체의 기계적 물성과 세포친화력; *in vitro* 연구

송이슬 · 유한나 · 엄 신 · 김은유 · 유석철 · 김형은 · 이동원[†] · 강길선[†]
전북대학교 BIN 융합공학과, 고분자 융합소재 연구센터, 고분자나노공학과
(2010년 7월 20일 접수, 2010년 10월 25일 수정, 2010년 11월 16일 채택)

Mechanical Property and Cell Compatibility of Silk/PLGA Hybrid Scaffold; *In Vitro* Study

Yiseul Song, Hanna Yoo, Shin Eum, On You Kim,
Suk Chul Yoo, Hyung Eun Kim, Dongwon Lee[†], and Gilson Khang[†]

Dept of BIN Fusion Tech & Polymer Fusion Research Center,
Department of Polymer · Nano Sci Tech, Chonbuk National University, 664-14 Dukjin, Jeonju 561-756, Korea
(Received July 20, 2010; Revised October 25, 2010; Accepted November 16, 2010)

초록: 조직 형성을 위한 생리학적 환경을 제공하는 새로운 생활성 지지체의 디자인은 생체재료 연구에서 중요한 분야이다. 본 연구에서는 3차원적 실크/PLGA 지지체의 물성평가를 위해 압축강도, 수분친화도, SEM 분석을 하였으며, 세포친화성 평가를 위해 RAW 264.7과 NIH/3T3의 부착, 증식 및 표현형유지와 염증반응에 미치는 영향을 조사하였다. 지지체는 용매 캐스팅/염 추출법으로 제조하였고, 압축강도, 수분친화도 면에서 실크 함량이 20 wt%에서 우수함을 확인했으며, 표면의 거칠도를 높여 세포부착에 긍정적인 구조임을 확인하였다. 세포친화성 분석 결과, 실크함량이 20 wt%인 실크/PLGA 지지체에서 높은 초기부착도 및 증식률을 보였으며, 실크함량이 20 wt%에서 염증반응이 눈에 띄게 감소함을 확인하였다. 조직공학적 응용에 실크/PLGA 지지체가 유용할 것이라 판단하였다.

Abstract: The design of new bioactive scaffolds offering physiologic environment for tissue formation is an important frontier in biomaterials research. In this study, we performed compressive strength, water-uptake ability, and SEM analysis for physical property assessment of 3-D silk/PLGA scaffold, and investigated the adhesion, proliferation, phenotype maintenance, and inflammatory responses of RAW 264.7 and NIH/3T3 for cell compatibility. Scaffolds were prepared by the solvent casting/salt leaching method and their compressive strength and water-uptake ability were excellent at 20 wt% silk content. Result of cell compatibility assay showed that inflammatory responses distinctly decreased, and initial adhesion and proliferation were maximized at 20 wt% silk content. In conclusion, we suggest that silk/PLGA scaffolds may be useful to tissue engineering applications.

Keywords: PLGA, silk, hybrid scaffold, cell compatibility.

서 론

조직공학은 인체로부터 획득하여 인공적으로 배양한 조직세포와 적절한 자극요소가 결합된 생체재료를 이용한 지지체를 손상된 장기나 조직을 복원하거나 대체하여 정상과 유사한 기능을 수행하는데 목적이 있는 과학기술 분야이다.¹ 조직공학을 이용한 새로운 바이오장기를 재생하기 위해서는 세포원, 세포가 부착하고 지지할 수 있는 지지체, 세포의 대사를 조절하는 생체활성분자 등 세 가지 요소가 필수적이다.² 특히 조직공학에 사용되는 고분자 지지체의 역할은 분리된 세포를 집적화하

여 생체내에 세포의 증식을 활성화하여 새로운 기질을 분비할 수 있도록 지지하는 역할을 해내야하며,³ 체내에 이식된 후에도 주변 조직과 융화가 잘 되고 일정 기간이 지난 후 안전하게 흡수, 분해하여 이물질로 남지 않는 우수한 생체적합성을 가져야 한다.^{4,5} 또한, 지지체의 화학반응, 전하, 경직성 및 거칠기 정도와 같은 표면성질에 의해 세포의 부착, 증식, 이동 및 표현형에 영향을 받기 때문에 재료선택이 매우 중요하다.⁶⁻⁸

α -하이드록시산계열의 폴리락타이드(PLA), 폴리글리콜라이드(PGA) 및 그들의 공중합체인 폴리락타이드-글리콜라이드 공중합체(PLGA)는 미국 식품의약품안전청(FDA)의 승인을 받은 합성고분자로서 생체재료로 널리 쓰이고 있으며^{9,10} 생분해성, 생흡수성의 특성으로 인해 흡수성 봉합사나 조직공학용 지지체, 약물전달체계의 디바이스로 응

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: gskhang@jbnu.ac.kr, dlee@jbnu.ac.kr

용되고 있다.¹¹⁻¹³ 하지만 생분해과정에서 발생하는 산부산물로 인한 염증반응이 보고되고 있다.^{14,15} 또한, PLGA의 생분해성의 특성으로 인해 재료에 생체활성을 부여하고자 하는 연구가 진행되어 오고 있다.¹⁶ 천연 유래 고분자로는 알지네이트, 콜라겐, 피브린, 케라틴, 히알루론산, 셀룰로오스, 키틴 등이 있는데¹⁷ 본 연구에서 사용한 실크 천연고분자는 염증반응을 거의 일으키지 않으며, 세포 부착능력과 증식효과가 뛰어나 생체적합성이 우수하다고 알려져 있다.¹⁸⁻²⁰

