

실크필름에 배양한 망막색소상피세포의 거동

이소진 · 김혜윤 · 김슬지 · 양재원 · 이선의 · 박찬흠* · 주천기** · 강길선†

전북대학교 BIN 융합공학과, 고분자나노공학과,

*한림대학교 의과대학 춘천성심병원 이비인후과, **가톨릭 의과대학 안과학

(2013년 12월 12일 접수, 2014년 1월 25일 수정, 2014년 1월 29일 채택)

Behavior of Retinal Pigment Epithelial Cells Cultured on Silk Films

So Jin Lee, Hye Yun Kim, Seul Ji Kim, Jaewon Yang, Seon Ui Lee, Chan Hum Park*,
Choun-Ki Joo**, and Gilson Khang†

Department of BIN Fusion Technology, Department of Polymer-Nano Science & Technology and Polymer BIN Research Center,
Chonbuk National University, 567 Baekje-daero, Deokjin, Jeonju 561-756, Korea

*Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Chuncheon Sacred Heart Hospital, College of Medicine,
Hallym University, 1-1 Okcheon, Chuncheon, Gangwon 200-702, Korea

**Department of Ophthalmology and Visual Science, The Catholic University of Korea, Seoul St. Mary's Hospital,
College of Medicine, 505 Banpo-dong, Seocho-ku, Seoul 137-701, Korea

(Received December 12, 2013; Revised January 25, 2014; Accepted January 29, 2014)

초록: 망막색소상피(RPE)는 건강한 망막을 유지하는데 중요한 역할을 하고 RPE의 퇴화는 많은 망막질환을 유발한다. RPE 이식은 최근 망막 퇴화에 대한 가능성 있는 치료법으로 제시되고 있다. RPE 세포를 안전하게 이식하기 위해서는 지지체가 필요하므로 독특한 기계적 성질과 생체적합성을 갖는 실크를 사용하여 필름을 제조하였다. 실크필름의 FTIR, 접촉각 및 생분해성을 측정한 후, RPE 세포를 실크필름에 파종하여 그 영향을 확인하였다. MTT 분석, SEM, 면역형광염색, RT-PCR을 통해 세포의 부착, 생존도, 형태유지, 특이적 mRNA의 발현을 분석하였다. 본 연구에서는, 실크필름에 배양한 RPE 세포의 부착, 증식 및 표현형 유지가 뛰어난 것을 확인함으로써 실크필름의 망막 재생을 위한 조직 공학적 지지체로의 응용 가능성을 제시했다.

Abstract: The retinal pigment epithelium (RPE) plays an important role in maintaining a healthy retina and the degeneration of RPE caused a number of retinal diseases. The transplantation of RPE has recently become a possible therapeutic modality for retinal degeneration. To transplant RPE cells securely, substrates are essential, and then as a substrate, we fabricated films using silk that has unique mechanical properties and biocompatibility. After the FTIR spectra, contact angle and biodegradation of silk films were confirmed, RPE cells were seeded and the influence of RPE cells on silk films was examined. We measured the cell adhesion, cell viability, morphology and specific mRNA expression by MTT assay, SEM, immunofluorescence and RT-PCR. In this study, we confirmed that attachment, proliferation and phenotype maintenance of RPE cells cultured on silk films were great, and thereby we were able to confirm the potential applications of silk films as tissue engineering carrier for regeneration of retina.

Keywords: retinal pigment epithelial cells, silk, film.

서 론

부르크막(Bruch's membrane)과 함께 망막의 가장 바깥층을 구성하는 망막색소상피(retinal pigment epithelium, RPE)는 육각형의 모양으로 세포간 결합이 치밀이음으로 연결되어 있으며 단세포층을 이루고 있다.^{1,2} RPE는 빛 에너지를 흡수하

고, 망막하 공간에서 혈액으로 이온, 물, 신진대사 최종산물을 수송하며 혈액으로부터 글루코스, 레티놀, 지방산과 같은 영양분을 흡수하여 광수용체로 전달한다. 레티날은 RPE와 광수용체 사이에서 끊임없이 교환되고 광수용체 외절은 식균작용을 한다. 또한 RPE는 맥락막모세혈관층과 광수용체의 구조적인 안정을 유지하기 위해 다양한 성장인자를 분비한다. RPE는 이러한 복잡하고 다양한 기능을 하고 이 중 하나라도 손실이 된다면 망막의 퇴화가 일어나고 결국엔 시력을 잃게 되기 때문에 시기능을 수행하는데 아주 중요한 존재이다.^{3,4}

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

전 세계적으로 실명의 3대 원인 중 하나인 연령관련 황반 변성(age-related macular degeneration, AMD)은 노화에 따라 망막 중심부에 위치한 황반 기능이 저하됨으로써 시력장애가 생기는 질환이다.^{5,6} 현재 AMD 환자에게 일반적으로 이루어 지는 치료법에는 레이저광역동치료(photodynamic therapy)와 항혈관내피세포성장인자(anti-vascular endothelial growth factor, anti-VEGF) 주입법이 있으나 망막하 출혈이 일어나거나 기능 회복이 효과적이지 않다.⁷ 망막색소변성증(retinitis pigmentosa, RP)은 약 3500명 중 1명의 비율로 발생하는 유 전적 돌연변이에 의한 망막 질환이다. 야맹증, 시력장애 등의 증상에서 시력을 잃게 될 수도 있는 질병으로 RP에 대한 치 료법은 현재 없지만 임상응용으로 다양한 접근이 행해지고 있다.^{8,9}

