

실크피브로인을 함유한 PLGA 하이브리드 필름이 슈반세포의 부착과 증식에 미치는 영향

김혜린 · 유한나 · 박현진 · 김용기 · 이동원 · 강영선^{*,†} · 강길선[†]

전북대학교 BIN 융합공학과, 고분자 나노공학과, *건국대학교 의생명과학연구원
(2010년 5월 10일 접수, 2010년 8월 11일 수정, 2010년 9월 13일 채택)

Effect of PLGA/Silk Fibroin Hybrid Film on Attachment and Proliferation of Schwann Cells

Hye Lin Kim, Hanna Yoo, Hyun Jin Park, Yong Gi Kim,
Dongwon Lee, Young Sun Kang^{*,†}, and Gilson Khang[†]

Department of BIN Fusion Technology & Department of Polymer · Nano Science & Technology,
Chonbuk National University, 664-14, Dukjin Ku, Jeonju 561-756, Korea

*Institute of Biomedical Science and Technology, Konkuk University,
Hwayang, Gwangjin, Seoul 143-130, Korea

(Received May 10, 2010; Revised August 11, 2010; Accepted September 13, 2010)

초록: PLGA는 미국 식품의약품안전청의 승인을 받은 합성고분자로서 생체재료로 널리 쓰이며, 실크피브로인은 세포친화성 및 우수한 기계적 특성으로 세포의 조직성장을 지지한다. 본 연구에서는 PLGA/실크피브로인 0, 10, 20, 40 및 80 wt% 하이브리드 필름을 제조하였고 함량별 슈반세포의 최적환경을 설정하고자 하였다. DSC결과 PLGA/실크피브로인 필름이 *in vivo* 적용시 열적으로 안정할 것으로 사료되었다. 접촉각측정을 통해 PLGA/실크피브로인 10 및 20 wt% 필름이 세포 분화 및 증식에 적합할 것으로 사료되며 RT-PCR과 SEM 결과로부터 PLGA에 10 및 20 wt%의 실크피브로인을 함유한 필름에서 슈반세포의 우수한 부착거동 및 형태유지를 확인하였다. 또한 WST 결과 10 wt% 실크피브로인 함량에서 높은 증식률이 확인되었다. 결과적으로 PLGA/실크피브로인 10 및 20 wt% 필름이 세포에 알맞은 상호관계를 제공하여 긍정적으로 작용함을 확인하였다.

Abstract: Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) is a biodegradable synthetic polymer with acceptable mechanical strength and well-controlled degradation rate. Also, it can be easily fabricated into many shapes. Silk fibroin contains powerful bioactive molecules. We fabricated natural/synthetic hybrid films using 0, 10, 20, 40 and 80 wt% of silk fibroin. Schwann cells (SCs) were seeded on PLGA/silk fibroin hybrid films and confirmed the effects of adhesion and proliferation on SCs according to the content of silk fibroin. In this study, we confirmed PLGA/silk fibroin hybrid film containing 40% and 80% of silk fibroin interrupted adhesion and proliferation of SCs. Films containing 10% and 20% of silk, however, provided suitable environment for growth and proliferation of SCs. These results suggest that silk fibroin provides suitable surface to neural cells and its proper content provides proper culture conditions to improve cell adhesion and proliferation.

Keywords: silk fibroin, poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), Schwann cell, hybrid film, tissue engineering.

서 론

신경계는 들어온 자극을 종합해서 반응을 생성하는 뇌와 척수를 포함하는 중추신경계와 자극과 반응을 전기신호의 형태로 중추신경계에 전달하는 말초신경계로 구성되어 있다.¹ 신경손상은 말초신경시

스템을 약하게 하며 작은 갭의 재생도 매우 제한적이며, 중추신경시스템의 재생은 물리적, 화학적 방해로 인해 본질적으로 매우 어렵다.²⁻⁴ 최근 분자생물학에 의한 신경과학이 발달되면서 신경세포의 구조와 기능이 분자수준에서 해명되고 있으며 신경전달물질과 신경영양인자의 중요성이 부각되면서 오랜 동안의 정설을 뒤엎고 중추신경을 재생할 수 있다는 사실이 입증되었다.^{5,6}