실크는 수술용 봉합사로 오랜 의학적 역사를 가지고 있다. 천연 누에의 실크섬유는 중심부의 섬유상의 단백질 피브로인에 고무상 단백질 세리신이 코팅되어 있는 구조로 구성되어 있고, 세리신은 점성이 있는 단백질로서 중심부의 섬유 부분을 싸고 있는 섬유이다.^{21,22} 실크의 항원성 특징들은 세리신과 관련되는데 실크섬유주위로 감싸여진 형태의 점성을 갖는 부분이다.²³ 최근의 연구들은 완전히 세리신을 제거함으로써 실크의 개선된 정제법이 보고되었으며, 이로써 항원 영향이 없는 실크섬유의 제조가 가능해졌다.²⁴ 이중 실크 피브로인은 최근 생화학 및 의학 용도로의 응용이 활발히 연구되고 있어 새로운 생체재료로 주목받고 있다. 독특한 물리화학적 특성으로 인해²⁵ 세포배양 매트릭스,¹⁸ 고정화 효소막,²⁶ 약물의 경구투여를 위한 젤 등²⁷ 다양한 분야에서의 활용이 시도되고 있다. 인간 자가이식조직의 기술을 위해 폭넓게 사용되기 전에 실크의 생체적합성과 염증반응에 대한 세포기반의 포괄적인 연구가 필요하다. 최근 실크와 대식세포 반응을 통한 염증성 사이토카인인 종양괴사인자(tumor necrosis factor- α , TNF- α)의 방출을 분석한 연구에서 실크의 낮은 염증반응이 확인된 바 있다.²⁸ 이러한 실크섬유는 수십 년 동안 생체적합성을 인정받아 왔으며 조직공학에 지지체로서의 잠재력을 가지고 있다.²⁹

한편, 조직공학적 이론을 기반으로 한 지지체를 임상 적용하고자 할 때 제기되는 문제점은 이식시 발생하는 면역거부반응이나 염증반응이다. 염증반응은 생물 또는 무생물의 침입이나 조직손상에 대해 조직의 구조와 기능을 회복시키는 유익한 체내 방어기전이다.^{30,31} 대식세포는 독소를 제거하는데 기여하나 대식세포가 과도하게 자극되면 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 같은 내독소 매개체와 단백질분해효소 및 활성산소종 생성을 통해 염증반응을 증가시킨다. 염증반응에 관여하는 물질을 찾아 제거함으로써 질환을 치료하고자 하는 보고들이 많이 있다.^{32,33} 염증반응을 일으킬 수 있는 세포에 외부자극이 가해지면 TNF- α 와 인터루킨-1 β (IL-1 β) 등의 전-염증성 사이토카인의 발현이 유도되고, 유도된 전-염증성 사이토카인이 호중구를 활성화하여 염증부위로 이동하면 염증반응에 관여하는 물질을 생성하게 하여 염증반응이 일어나게 된다. 이와 같은 염증물질이 과량 생산되면, 과도한 면역반응을 야기하여 각종 염증성질환을 유발시키고 악화시키게 된다.³⁴⁻³⁶

본 연구에서는 실크섬유를 포함함으로써 지지체의 기계적인 물성을 향상시키며 세포의 부착과 증식에 기여하고, PLGA와 세포의 상호작용에서 발생하는 문제점인 염증반응을 완화하는 효과를 확인하고자 하였다.

실 험

시약 및 재료. 생분해성 고분자인 PLGA(락타이드/글라이콜라이드 몰비 75/25, Resomer[®] RG756, Boehringer Ingelheim Chem. Co. Ltd., Germany)는 평균분자량이 90000 g/mole인 것을 사용하였으며, 천연고분자인 실크생사는 동국대학교 생명과학연구팀(Dongguk Uni-

versity, Molecular Biology Laboratory)에서 공급받아 사용하였다. 실크생사에 3 wt% 농도의 Na₂CO₃ 수용액을 첨가하여 1시간 가열하고, 열수를 이용해 수차례 세척하여 용해된 세리신과 남아있는 Na₂CO₃를 제거한다. 3차 증류수로 3번 더 세척하여 동결건조 후 1 mm 길이로 잘라 진공포장 후 데시케이터에 보관하여 사용하였다. 염화나트륨(NaCl, Orient Chem. Co., Korea)은 다공 생분해성물질로 사용하였는데, 분자체를 사용하여 입자의 크기를 250~350 μ m로 조절하였다. 메틸렌 클로라이드(MC, Tedia Co. Inc., USA) 및 이외의 모든 화학약품과 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다.

지지체 제조. 실크/PLGA 다공성 지지체는 용매 캐스팅/염 추출법을 이용하여 제조하였다.^{37,38} 1 g의 PLGA를 4 mL의 MC에 용해한 후, PLGA과 실크함량을 PLGA 양의 10, 20 wt%가 되도록 각각 0.1, 0.2 g의 실크를 첨가하였다. 그 후, 다공형성물질인 NaCl은 PLGA의 9 배가 되도록 9 g을 첨가하고, 직경 7 mm, 두께 5 mm와 직경 5 mm, 두께 5 mm의 실리콘 몰드에 넣고 프레스(MH-50Y, CAP 50 tons, Japan)를 이용하여 상온에서 60 kgf/cm²의 압력으로 24시간 동안 가압하였다. 염의 추출은 3차 증류수를 6시간마다 교체하며 48시간 동안 용출하였고, -70 °C의 딥프리저에서 24시간 동결한 후, 5 mTorr, -80 °C 조건에서 48시간 동안 동결건조하였다. 잔류용매를 충분히 제거하기 위하여 최소 일주일 이상 25 °C 진공오븐에서 건조시킨 후 70% 알코올에 멸균하여 실험에 사용하였다.³⁹

지지체 표면 분석. PLGA 및 실크/PLGA 지지체를 동결건조 후 가로 절단하여 샘플폴더에 고정시키고 렌즈를 사용하여 촬영하는 Cam-copy (Model DSC-102, Sometch Inc., Korea)를 이용하여 실크함량에 따른 지지체의 표면관찰을 하였고, 각 시료를 잘라 폴더에 고정시키고 플라즈마 스피터(Emscope, Model SC500K, UK)를 이용하여 200 Å의 두께로 백금코팅하였다. SEM(Model S-2250N, Hitachi Co., Japan)으로 관찰하였다.