위와 같이 망막의 퇴화가 일어나면 질병의 진행을 늦출 수 있는 치료법이 존재하나 완전히 퇴화를 중단시키거나 환자들의 시력, 망막기능을 회복시키는 치료법은 없어 궁극적으로 실명을 피할 수 없게 된다.¹⁰ 따라서 지지체와 함께 RPE 세포를 이식하거나 세포 현탁액을 주입하는 식으로 RPE를 대체하는 방법이 새로운 가능성으로 제시되고 있다. 망막하 공간으로 세포 현탁액을 주입하는 방식은 세포 손실이 많고 성공률 또한 낮았고, 지지체를 사용하여 이식하는 방법은 살아 있는 RPE 세포의 양을 향상시켰다고 보고된 바 있다.^{10,11}

여러 가능성 있는 생체재료 중에 누에 *Bombyx mori*로부터 만들어지는 실크는 섬유성 단백질인 피브로인과 점착성 단백질인 세리신으로 이루어진 천연 단백질이다. 세리신은 실크 단백질의 25~30%를 구성하고 고치 형성을 돕는 연속적인 점 착성의 층으로 피브로인을 감싸고 있다.¹²⁻¹⁴ β -sheet 구조로 된 선형의 폴리펩타이드인 실크 피브로인은 면역반응을 거의 나타내지 않고 우수한 기계적 강도, 생체적합성, 생분해성 때

문에 생체재료로써 많은 생물의학 및 생명공학에의 응용에 유용하다.^{15,16} 또한 정제된 실크 피브로인으로부터 투명 막, 다공성 스펀지 및 전기방사 섬유와 삼차원 지지체를 포함한 다양한 구조의 제조가 가능하여 조직공학 재료로 다재다능하게 쓰일 수 있기 때문에 지지체로 사용하기에 매력적인 생체 재료이다.¹⁷⁻¹⁹ 실크 피브로인은 1990년대 중반 이후부터 생체 내에서 세포 배양 및 조직 공학을 위한 생체재료로 사용되기 시작하여 초반에는 천연 피브로인으로 제조한 실크필름이 쥐의 섬유아세포의 부착과 증식에 도움을 주는 지에 대한 연구에 적용되었다.²⁰ 그 외에도 실크 기반의 지지체는 성공적으로 피부, 뼈, 연골, 힘줄 및 인대의 조직 공학에 적용되고 있다.^{21,22}

따라서 본 연구에서는 이러한 조직공학적 접근에 따라 망 막재생을 위한 독특한 기계적 성질과 생체적합성을 갖는 실크를 사용하여 필름을 제조하고 손상된 망막의 재생에 기초 하여 실크필름에 대한 망막색소상피세포의 안정성과 부착 및 성장을 확인하기 위한 *in vitro* 연구를 진행하였다.

실 험

시약 및 재료. 누에고치는 계봉농장(Kyebong Farm, Korea)에서 구입하였고, 생분해성 고분자인 PLGA(poly(L-lactic-co-glycolic acid)(락타이드/글라이콜라이드 몰비 75/25, Resomer® RG756, Boehringer Ingelheim Chem. Co. Ltd., Germany)는 평균분자량이 90000 g/mole인 것을 사용하였다. 메틸렌클로라이드(MC, Tedia Co. Inc., USA) 및 이외의 모든 화학약품과 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다. 세포배양에 이용된 시약들은 Gibco(USA)사에서 구입하여 사용하였다.

필름 제조. 실크 수용액은 *Bombyx mori*의 누에고치로부터

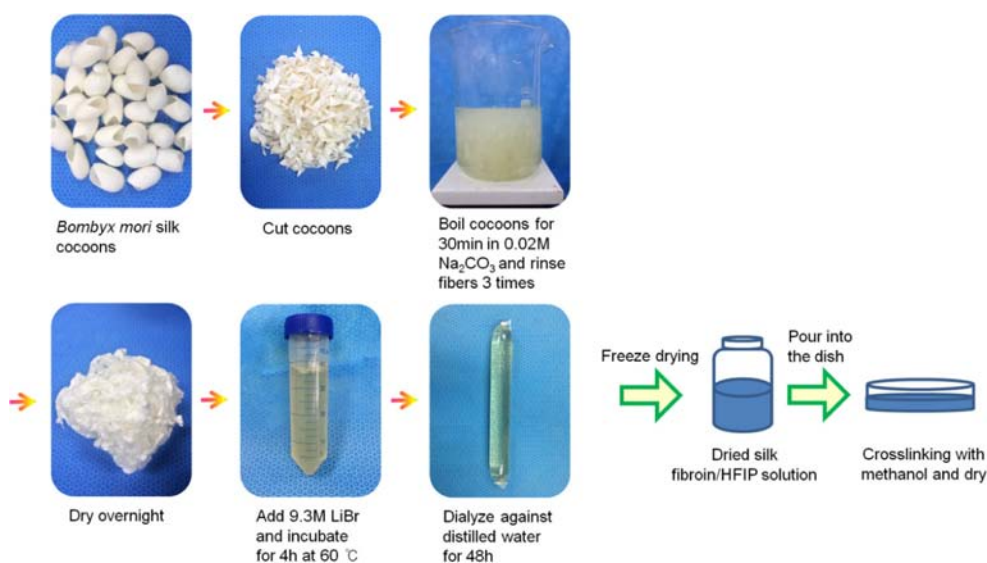


Figure 1. Schematic diagram of the silk fibroin extraction procedure and the fabrication process of silk films.

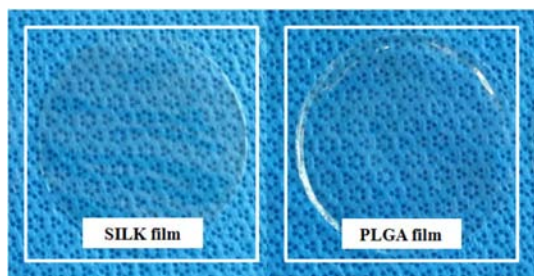


Figure 2. Photographs of silk and PLGA films.