손상되거나 잘린 신경의 재생에 있어서 수초는 중요한 역할을 한

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

다. 수초 안에는 신경이 지나가는 통로가 존재하며 신경에 손상이 일어나면 이 통로를 따라 신경재생이 이루어진다. 수초가 없으면 재생되려던 신경돌기들이 아무렇게나 뭉쳐 신경 종을 형성해 심한 통증을 일으키기도 한다.⁷⁻⁹ 슈반세포(Schwann cells, SCs)는 말초신경계의 주된 지지세포로서 신경의 축삭에 여러 영양인자 및 수초를 제공하는 역할을 담당한다. 이들은 신경절단 후 원위부에서 축삭이 재생되어 나올 때를 대비하여 번지 다발을 형성하며 라미닌, 콜라겐 IV 등 신경축삭의 성장을 촉진하는 기저층을 분비하고,^{10,11} 손상부위로 이동하여 신경성장인자와 뇌유래 신경전달인자 등을 생산하여 신경재생에 중요한 역할을 하며 중추신경재생에 있어 이용될 재생세포로 널리 연구되고 있다.^{12,13}

세포배양은 생체에서 분리한 세포를 효율적이고 경제적으로 배양하는 기술로, 생체세포는 물질표면에 부착하여 증식하는 것이 많기 때문에 세포와 친화력을 가진 재료가 세포배양 지지체로 사용될 수 있는데, 콜라겐이나 피브로백틴 등이 세포배양 지지체로 사용되고 있다. 이들은 공통적으로 세포인식 기능을 가지고 있다고 알려져 있는 Arg-Gly-Asp (RGD) 트립티이드를 가지고 있어 세포의 부착과 증식을 촉진하는 역할을 하는 것이 밝혀졌다.¹⁴ 이는 의약품 및 조직공학용 소재로서의 큰 응용가능성을 지니고 있는 생체활성 천연재료인 실크 피브로인 구조에도 일부 존재하는 것으로 알려져 있다.¹⁵ 실크단백질은 자연계에 존재하는 수많은 종류의 단백질 중에서도 97% 이상으로 순도가 높은 단백질로서¹⁶⁻¹⁸ 좋은 산소 및 수분투과성, 저염증 반응성, 비독성 및 비면역성의 특징을 지니고 있고¹⁹ 세포의 조직성장을 지지한다고 보고된 바 있다. 또한 생분해성 및 세포친화성의 특성 뿐 아니라 체내에서 각각의 구조상 조직들과 같이 우수한 기계적 특성을 갖고 골, 연골 및 인대의 조직공학적으로 성공적으로 조사된 바 있다.^{20,21}

세포의 부착과 증식 및 분화를 효과적으로 유도하는 기능을 하고, 인체 내에서 높은 생체친화성을 가지며 지지체로서의 역할을 다한 후 생체 내에서 안전하게 흡수 및 분해²² 조건을 갖춘 α -하이드록시산 계열인 폴리글리콜라이드(PGA), 폴리락타이드(PLA) 및 그들의 공중합체인 PLGA는 생체내에서 가수분해에 의하여 젖산과 글리콜산으로 전환되며 결국에는 이산화탄소와 물로 체외로 배출되는 생분해성 고분자로서 현재 많이 사용되고 있다.²³ 특히 PLGA는 비교적 좋은 생체 적합성, 생분해성 및 가공성을 가지고 단량체를 조절하여 분해기간의 조절이 가능한 장점을 지니고 있다.²⁴⁻²⁷ 그러나 PLGA의 표면은 소수성이어서 세포와의 초기부착도가 낮은 문제점을 가지고 있고 조직공학용 합성고분자로 제작한 구조체는 형태만을 제공하기 때문에 한계가 있다.²⁸⁻³⁰ 따라서 기존 PLGA의 문제점을 극복하기 위해 실크 피브로인의 뛰어난 생체적합성을 이용하여 천연재료로 하이브리드화시킨 지지체를 이용한 연구를 시도하였다.