압축강도. 직경 5 mm, 두께 5 mm의 실크/PLGA 지지체를 PLGA, 실크/PLGA 5, 10, 20, 30 wt% 군으로 각각 샘플 수 5개씩을 준비하여 만능물성측정기(FTC, Sterling, Virginia, USA)를 이용하여 압축강도를 측정·분석하였다. 만능물성측정기의 설정 값은 표적거리 1.5 mm, 시험속도 1 mm/min, 압축력 0.5 N으로 모두 동일하게 적용하였다.

친수성 확인. 실크함량에 따른 다공성 지지체의 친수성 효과를 살펴보기 위하여 증류수를 떨어뜨려 접촉각을 측정하였다. 물 접촉각 측정기(Tantec[™], CAM-PLUS micro, USA)를 이용하여 각각의 지지체에 10 μ L의 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 3회 분석을 실시한 후 평균값을 취하여 사용하였다. 또한 시료의 시간별 물 흡수정도를 측정하기 위해 증류수를 떨어뜨리고 5, 10, 20 및 30분 간격으로 접촉각을 측정하여 물 흡수성 정도를 확인하였다.

물 흡수성. 제조된 지지체의 물 흡수 능력을 측정하기 위하여 지지체의 초기 무게(W_{dry})를 측정하고 10 mL의 3차 증류수에 넣어 37 °C의 인큐베이터에서 4일간 교반하고, 물을 흡수한 지지체의 표면의 물을 제거한 후 무게(W_{wet})를 측정하여 water uptake식에 대입하여 물 흡수성을 측정하였다.⁴⁰ 또한, 측정 후 샘플을 동결건조하여 무게의 변화를 분석하였다. 실험은 동일한 조건에서 세 번씩 수행하여 분석하였다.

세포배양. RAW 264.7 세포배양액은 Gibco BRL.,(USA)에서 구입한 Dulbecco's Modified Eagle Medium-low glucose(DMEM-low, 저농도 글루코오스) 및 10%의 우태아혈청(FBS), 1%의 페니실린-스트렙토마이신(PS, 100 units/mL 페니실린과 100 µg/mL 스트렙토마이신)을 NIH/3T3은 RPMI 1640(Roswell Park Memorial Institute medium) 및 10%의 우태아혈청(FBS), 1%의 페니실린-스트렙토마이신(PS, 100 units/mL 페니실린과 100 µg/mL 스트렙토마이신)을 섞어 Millipore Co.,(USA)에서 구입한 GP Express PLUS Membrane 0.22 µm의 Stericup으로 필터하여 사용하였다. 실험에 사용된 쥐 단핵대식세포(mouse leukaemic monocyte macrophage cell line, RAW 264.7, KCLB40071)와 쥐 배아섬유아세포(NIH/3T3 mouse embryo fibroblast, KCLB21658)는 한국 세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 제공받았다. 세포는 세포배양액에 현탁액 상태로 세포배양 플라스크(75 cm²-flask, BD Falcon)에 분주하여 37 °C, 5% CO₂ 조건의 인큐베이터에서 배양액을 일주일에 2~3회 교체하며 배양하였다. 실험에 사용된 RAW 264.7과 NIH/3T3를 실험에 필요한 만큼 계대 후에 배양액을 2일에 한 번씩 같이주어 세포가 80% 정도 증식되었을 때 실험하였다. 세포의 배양상태를 위상차현미경(Nikon, TE-2000, Japan)으로 관찰하였다. MTT assay에는 증식률의 차이를 확실하게 비교하기 위해 RAW 264.7보다 세포의 증식률이 상대적으로 낮은 섬유아세포인 NIH/3T3를 사용하였으며, SEM에서는 세포의 초기 부착에 따른 모폴로지 변화를 보여줄 수 있는 부착도가 좋은 RAW 264.7을 사용하였다.

세포증식률 분석. 노란색의 수용성 기질인 MTT 테트라졸리움은 미토콘드리아의 탈수소 효소작용에 의하여 청자색을 띠는 비수용성의 MTT 포미즌[3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드]으로 환원되므로 MTT 분석을 통해서 세포의 증식정도를 판단할 수 있다. NIH/3T3을 1×10⁵(세포/지지체) 파종한 지지체를 24웰 플레이트에서 1, 3 및 5일간 배양하였다. 배양액을 제거하고 새로운 배양액을 넣은 후 100 µL의 MTT시약(5 mg/mL in PBS, Invitrogen)을 첨가한 후 37 °C, 5% CO₂ 조건의 인큐베이터에서 4시간 처리하였다. 4시간 후에 보라색 결정이 생성되면 상층액을 버리고 PBS로 결정이 떨어지지 않게 세척한다. 1 mL 디메틸설폭사이드(DMSO, Sigma Co.)를 넣은 후 초음파 분쇄기로 30분간 용해한 용액을 96웰 플레이트에 100 µL씩 옮겨 엘리아자 플레이트 리더(E-max, Molecular Dvice, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포부착도 및 형태 분석. 70% 알코올로 멸균한 PLGA 및 실크/PLGA 지지체에 RAW 264.7을 1×10⁵(세포/지지체) 파종한 지지체를 24웰 플레이트에서 1, 3 및 5일간 배양하였다. 배양액을 제거하고 PBS로 세척한 후, 2.5% 글루타르알데하이드(Gibco)로 24시간 고정된 후 50, 60, 70, 80 및 90%의 알코올을 30분씩 처리하여 탈수하고 -80 °C에서 동결건조하였다. 각 시료를 잘라 풀더에 고정시키고 플라즈마스퍼터를 이용하여 200 Å의 두께로 백금코팅하였다. SEM을 이용하여 실크함량에 따른 지지체에서의 세포의 부착도 및 세포형태를 관찰하였다.