터 Kaplan 등의 과정을 따라 준비하였다.²³ 고치를 잘게 잘라 0.02 M의 탄산나트륨(Na_2CO_3 , Showa Chemical, Japan)을 포함한 증류수에서 30분간 끓여 세리신을 제거하였다. 세리신이 추출되고 남은 피브로인을 증류수로 세 번 정도 반복하여 행군 후 상온에서 건조하였다. 건조된 피브로인은 9.3 M의 리튬브로마이드(LiBr, Kanto Chemical, Japan) 용액에 60 °C에서 4시간 동안 용해시켰다. 실크-피브로인 용액은 LiBr를 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 24시간 동안 -70 °C 상태에서 동결시킨 후, 5 mTorr, -80 °C 조건에서 완전히 동결건조하였다. 동결건조하여 얻은 실크피브로인 파우더 1 g을 10 mL의 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol(HFIP Sigma, USA)에 1시간 동안 60 °C에서 용해한 후, 직경 50 mm의 유리 디쉬에 각각 1 mL씩 분주하고 용매 증발법으로 2일간 건조하여 실크필름을 제조하였다. 실크필름은 99.5% 메탄올(Samchun Chemical, Korea)을 이용하여 상온에서 1시간 동안 가교하여 불수용성 필름으로 제조하여 사용하였다(Figure 1). 제조한 실크필름과 대조군으로 사용한 PLGA 필름을 Figure 2에 나타내었다.

세포 배양. 실험에서 사용한 ARPE-19 세포(Cell Line, ATCC® Catalog NO. CRL-2302)는 American Type Culture Collection(ATCC)에서 구입하였다. 세포는 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM, Gibco, USA)과 F-12 영양배지 혼합액(Ham's F-12, Gibco)에 10%의 우태아혈청(FBS, Gibco) 및 1%의 페니실린-스트렙토마이신(PS, 100 units/mL 페니실린과 100 µg/mL 스트렙토마이신, Gibco)을 첨가하여 37 °C, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 배양액은 3일에 한번 씩 교체하였다.

FTIR 분석. 적외선 분광 광도계(FTIR, GX, Perkin Elmer, USA)를 이용하여 4000~650 cm^{-1} 의 범위에서 필름의 적외선 스펙트럼을 측정하였다.

접촉각 측정. 접촉각은 표면의 친수성의 정도를 나타내고 이와 같은 물질의 표면 성질은 세포 부착에 영향을 미친다.^{24,25} 제조한 실크필름의 친수성을 평가하기 위해 물접촉각 측정기(Tantec™, CAM-PLUSmicro, USA)를 이용하여 실크필름의

표면에 5 µL의 증류수를 떨어뜨려 시료의 표면과 물방울이 이루는 각도를 측정하였다. 0, 1, 2, 4, 6, 8 및 10분 간격으로 접촉각을 측정하였으며, 3회 실시한 후 평균값을 취하였다. 대조군인 PLGA 필름 역시 같은 방법으로 접촉각을 측정하였다.

Biodegradation. 건조상태의 실크필름과 PLGA 필름의 무게를 각각 측정한 후, 1.0 mg/mL의 콜라게네이즈 A(Roche, Indianapolis, USA)와 대조군인 안산완충용액(PBS, pH 7.4)에 담겨 37 °C의 인큐베이터에서 분해 정도를 관찰하였다. 용액은 매일 교체해 주었으며, 1, 3, 7, 14, 21 및 28일에 무게 감소율을 확인하기 위하여 샘플을 증류수로 완전히 세척한 후, 데시게이터에 넣어 건조하여 필름의 무게를 측정하였다. 무게 손실률은 다음과 같은 식을 사용하였다.

$$\% \text{ loss} = [(W_i - W_f) / W_i] \times 100$$

W_i 는 초기 필름의 무게를 나타내고, W_f 는 인큐베이션 후의 필름 무게를 나타낸다.^{26,27}

MTT 분석. 제조한 실크필름에서의 세포 증식률을 알아보기 위하여 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움-브로마이드(MTT Amresco, USA) 분석법을 시행하였다. 실크필름과 대조군인 TCP(tissue culture plate), PLGA 필름에 RPE 세포를 100 세포/ mm^2 의 밀도로 파종하고 배양하였다(n=3). 배양한지 1, 3, 5 및 7일째에 기존의 배양액을 제거하고 새로운 배양액 1 mL을 넣어준 후 MTT 시약을 100 µL씩 넣고 4시간 동안 5% CO_2 , 37 °C 인큐베이터에서 배양하였다. 보라색 결정이 생성되면 미디엄과 MTT 시약을 제거하고, 디메틸설폭사이드(DMSO, Sigma) 용액을 1 mL 씩 넣어 결정을 용해하여 96웰에 샘플을 100 µL씩 분주하였다. 마이크로플레이트 리더기(E-max, Molecular Device, USA)를 이용하여 흡광도 570 nm에서 측정하였다.