본 연구는 신경손상 모델에서 신경재생을 유도하는 슈반세포의 배양에 실크피브로인이 미치는 영향을 확인하기 위해 PLGA와 함량별 실크피브로인을 혼합한 하이브리드 필름을 제조하여 신경세포 중 하나인 슈반세포를 파종하고 최적의 실크피브로인의 함량 확인 및 이에 따른 슈반세포의 특성분석을 시도하였다.

실 험

시약 및 재료. 천연 고분자인 실크생사는 동국대학교 생명과학연

구팀(Molecular Biology Laboratory, Dongguk University, Korea)에서 제공받아 세리신 제거 과정을 거친 후 동결분쇄(SPEX 6700, USA)하여 약 180 μm 크기 이하의 분말 형태로 얻었다. PLGA(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)와 이외의 모든 화학약품 및 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다.

PLGA/실크피브로인 하이브리드 필름제조. 용매증발법을 이용하여 PLGA 및 실크피브로인 분말을 함유한 PLGA/실크피브로인 하이브리드 필름을 제조하였으며 Figure 1에 모식도를 나타냈다. PLGA 0.1 g을 MC 5 mL에 용해시킨 PLGA 용액을 준비한 후 PLGA 중량의 0, 10, 20, 40 및 80 wt%에 해당하는 실크피브로인 분말을 첨가하여 고루 분산시켰다. 상기의 PLGA와 실크피브로인을 혼합한 분산용액(PLGA/실크피브로인)을 직경이 50 mm인 유리접시에 도포하고 잔존 유기용매를 제거하기 위해 상온에서 2~3일 동안 방치하였다.

슈반세포 분리 및 배양. 슈반세포의 배양법 중 손쉽고 안전하게 순수한 세포분리가 가능한 Morrissey의³¹ 방법을 이용하였다. 먼저 Fischer 쥐의 대퇴부에서 좌골신경을 분리하여 PBS로 여러 번 세척하고 상피를 벗겨낸 후 약 1 mm로 잘게 잘라 6-well 플레이트에 옮겨주었다. 3일에 한 번씩 배양액을 교체하고 7일에 한 번씩 새로운 용기로 신경조직을 옮겨주면서 배양하였다. 이러한 방법으로 섬유아세포가 일차적으로 제거되면 신경조직을 건어 0.1% 콜라게네이즈와 0.1%의 트립신 1:1 비율로 인큐베이터에서 30분 동안 처리한 후 메쉬(100 μm , Falcon)에 여과하여 폴리라이신(Sigma Co)으로 코팅된 플라스크에서 초대 세포 배양을 하였다. 세포는 Dulbecco's Modified Essential Media(DMEM)에 10% 우태아혈청, 1% 페니실린-스트렙토마이신, 2 μM 포스포콜린 및 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 소 뇌허수체 추출물을 첨가한 배양액을 이용하였으며 분리한 슈반세포는 2대 계대 배양 후 3대 계대 배양액에 사용하였다.

시차주사 열량계 측정. 실크피브로인의 함량에 따라서 변하는 PLGA/실크피브로인 필름의 열적특성을 관찰하기 위해 시차주사 열량계(DSC, TA Instrument, DSCs 2910, USA)를 이용하였다. DSC를

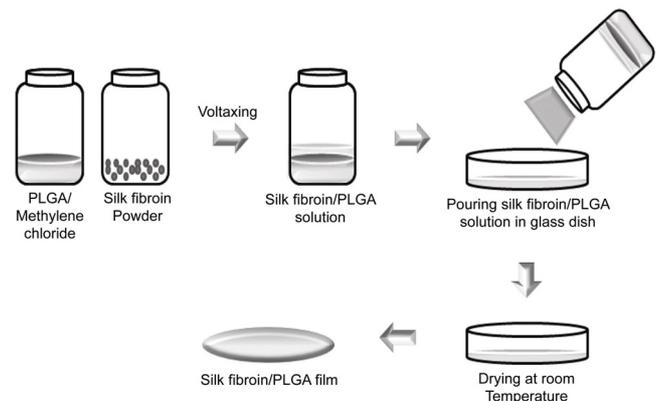


Figure 1. Schematic diagram illustrating the fabrication process of PLGA/silk fibroin hybrid film.