염증 사이토카인 분석. 생체의 환경에서 지지체로 인하여 생성된 염증의 정도와 세포배양 후 분비되는 염증 매개 사이토카인인 TNF-α (BD optEIA™ TNF-α ELISA Set, 10600 pg/mL)의 농도를 측정하여 비교 분석하기 위해 효소면역검사(ELISA, Enzyme-linked

immunosobent assay)를 시행하였다. 대조군으로 PLGA 지지체에 RAW 264.7를 1×10⁵(세포/지지체) 파종하고 라이포폴리사카라이드(LPS)를 처리하고, 지지체를 24웰 플레이트에서 1, 3 및 5일간 배양하였으며, 실험군으로 실크/PLGA 지지체를 실크함량별로 동일한 방법으로 시행하였다. 배양 후 배양액을 취하여 원심분리(10000 rpm, 15 분)하여 얻은 상층액을 -80 °C에서 동결하였다. 샘플이 모아지면 한번에 효소면역검사를 실행하고 시료 회수 후 96웰 플레이트에 100 µL씩 옮겨 엘리아자 플레이트 리더를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

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

결과 및 토론

실크/PLGA 하이브리드 지지체 제조. 세리신을 녹여낸 실크 생사를 1 mm의 크기로 잘라 PLGA의 10, 20 wt% 비율로 지지체를 제조하였으며, 완성된 실크/PLGA 지지체 사진을 Figure 1(a), (b)에 나타내었다. 실크와 PLGA를 함량별로 섞어 실리콘 몰드에 눌러 용매 캐스팅/염 추출법으로 제조하는 방법을 Figure 2에 나타내었다. 조직공학적 적용을 위한 지지체의 다공크기의 범위가 100~400 µm일 때 가장 효과적이라는 연구에 근거해¹¹ 본 연구에서는 다공크기를 250~350 µm의 다공크기를 유지하였다. 육안관찰 결과 형태는 실리콘 몰드의 형태와 같게 얻어졌으며 수축, 팽창, 불규칙한 크기의 다공 및 여타 결함이 없는 것으로 관찰되었다. 지지체를 가로 잘라내어 현미경 촬영을 한

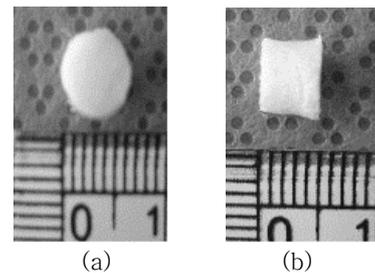


Figure 1. Silk/PLGA hybrid scaffolds: (a) horizontal observation; (b) side observation.

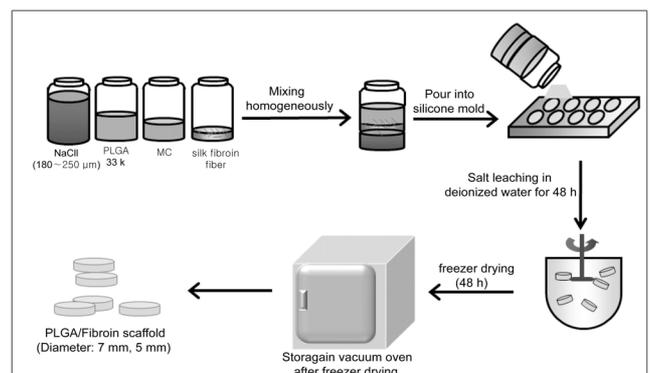


Figure 2. Schematic diagram illustrating the fabrication process of silk/PLGA hybrid scaffolds by solvent casting/salt leaching method.

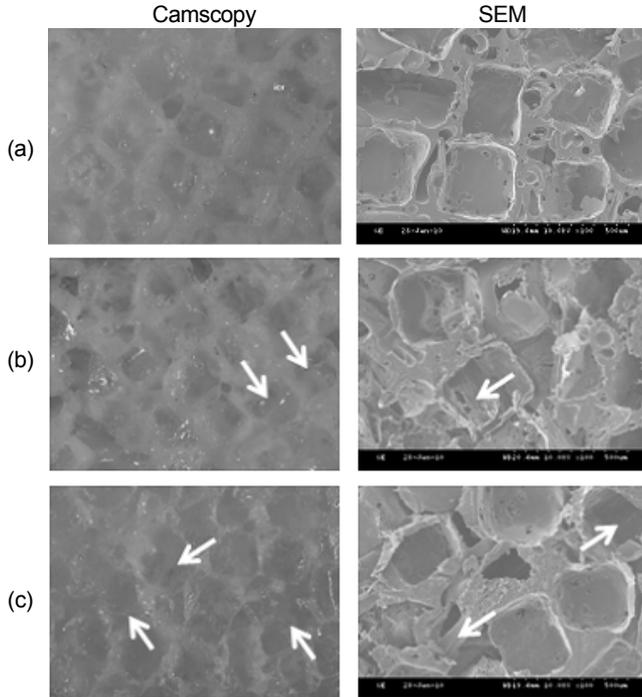


Figure 3. Observation of silk/PLGA hybrid scaffolds by Camscopy($\times 200$) and SEM(magnification; $\times 300$, scale bar; 500 μm): (a) PLGA; (b) silk/PLGA 10 wt%; (c) silk/PLGA 20 wt%.

결과와 SEM으로 관찰한 결과를 Figure 3에 나타내었다. 그 결과 용매 캐스팅/ 염 추출법에 의한 염 용출 후의 다공이 사각형으로 일정하게 유지되는 것을 확인하였다. 실크가 다공 사이의 네트워크를 형성함을 확인할 수 있었으며 실크가 다공 사이에 존재함을 화살표로 나타내었다. 친수성 실크 함유가 만든 새로운 다공 네트워크 구조는 PLGA의 소수성에 의한 초기 부착 저하와 염증반응에 대한 완화 효과를 보일 것으로 사료되며 이 결과는 세포를 파종한 후의 SEM 관찰과 ELISA 분석 결과에서 확인하였다. Camscopy의 결과를 통해 소수성이 강할수록 매끄러운 표면이 관찰됨을 확인할 수 있으며, 실크함유에 의해 표면의 거칠도가 증가하는 것을 확인할 수 있다.