주사전자현미경(SEM) 관찰. 실크필름에서 RPE 세포의 증식 및 부착형태를 관찰하기 위해 SEM 측정을 실시하였다. 24웰 크기로 필름을 잘라 2×10^4 세포/필름의 농도로 파종하고, 1, 3, 5 및 7일 동안 배양한 후 배양액을 제거하고 PBS(phosphate buffer saline)로 세척하였다. 필름에 부착한 세포를 2.5% 글루타알데하이드(Sigma)로 24시간 동안 고정하고, 알코올 구배용액(50, 60, 70, 80, 90 및 100%)을 이용하여 각 20분씩 탈수과정을 진행하였다. 지지체를 잘라 시료홀더에 고정시킨 후, 아르곤 가스 하에서 플라즈마 스퍼터(Emscope, Model SC500K, UK)를 이용하여 약 200 µm의 두께로 백금 코팅하고 이를 주사전자현미경(Hitachi Co, Model S-2250N, Japan)을 이용하여 각 실험 군에서의 세포 형태를 관찰하였다.

mRNA 분리 및 RT-PCR 분석. 실크필름과 대조군인 TCP, PLGA 필름에 배양한 RPE 세포의 유전자 발현 정도를 확인하기 위하여 RT-PCR을 실시하였다. 세포는 100 세포/ mm^2 의 밀도로 계산하여 파종하였고 7일 동안 배양하였다. 세포

Table 1. Primers and Protocol for Thermal Cycling

Gene amplified	Forward	Reverse	Size (bp)
GAPDH	ACC ACA GTC CAT GCC ATC A	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA	450
CRALBP	TTC CGC ATG GTA CCT GAA GAG GAA	ACT GCA GCC GGA AAT TCA CAT AGC	301
MITF	TTC ACG AGC GTC CTG TAT GCA GAT	TTG CAA AGC AGG ATC CAT CAA GCC	106
RPE65	GCC CTC CTG CAC AAG TTT GAC TTT	AGT TGG TCT CTG TGC AAG CGT AGT	259

를 배양한 기존의 배양액을 제거하고 1 mL의 RNAiso Plus (Takara, Japan)과 0.2 mL의 클로로포름(Sigma)을 처리하여 세포에서 RNA 층을 분리하였고 상층액을 취하여 0.5 mL의 이소프로판올(Sigma)을 넣고, 4 °C에서 하루 동안 보관하였다. 24시간 후 침전된 RNA를 50 μ L의 프리위터(Invitrogen, USA)로 용해시켰다. cDNA로의 역전사와 증폭은 TOPscript™ one-step RT-PCR kit(Enzyno Mics, Korea)를 이용하여 시행하였고, 증폭된 DNA를 에티디움브로마이드(EtBr, Sigma)가 포함된 1.0%(w/v) 아가로스겔(Sigma)에 전기영동을 수행한 후 상대적 발현을 시각화하여 300 nm 자외선 투과조사기 (Vilber Lourmat ETX-20.M, France)로 촬영하여 밴드의 발현 정도를 관찰하였다. ImageJ(NIH, USA) 프로그램을 통하여 밴드의 광도를 측정하고 GAPDH로 표준화하였다. 프라이머의 염기서열은 Table 1에 나타내었다.

면역형광염색. TCP, PLGA 및 실크필름에 배양한 RPE를 PBS로 세척하고 10% 포르말린용액(Sigma)으로 20분간 고정하였다. 고정한 세포에 0.1%의 트리톤 X-100(Sigma)을 침투시키고 PBS로 세 번 세척한 후, Protein block serum(Dako, USA)을 15분간 처리하였다. 1차 항체로 rabbit polyclonal antibody anti-RPE65 IgG(1:100, sc-32893, Santa Cruz Biotechnology Inc., USA)를 사용하였고 하루 동안 처리한 후, RPE65를 탐침하기 위해 Alexa Fluor® 594(1:200, Jackson ImmunoResearch, USA)를 사용하였다. 또한 핵 염색을 위한 다피염색에는 UltraCruz™ Mounting Medium(sc-24941, Santa Cruz Biotechnology Inc.,)을 사용하였다.

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

결과 및 토론

FTIR 분석. 실크필름의 구조적인 분석을 위해 적외선 분광 광도계를 이용하여 실크필름의 스펙트럼을 관찰하였다(Figure 3). FTIR 분석 결과, 네 가지의 Amide I(1630~1650 cm^{-1}), Amide II(1520~1540 cm^{-1}), Amide III(1230~1270 cm^{-1}) 및 Amide V(692~698 cm^{-1})와 관련한 특징적인 피크가 나타났다.²⁸

일반적으로, 실크피브로인은 α -helix, β -sheet, 랜덤코일의 세 가지 구조로 구성되어 있고, 그 중 α -helix 구조는 수용성이고, β -sheet 구조는 물을 포함한 다양한 용매에 불용성이

다.²⁹ 랜덤코일과 α -helix는 1660, 1540, 1235 및 650 cm^{-1} 에서 피크가 나타나고, β -sheet는 1630, 1530 cm^{-1} 에서 피크가 나타난다.³⁰ 실험에 사용한 실크필름은 물에 녹지 않도록 메탄올 처리를 하여 불용성의 β -sheet 구조로 전이가 일어나도록 하였다. 따라서 FTIR 결과는 실크필름 내에 β -sheet 구조가 지배적인 것을 증명했다.

친수성 평가. 실크필름의 친수성을 평가하기 위해 접촉각을 측정하였다. Figure 4는 시간이 경과함에 따라 실크필름

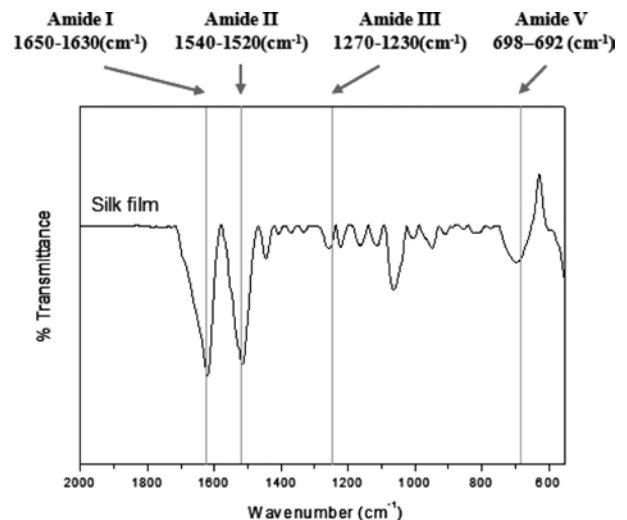


Figure 3. FTIR spectra of silk film.