물리적 강도. 실크함량에 따른 기계적 강도의 차이를 보기 위해 압축 강도를 실시하여 Figure 4에 나타내었다. 압축강도 결과 큰 차이를 보이지는 않았지만 실크함량이 높아짐에 따라 물성이 좋아지는 경향을 보이다가 30 wt%에서는 강도가 떨어져 물성이 약해짐을 알 수 있었다. 다공의 크기가 커질수록 기계적 강도가 낮아진다고 보고된 바 있는데,⁴² 이에 의거해 실크함량에 따라 물성의 변화가 일어나는 것을 살펴보면 실크함량이 포화상태가 아닐 경우 실크함량이 다공의 사이를 막고, PLGA가 실크함량을 잡아주어 물성이 좋아지지만 실크함량이 너무 많아지면 섬유가 공간을 형성하여 스폰지 효과가 발생해 오히려 강도가 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 결과적으로 20 wt%가 가장 물성이 강함을 확인하였다.

수분친화도. 지지체 표면의 친수성을 알아보기 위하여 접촉각 측정을 실시하였다. 시료와 물방울이 이루는 각도가 작을수록 친수성을 나타내며 평가결과는 Figure 5에 나타내었다. 측정결과 10, 20 wt%에서 수분흡수가 더 빨리 진행되는 것을 확인할 수 있으며, 이는 실크함유의

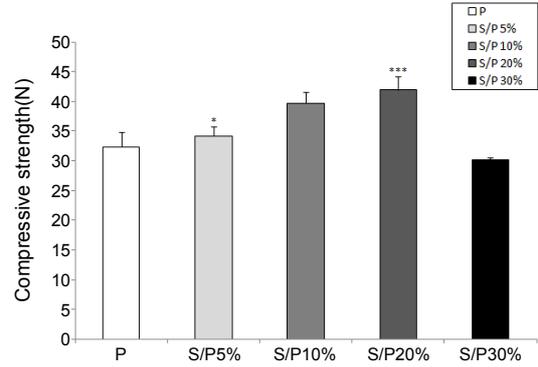


Figure 4. Compressive strength of PLGA and silk/PLGA hybrid scaffolds. From the left, PLGA, silk/PLGA 5 wt%, silk/PLGA 10 wt%, silk/PLGA 20 wt%, and silk/PLGA 30 wt%. Differences were considered statistically significant when * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

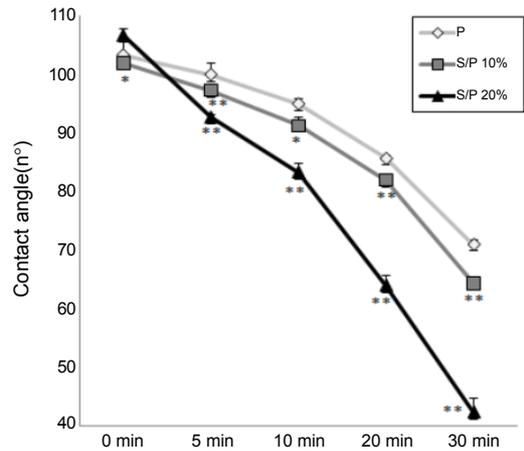


Figure 5. Contact angles of PLGA and silk/PLGA hybrid scaffolds. P : PLGA, S/P 10% : silk/PLGA 10 wt% and S/P 20% : silk/PLGA 20 wt%. Differences were considered statistically significant when * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

계면에너지가 낮아 수분친화성이 더 증가함을 의미한다. 초기 접촉각에서 20 wt%에서 높게 나타나는 이유는 표면의 거칠도에 의한 것으로 사료된다. 수분흡수성 측정결과 4일 후 수분흡수 무게 측정을 하여 비교하고 Figure 6(a)에 나타내었으며, 수분흡수율을 원래 무게의 비율로 표준화한 결과를 Figure 6(b)에 나타내었다. 실크함량에 따라 수분친화성의 차이를 보이는 것은 실크함량이 단백질 구성성분인 아미노산으로 이루어져 표면적친화성을 높인 것으로 보이며, 실크함수에 의해 다공 사이 네트워크가 생기며 수분을 함유하고 있는 양이 더 증가하게 된 것으로 사료된다.^{38,43}

세포부착도 및 증식. 세포가 외부성장 환경의 영향으로 인해 부착도와 증식률이 변화가 생기는데 실크의 함량에 따른 지지체에서의 세포성장을 확인하기 위해 MTT 분석법을 통해 비교하였다. 실크함량에 따른 NIH/3T3의 1, 3 및 5일의 세포증식을 Figure 7에 나타내었으며, 세포의 초기부착도와 증식정도를 육안으로 식별화하기 위하여 RAW 264.7의 1, 3 및 5일 후의 상황을 SEM 관찰을 통해 비교하여 Figure 8에 나타내었으며, 세포는 사각형으로 표시하였고, 실크는 화살표로 표시하였