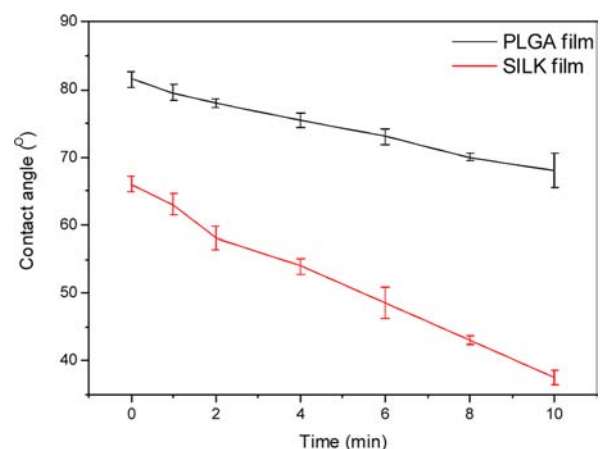


Figure 4. Contact angle of water deposited on the surface of silk and PLGA films as a function of time.

및 PLGA 필름의 표면과 이루는 물의 접촉각이 점차 감소하는 것을 보여준다. 접촉각이 둔각일 경우 소수성을 띠고, 예각일 경우 친수성을 띠는데,²⁴ 특히 40~70°의 접촉각을 갖는 표면에 세포가 잘 부착하게 된다.²⁵ 접촉각 측정 결과를 통해 PLGA 필름에 비해 실크필름이 높은 친수성을 가지며 세포 부착에 좋은 영향을 미치는 접촉각을 갖는 것을 확인하였다. 이를 바탕으로 친수성의 실크필름은 RPE를 배양하는데 더 좋은 환경을 제공할 것으로 사료된다.

Biodegradation. 빠른 속도로 분해하는 재료는 조직이 안정해지기 전에 강도가 약해질 수 있고, 분해가 되지 않는 재료는 조직의 성장을 방해한다. 따라서 생체재료를 이식할 경우, 이식 후에 조직을 그대로 유지하면서 천천히 분해하는 반면 계속해서 생물학적 기능을 하기를 요구한다.^{16,26} 실크필름과 대조군인 PLGA 필름의 분해성을 실험한 결과, PBS를 사용한 군에서는 질량 변화의 차이가 거의 없었다. 반면에, 콜라게네이즈를 사용한 군에서는 실크필름의 분해속도가 조금 빨랐고 PLGA 필름은 PBS를 사용했을 때와 비슷한 속도로 분해되었다(Figure 5). 또한 콜라게네이즈를 사용한 실험한 결과로는 생체재료를 이식했을 때 *in vivo* 결과를 예측해 볼 수 있다.

세포 형태 육안 관찰 및 세포 증식률. RPE를 TCP, PLGA 및 실크필름에 100 세포/mm²의 밀도로 파종하여 1일과 3일째에 광학현미경으로 세포의 형태와 증식을 관찰하였다. 실크필름에 배양한 세포의 형태와 증식 정도가 TCP에 배양한 것과 비슷한 것으로 보아 제조한 실크필름이 세포 배양에 좋은 조건을 갖는다고 사료된다(Figure 6).

TCP, PLGA 및 실크필름에서 RPE의 증식률을 확인하기 위해 각 실험군에 세포를 파종하고 1, 3, 5 및 7일 후에 MTT 분석을 하였다(Figure 7). 시간이 경과함에 따라 모든 실험군

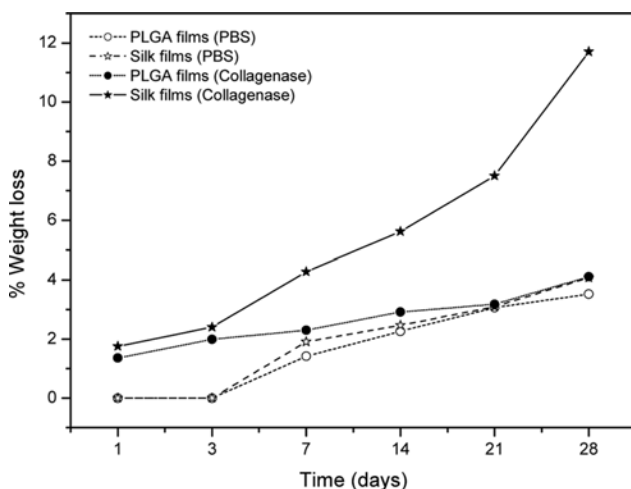


Figure 5. Percentage degradation of silk and PLGA films was evaluated in PBS and 1.0 mg/mL collagenase A.

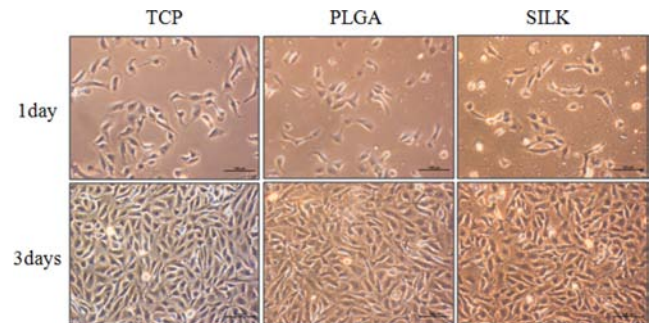


Figure 6. Micrographs of ARPE-19 cells after 1 and 3 days of growth on TCP, PLGA and silk films (magnification $\times 200$).