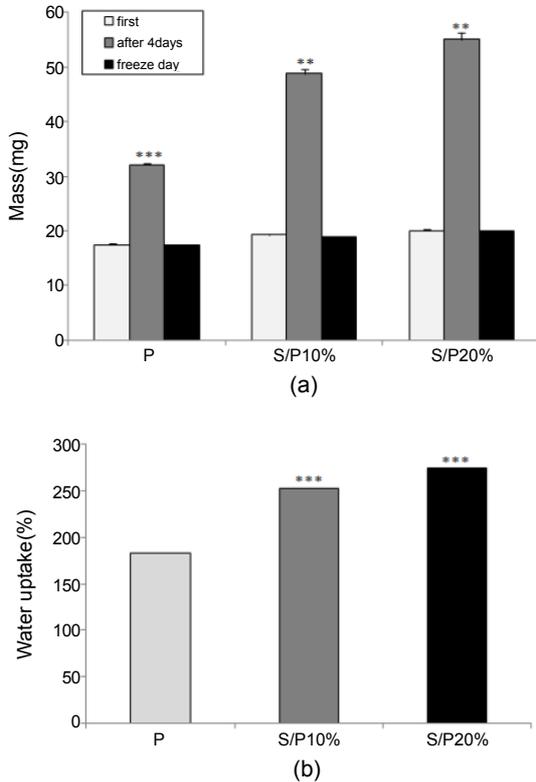


Figure 6. Water-uptake ability of PLGA and silk/PLGA hybrid scaffolds as a function of silk concentration: (a) compared mass of water-uptake; (b) water-uptake ability (%); From the left, PLGA, silk/PLGA 10 wt% and silk/PLGA 20 wt%. Differences were considered statistically significant when * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

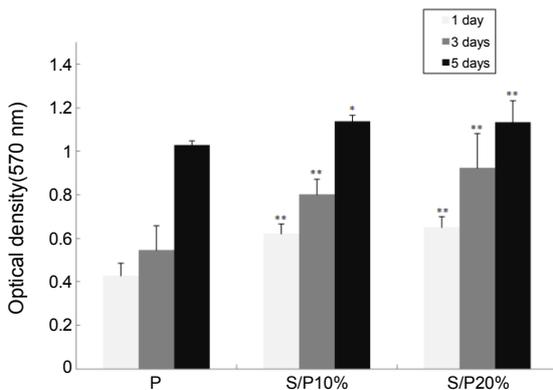


Figure 7. Cellular viability of NIH/3T3 in PLGA and silk/PLGA hybrid scaffolds analyzed by MTT assay after 1, 3 and 5 day post-seed *in vitro*. From the left, PLGA, silk/PLGA 10 wt% and silk/PLGA 20 wt%. Differences were considered statistically significant when * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

다. MTT 결과 NIH/3T3의 증식이 유의성 있게 증가하는 것을 알 수 있으며, 5일 후 실크함량과 관계없이 세포증식률이 높은 이유는 NIH/3T3 자체의 증식이 좋기 때문으로 사료된다. 그래프를 분석한 결과 실크함량이 20 wt%인 지지체에서 가장 우수함을 확인하였다. PLGA와 실크섬유의 무게에 따른 부피비를 비교하여 Figure 5(b)에 나타내

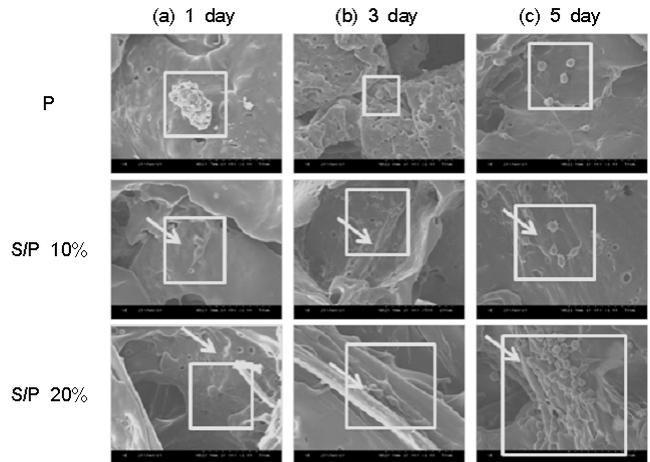


Figure 8. SEM microphotographs of RAW 264.7 cells on the surfaces of PLGA and silk/PLGA hybrid scaffolds: (a) after 1 day; (b) after 3 days; (c) after 5 days (magnification; $\times 1000$, scale bar; 500 μm). From the top, PLGA, silk/PLGA 10 wt% and silk/PLGA 20 wt%.

었다. SEM 관찰결과 세포 파종 1일 후 지지체 표면관찰 결과 세포가 다공 사이로 들어가 자리 잡고 있는 것을 관찰할 수 있고, PLGA에서는 세포가 아직 부착되지 못하고 뭉쳐있는 것을 확인할 수 있는데 이는 소수성이 강하기 때문으로 사료되며, 실크함량이 높을수록 부착이 더욱 잘 된 세포 모폴로지를 확인할 수 있었다. 이는 세포가 초기 부착할 수 있는 환경과 관련되는데 이 환경이 표면의 거칠도와 수분친화도의 상호작용을 확인할 수 있는 결과이다.⁴⁴⁻⁴⁷ 3일 후에는 세포가 많이 퍼져 있으며, 실크를 둘러싸고 세포가 부착하고 증식이 활발해지는 것을 확인할 수 있었다. 5일 후 PLGA 지지체에 비해 실크/PLGA 지지체에서 세포의 증식이 매우 활발하며 지지체 전체에 세포가 자리 잡았으며 많이 차 있는 것을 확인할 수 있다. 지지체의 표면 거칠도는 세포의 부착도를 높이고, 세포와 지지체간의 상호작용을 증가시킨다.⁴⁴ 세포가 PLGA보다 실크섬유 위주로 부착하고, 실크섬유의 단백질에 의해 증식이 잘 되는 것은 실크섬유가 PLGA보다 상대적으로 낮은 계면에너지를 가져 수분친화력이 강하기 때문이다.⁴⁵⁻⁴⁷ 세포의 부착이 세포의 증식과 직접적인 관계가 있으며, 세포의 부착과 증식은 친수성에 많이 의존하는 것을 확인할 수 있었다.