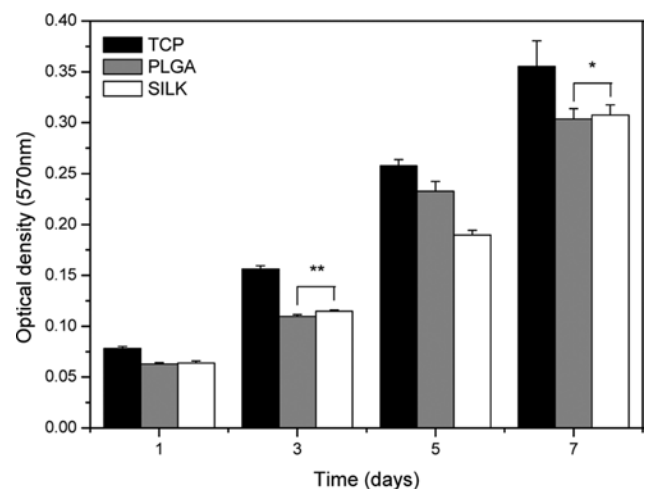


Figure 7. Proliferation of ARPE-19 cells on TCP, PLGA and silk films at 1, 3, 5 and 7 days after seeding ($p < 0.1^*$, $p < 0.01^{**}$).

에서 세포 증식이 일어났고 그 중 양성대조군인 TCP에 배양한 세포가 가장 높은 증식을 보였다. 실크필름에 배양한 세포의 증식은 TCP에 미치지 못하지만 일단 부착한 세포는 TCP의 것과 유사한 증식 속도로 꾸준히 증식하였음을 확인할 수 있었다. 또한 실크필름에서의 세포 증식이 PLGA 필름과 비교하여 볼 때 뚜렷하게 높지는 않았지만 실크는 PLGA의 단점인 생체 활성을 보완할 수 있는 천연 고분자라는 이점이 있다.

SEM 관찰. 실크필름에서의 RPE의 부착, 형태 및 증식을 육안으로 관찰하기 위해 SEM 분석을 실시하였고 TCP, PLGA 필름과 비교하였다(Figure 8). 세포 부착 1일째에는 차이를 보이지 않았고, 3일째부터 증식률과 형태 유지에 차이가 나타났다. MTT 분석 결과와 마찬가지로 TCP의 증식률이 가장 높았으며 실크필름과 PLGA 필름에서도 세포가 잘 증식하는 것을 육안으로 SEM을 이용하여 관찰할 수 있었다. 실크필름과 PLGA 필름에서 배양한 세포의 증식 속도는 큰 차이가 없는 듯 보이나 PLGA에 배양한 세포가 형태를 잃음으로써 세포 형태 유지에는 실크필름이 더 좋은 영향을 끼치는 것을

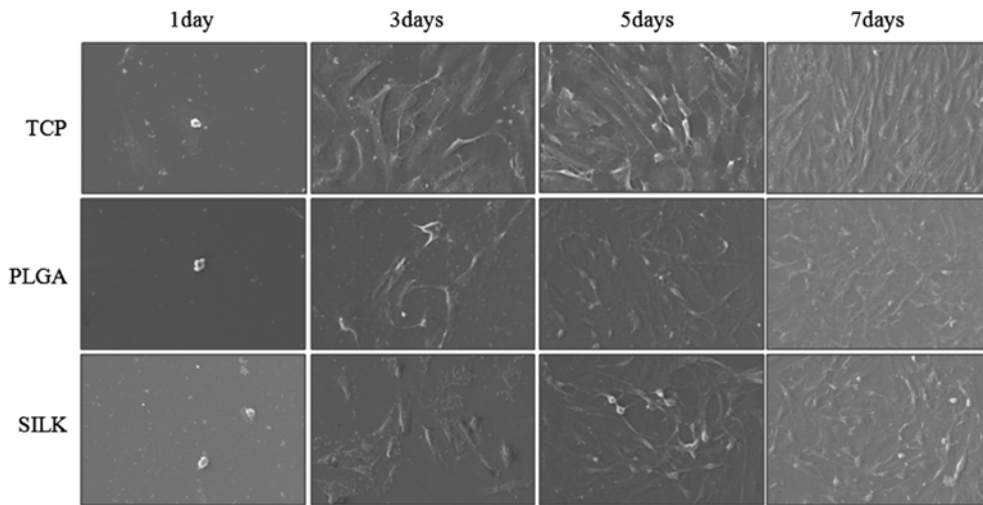


Figure 8. SEM micrographs of TCP, PLGA and silk films (Magnification $\times 500$).

확인하였다. 실크필름은 세포와 친화력이 있는 재료로써 세포의 부착을 돕고 세포의 형태를 조금 더 건강하게 유지하도록 도움을 준 것으로 사료된다.

mRNA 분리 및 RT-PCR 분석. TCP, PLGA 및 실크필름에 배양하였을 때 RPE의 특성 및 기능에 어떠한 영향을 주는지 확인하기 위해 RT-PCR을 실시하였다. mRNA 발현정도를 알아보기 위해 RPE 세포의 프라이머인 CRALBP, MITF 및 RPE65를 사용하여 mRNA 발현정도를 표준화하여 그래프화하였다. Figure 9(a)에 GAPDH의 밴드발현과 RPE에 특이적으로 존재하는 프라이머인 CRALBP, MITF 및 RPE65의 발현을 나타내었다. 모든 군에서 CRALBP, MITF 및 RPE65가 나타난 것을 확인할 수 있었고 발현세기를 정확히 확인하기 위하여 표준화하여 그래프로 나타내었다. Figure 9(b)에서 확인할 수 있듯이, CRALBP와 MITF는 PLGA 필름과 비교하여 실크필름에서 배양한 세포에서 더 높은 발현을 나타냈고, RPE65는 TCP보다도 높은 발현을 나타냈다. CRALBP와 RPE65는 시각회로에 중요한 단백질이고 MITF는 RPE의 분화에 중요한 단백질이다.³¹ 따라서 실크필름은 PLGA 필름보다 혹은 TCP보다도 RPE의 기능유지에 긍정적인 영향을 미치고 실크필름에 배양시 PLGA 필름에 배양할 때보다 세포가 더 건강한 상태를 유지하는 것으로 사료된다.

면역형광염색. RPE에서 발현되는 특이 단백질 발현을 확인하고 각 실험군에서 배양한 세포의 형태와 분포 양상을 평가하기 위해 면역형광염색을 실시하였다. RPE에서만 발현되는 특정 단백질인 RPE65를 1차 항체로 사용하였고 다염색으로 핵 염색을 하였다. 다염색 결과로 보아 모든 군에서 단일 세포로 고르게 부착된 것을 알 수 있었고, 증식률은 MTT 결과와 유사하였다. 특이 단백질인 RPE65는 RT-PCR 결과에 이어 양성대조군인 TCP에서 발현된 것만큼 실크필름에서도 발현이 되었음을 확인하였다. 따라서 실크필름은 RPE

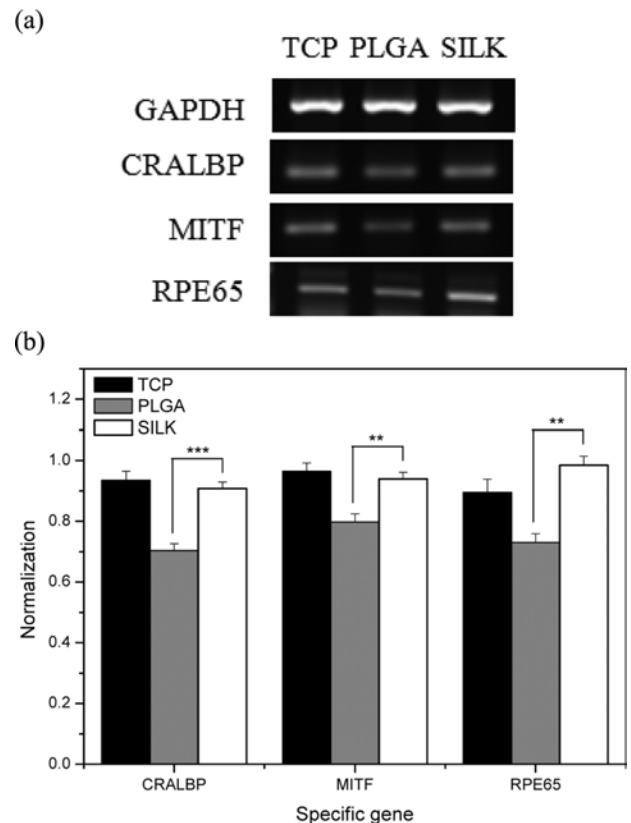


Figure 9. Gene expression profiles of GAPDH, CRALBP, MITF and RPE65 as analyzed by RT-PCR at 5days: (a) Agarose gel electrophoresis showing gene expression profiles; (b) Normalization of GAPDH expression by CRALBP, MITF and RPE65 ($p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$).

세포가 증식하고 표현형을 유지하는 데에 긍정적으로 작용한 것으로 사료된다(Figure 10).

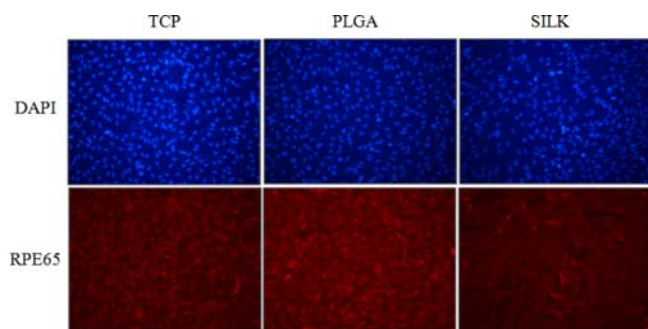


Figure 10. Expression of RPE65 on TCP, PLGA and silk films (Magnification $\times 200$).

결론

본 연구에서는 천연고분자인 실크를 이용하여 제조한 필름이 세포증식과 부착에 어떤 영향을 미치고 망막 재생을 위한 이식 지지체로서 적합한지 알아보려고 실크필름에 RPE 세포를 배양하여 *in vitro* 분석을 실시하였다. 실크필름의 FTIR, 접촉각 및 생분해성을 분석한 후, TCP, PLGA 및 실크필름에 RPE 세포를 파종하였고 세포의 증식률, 형태 및 mRNA 발현을 측정하여 RPE 세포의 성장 및 거동을 관찰하였다. 실크필름의 접촉각과 생분해성 분석을 통해 대조군인 PLGA에 비해 세포 배양과 이식 지지체에 적합하다는 결과를 얻을 수 있었다. 이 결과를 바탕으로 진행한 MTT 분석, SEM 관찰을 통해 실크필름이 RPE 세포의 안정성과 부착, 그리고 세포의 성장을 잘 유도함을 확인하였고 RT-PCR과 면역형광염색을 관찰한 결과 RPE 세포의 특이 단백질의 발현이 잘 되었음을 확인할 수 있었다. 따라서 생체 활성이 부족한 합성고분자 PLGA에 비해 천연고분자인 실크는 빠른 거동을 증가시키고, 망막색소상피세포의 부착, 증식 및 분화 등 기능적인 면에 관여하여 세포에 긍정적인 영향을 미치므로 망막재생에 있어 유용한 지지체로 사용될 수 있을 것이라 사료된다.