염증반응. 실크의 함량에 따라 PLGA 지지체의 염증완화 정도를 정량화하기 위해 ELISA 분석법을 이용하여 TNF- α 의 방출을 비교 분석하여 Figure 9에 나타내었다. 생체의 면역감시기구에서 1 선을 담당하고 있는 대식세포는 바이러스 감염세포, 미생물, 종양에 대한 중요한 방어기구로 알려져 있으며,⁴⁸ 종양세포에 대한 방어기전으로 IL-1, TNF- α 와 같은 사이토카인과 반응성 질소종인 질소(NO)를 분비한다.^{49,50} PLGA의 분해 대사산물로 인한 RAW 264.7이 분비하는 염증 매개 사이토카인인 TNF- α 의 방출량을 대조군으로 비교한 결과 실크의 함량이 높아질수록 TNF- α 의 방출이 줄어드는 경향을 보이며 20 wt%에서 가장 효과가 좋았다. 시간이 경과함에 따라 TNF- α 의 방출이 줄어들게 되는 이유는 세리신을 제거한 피브로인 아미노산으로 이루어진 실크섬유가 이물반응을 최소화하며,^{23,24} 소수성이 강한 PLGA의 이물반응을 줄여 염증반응이 감소하는 것으로 사료된다. 결과적으로 실크는

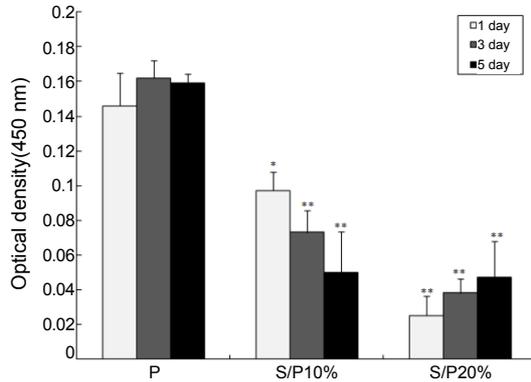


Figure 9. Inflammatory reaction of RAW 264.7 cell in PLGA and silk/PLGA hybrid scaffolds measured by ELISA after 1, 3, and 5 day post-*in vitro*. From the left, PLGA, silk/PLGA 10 wt% and silk/PLGA 20 wt%. Differences were considered statistically significant when * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

PLGA의 소수성을 완화하고, 이물반응을 줄여 염증반응을 감소시킬 수 있는 천연고분자임을 확인하였다.

결 론

본 연구에서 천연고분자인 실크섬유를 첨가한 실크/PLGA 다공성 지지체를 제조하여 PLGA가 가진 소수성을 개선하고, PLGA 지지체의 물성강화와 생체적합 지지체의 조건을 갖추기 위한 염증완화 효과를 연구하여 세포의 초기부착 및 표현형 유지에 최적 환경을 설계하고자 하였다. 실크/PLGA 지지체에서 실크섬유의 함량이 증가함에 따라 표면 거칠도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 물리적으로 실크섬유가 포함됨으로써 표면의 자유에너지가 증가하여 세포의 초기부착에 영향을 주게 되고, 수분친화력을 가진 실크섬유는 상대적으로 낮은 계면에너지를 제공하여 높은 표면적삼성과 수분흡수율을 제공하여 세포의 부착과 증식에 이로운 환경을 제공하였다.

생체 외 환경에서 실크함량에 따른 세포부착과 증식률을 확인하기 위해 실시한 MTT 분석과 SEM 분석 결과 실크의 함량이 증가할수록 초기 부착과 증식률이 우수한 것을 확인할 수 있었으며 실크섬유의 함량이 20 wt%에서 우수하였음을 확인할 수 있었다. 지지체와 세포의 상호작용으로 인한 염증 사이토카인의 정량화를 위한 ELISA 분석결과 염증유발인자인 TNF- α 의 방출이 실크함량이 20 wt%인 군에서 현저히 낮은 수치를 확인할 수 있었다. 천연고분자 실크섬유는 PLGA의 소수성을 보완하며, 지지체의 기계적 강도를 증가시키고, PLGA의 이물반응을 감소시키는데 긍정적인 영향을 보여 세포의 부착과 표현형 유지에 최적 환경을 제공하는 것을 확인하였다. 결과적으로, 조직공학 적 응용에 실크/PLGA 지지체가 유용할 것이라 제안한다.