감사의 글: 본 연구는 2012년도 NRF 바이오·의료기술개발 사업(2012M3A9C6050203)과 농림수산식품부 생명산업기술 개발사업(112007-05-1-SB010)의 지원을 받아 수행된 연구이므로 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. M. Kokkinaki, N. Sahibzada, and N. Golestaneh, *Stem Cells*, **29**, 825 (2011).
2. J. T. Lu, C. J. Lee, S. F. Bent, H. A. Fishman, and E. E. Sabelman, *Biomaterials*, **28**, 1486 (2007).
3. A. M. Shadforth, K. A. George, A. S. Kwan, T. V. Chirila, and D. G. Harkin, *Biomaterials*, **33**, 4110 (2012).
4. O. Strauss, *Physiol. Rev.*, **85**, 845 (2005).
5. K. Kinnunen, G. Petrovski, M. C. Moe, A. Berta, and K. Kaarniranta, *Acta Ophthalmol.*, **90**, 299 (2012).
6. C. Ahlers, E. Gotzinger, M. Pircher, I. Golbaz, F. Prager, C. Schutze, B. Baumann, C. K. Hitzemberger, and U. Schmidt-Erfurth, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **51**, 2149 (2010).
7. E. J. van Zeeburg, K. J. Maaijwee, T. O. Missotten, H. Heimann, and J. C. van Meurs, *Am. J. Ophthalmol.*, **153**, 120, e122 (2012).
8. I. Barone, E. Novelli, I. Piano, C. Gargini, and E. Strettoi, *PLoS One*, **7**, e50726 (2012).
9. V. Busskamp, J. Duebel, D. Balya, M. Fradot, T. J. Viney, S. Siegert, A. C. Groner, E. Cabuy, V. Forster, M. Seeliger, M. Biel, P. Humphries, M. Paques, S. Mohand-Said, D. Trono, K. Deisseroth, J. A. Sahel, S. Picaud, and B. Roska, *Science*, **329**, 413 (2010).
10. S. R. Hynes and E. B. Lavik, *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **248**, 763 (2010).
11. C. J. Lee, J. A. Vroom, H. A. Fishman, and S. F. Bent, *Biomaterials*, **27**, 1670 (2006).
12. Y. Q. Zhang, *Biotechnol. Adv.*, **20**, 91 (2002).
13. B. B. Mandal and S. C. Kundu, *Biomaterials*, **30**, 2956 (2009).
14. B. K. Gu, M. S. Kim, S. J. Park, and C. H. Kim, *Inter. J. Tissue Regen.*, **2**, 83 (2011).
15. S. Sahoo, S. L. Toh, and J. C. Goh, *Biomaterials*, **31**, 2990 (2010).
16. A. Vasconcelos, G. Freddi, and A. Cavaco-Paulo, *Biomacromolecules*, **9**, 1299 (2008).
17. H. Liu, X. Li, G. Zhou, H. Fan, and Y. Fan, *Biomaterials*, **32**, 3784 (2011).
18. L. J. Bray, K. A. George, S. L. Ainscough, D. W. Huttmacher, T. V. Chirila, and D. G. Harkin, *Biomaterials*, **32**, 5086 (2011).
19. L. Niu, R. Zou, Q. Liu, Q. Li, X. Chen, and Z. Chen, *J. Nanomaterials*, **2010**, 1 (2010).
20. Y. Wang, D. D. Rudym, A. Walsh, L. Abrahamsen, H. J. Kim, H. S. Kim, C. Kirker-Head, and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, **29**, 3415 (2008).
21. Y. R. Woo and K. Na, *Inter. J. Tissue Regen.*, **3**, 63 (2012).
22. L. P. Yan, J. M. Oliveira, A. L. Oliveira, S. G. Caridade, J. F. Mano, and R. L. Reis, *Acta Biomater.*, **8**, 289 (2012).
23. D. N. Rockwood, R. C. Preda, T. Yucel, X. Wang, M. L. Lovett, and D. L. Kaplan, *Nat. Protoc.*, **6**, 1612 (2011).
24. Y. Arima and H. Iwata, *Biomaterials*, **28**, 3074 (2007).
25. G. Thumann, A. Viethen, A. Gaebler, P. Walter, S. Kaempf, S. Johnen, and A. K. Salz, *Biomaterials*, **30**, 287 (2009).
26. R. L. Horan, K. Antle, A. L. Collette, Y. Wang, J. Huang, J. E. Moreau, V. Volloch, D. L. Kaplan, and G. H. Altman, *Biomaterials*, **26**, 3385 (2005).
27. B. B. Mandal, A. S. Priya, and S. C. Kundu, *Acta Biomater.*, **5**, 3007 (2009).
28. B. C. Dash, B. B. Mandal, and S. C. Kundu, *J. Biotechnol.*, **144**, 321 (2009).
29. S. Mobini, B. Hoyer, M. Solati-Hashjin, A. Lode, N. Nosoudi, A. Samadikuchaksaraei, and M. Gelinsky, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **101**, 2392 (2013).
30. H. J. Jin, J. Park, R. Valluzzi, P. Cebem, and D. L. Kaplan, *Biomacromolecules*, **5**, 711 (2004).
31. D. E. Buchholz, S. T. Hikita, T. J. Rowland, A. M. Friedrich, C. R. Hinman, and L. V. Johnson, *Stem cells*, **27**, 2427 (2009).