감사의 글: 본 연구는 세계수준의 연구중심대학(WCU R31-20029)과 보건복지가족부(0405-BO01-0204-0006) 및 세포융용사업단(SC4110)의 연구지원에 의하여 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. R. Langer and D. Tirrell, *Nature*, **428**, 487 (2004).
2. S. Petit-Zeman, *Nature Biotech.*, **19**, 201 (2001).
3. G. Khang, S. J. Lee, I. Lee, and H. B. Lee, *Polym. Sci. Tech.*, **13**, 4 (2002).
4. I. G. Park, S. H. Oh, and J. H. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 164 (2004).
5. W. Y. Jang, S. H. Kim, I. Lee, M. S. Kim, J. M. Rhee, G. Khang, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **2**, 100 (2005).
6. S. J. Lee, G. Khang, J. H. Lee, Y. M. Lee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **24**, 877 (2000).
7. K. S. Park, S. M. Kim, M. S. Kim, I. Lee, J. M. Rhee, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **30**, 455 (2006).
8. S. L. Ishaug-Riley, L. E. Okun, G. Prado, M. A. Applegate, and A. Ratcliffe, *Biomaterials*, **20**, 2245 (1999).
9. S. M. Kim, S. H. Kim, C. M. Kim, A. Y. Oh, G. A. Kim, I. W. Lee, J. M. Rhee, G. Khang, M. S. Kim, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **4**, 179 (2007).
10. Y. K. Ko, S. H. Kim, J. S. Jeong, H. J. Ha, S. J. Yoon, J. M. Rhee, M. S. Kim, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **31**, 14 (2007).
11. G. Khang, M. S. Kim, S. H. Cho, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 9 (2004).
12. N. R. Jeon, E. H. Jo, H. J. Park, J. S. Choi, S. J. Lee, M. V. Dyke, J. J. Lee, D. Lee, J. M. Rhee, and G. Khang, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **6**, 819 (2009).
13. H. H. Hong, S. H. Kim, A. Y. Oh, N. R. Jeon, S. H. Jung, S. J. Lee, M. V. Dyke, J. J. Yoo, Y. Son, J. M. Rhee, and G. Khang, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **5**, 861 (2008).
14. E. I. Shishatskaya, T. G. Volova, A. P. Puzyr, and O. A. Mogilnaya, *J. Mater. Sci. : Mater. Med.*, **15**, 719 (2004).
15. T. Volova, E. Shishatskaya, V. Sevastianov, S. Efremov, and O. Mogilnaya, *Biochem. Eng. J.*, **16**, 125 (2003).
16. Y. L. Cui, A. D. Qi, W. G. Liu, S. H. Wang, H. Wang, D. M. Ma, and K. D. Yao, *Biomaterials*, **24**, 3859 (2003).
17. H. H. Hong, S. H. Kim, A. Y. Oh, N. R. Jeon, S. H. Jung, S. J. Lee, M. Dyke, J. J. Yoo, Y. Son, J. M. Rhee, and G. Khang, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **5**, 4 (2008).
18. N. Minoura, S. I. Aiba, M. Higuchi, Y. Gotoh, M. Tsukada, and Y. Imai, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **208**, 511 (1995).
19. N. Minoura, M. Tsukada, and M. Nagura, *Polymer*, **31**, 26, (1990).
20. M. Santin, A. Motta, G. Freddi, and M. Gannas, *J. Biomed. Mater. Res.*, **46**, 382 (1999).
21. N. Minoura, S. Aiba, Y. Gotoh, M. Tsukada, and Y. Imai, *J. Biomed. Mater. Res.*, **29**, 1215 (1995).
22. G. Altman, R. L. H. Horan, J. Moreau, I. Martin, J. Richmond, and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, **23**, 4131 (2002).
23. H. K. Soong and K. R. Kenyon, *Ophthalmology*, **91**, 479 (1984).
24. S. Sofia, M. B. McCarthy, G. Gronowicz, and D. L. Kaplan, *J. Biomed. Mater. Res.*, **54**, 139 (2001).

25. N. Minoura, M. Tsukada, and M. Nagura, *Biomaterials*, **11**, 430 (1990).
26. J. Qian, Y. Liu, H. Liu, T. Yu, and J. Deng, *Biosens. Bioelectron.*, **12**, 1213 (1997).
27. T. Hanawa, A. Watanabe, T. Tsuchiya, R. Ikoma, M. Hidaka, and M. Sugihara, *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 282 (1995).
28. B. Panilaitis, G. H. Altman, J. Chen, H. J. Jang, V. Karageorgiou, and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, **24**, 3079 (2003).
29. G. H. Altman, F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R. L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond, and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, **24**, 401 (2003).
30. Y. Iwasaki, S. Sawada, and K. Ishihara, *Biomaterials*, **23**, 3897 (2002).
31. C. Gerad, *Nature Immunol.*, **6**, 366 (2005).
32. S. D. Patil, F. Papadimitrakopoulos, and D. J. Burgess, *J. Control. Release*, **117**, 68 (2007).
33. G. R. Kose, F. Korkusuz, and P. Korkusuz, *Tissue Eng.*, **10**, 1234 (2004).
34. S. H. Baek, J. H. Lee, J. W. Lee, M. L. Cho, S. I. Kim, J. I. Kim, D. S. Kim, S. H. Lee, and G. T. Kim, *J. Kor. Rheum. Assoc.*, **15**, 2 (2008).
35. U. Klueh, D. I. Dorsky, F. Moussy, and D. L. Kreutzer, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **67**, 838 (2003).
36. B. S. Choi, S. H. Kim, S. J. Yoon, H. J. Ha, M. S. Kim, Y. I. Yang, Y. Son, G. Khang, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **3**, 295 (2006).
37. S. H. Kim, K. S. Park, B. S. Choi, J. M. Rhee, M. S. Kim, H. B. Lee, and G. Khang, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **585**, 167 (2006).
38. Y. K. Ko, S. H. Kim, J. S. Jeong, H. J. Ha, S. J. Yoon, J. M. Rhee, M. S. Kim, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **31**, 14 (2006).
39. M. O. Beak, S. H. Kim, J. W. So, J. M. Rhee, M. S. Kim, H. B. Lee, and G. Khang, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **4**, 571 (2007).
40. B. Wang, J. Han, Y. Gao, Z. Xiao, B. Chen, X. Wang, W. Zhao, and J. Dai, *Neurosci. Lett.*, **421**, 191 (2007).
41. V. Karageorgiou and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, **26**, 5474 (2005).
42. H. K. Hong, S. H. Kim, S. K. Lee, Y. H. Lee, S. J. Kim, O. Y. Kim, D. Lee, J. M. Rhee, Y. Son, and G. Khang, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **6**, 1029 (2009).
43. J. W. Jang, B. Lee, C. W. Han, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **28**, 382 (2006).
44. J. C. Keller, G. B. Schneider, C. M. Stanford, and B. Kellogg, *Implant Dent*, **12**, 175 (2003).
45. J. K. Park, *News & Information for Chemical Engineers*, **21**, 613 (2003).
46. D. J. Mooney, L. Cima, R. Langer, L. K. Hansen, D. E. Injebber, and J. P. Vacanti, *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.*, **252**, 345 (1992).
47. A. G. Mikos and J. S. Temenoff, *Elec. J. Biotech.*, **3**, 1 (2000).
48. J. L. Urban, H. M. Shepard, J. L. Rothstein, B. J. Sugarman, and J. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **83**, 5233 (1986).
49. C. Nathan, *J. FASEB*, **6**, 3051 (1992).
50. C. Nathan, *Cell*, **82**, 873 (1995).