이용하여 30 °C에서부터 250 °C의 범위에서 PLGA/실크피브로인 필름의 열적 성질 변화를 측정하였다. 분석 조건으로 승온 속도는 분당 10 °C로 하였으며 질소기류 하에서 측정하였다.

접촉각 측정. 지지체의 친수성은 세포의 초기부착물에 영향을 미치며, 세포의 초기부착물의 증가는 결과적으로 세포의 증식을 향상시킨다. PLGA에 실크피브로인의 함량을 달리한 필름을 제조하고 물방울을 이용한 접촉각을 측정하여 친수성을 평가하였다. PLGA/실크피브로인 하이브리드 필름의 실크피브로인 함량에 따른 친수성을 확인하기 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 흡수 정도를 측정하기 위해 증류수를 떨어뜨리고 0, 2, 4, 6, 8 및 10분 간격으로 접촉각을 측정하여 물 흡수성 정도를 확인하였다.

세포증식을 측정. 세포증식 능력이나 세포생존 능력을 발색 측정으로 정량하기 위해 ELISA 플레이트 리더(E-max, Molecular Device, USA)를 이용하여 WST [2-(4-요도페닐)-3-(4-나이트로페닐)-5-(2,4-다이실포페닐)-2H-테트라졸리움모노소디움] 분석법을 시행하였다. 슈반세포를 트립신을 이용하여 실크피브로인이 다양하게 함유된 PLGA/실크피브로인 필름에 수확한 후 세포현탁액을 지지체당 2×10⁵세포/필름의 농도로 파종하여 상기의 배양액으로 정적배양하였다(각 지지체 n=4). 3, 7, 14일째에 WST 용액을 10 µL씩 넣고 4시간 동안 37 °C 인큐베이터에서 배양하여 96-well 플레이트에 시료를 100 µL씩 분주하여 450 nm의 흡광도로 측정하였다.

유전자 발현분석. PLGA/실크피브로인 필름에서 슈반세포의 표현형 유지를 확인하기 위해 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 수행하였다. 실크피브로인이 다양하게 함유된 PLGA/실크피브로인 필름에 파종된 슈반세포의 mRNA를 확인하고자 필름을 지름 1.5 cm로 잘라 세포배양용 24-well 플레이트에 실리콘몰드로 고정시켜 70% 알코올로 멸균하였다. 그 후 2×10⁵ 세포/필름 농도로 세포를 파종하여 3, 7 그리고 14일간 배양하여 각 날짜에 RT-PCR을 실시하였다. 세포배양 후 TRIzol (Invitrogen™, USA)을 처리하여 세포로부터 mRNA를 분리하고 Super Script™II RT (Invitrogen™)를 사용하여 cDNA로 전사하였다. 이렇게 전사시킨 cDNA는 2유닛 Taq DNA 폴리머라제를 포함한 PCR 마스터키트(Roche, Germany)를 이용하여 각 프라이머(GAPH, NF, S100)를 신장시켜 원하는 DNA의 특정영역을 증폭시켰다. PCR 수행 후 증폭된 DNA를 1.2%(w/v) 아가로스겔에 넣어

100 V에서 25분 동안 전기영동을 한 후, 상대적 발현을 SYBR 녹색 형광(SYBR™ Green I Nucleic Acid Gel Stain, Cambrex, U.K)에 의해 시각화하였으며 자외선 투과조사기(Vilber Lourmat ETX-20.M, France)에 위치하여 관찰하였다. 프라이머는 제노텍(Korea)으로부터 구입하였으며 프라이머의 염기 서열은 Table 1에 나타내었다.

세포형태 관찰. PLGA/실크피브로인 하이브리드 필름을 지름 1.5 cm로 잘라 세포 배양용 24-well에 실리콘 튜브로 고정시켜 70% 알코올로 멸균하였다. 여기에 슈반세포를 각각의 필름에 2×10⁵ 세포/필름의 농도로 파종하고 3, 7 그리고 14일간 배양하였다. 이 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척한 다음 2.5% 글루타르 알데하이드(Gibco)로 24시간 고정한 후 일련의 알코올을 이용하여 탈수 및 동결 건조하였다. 각 시료를 잘라 샘플폴더에 고정시킨 후 플라즈마 스퍼터(Emscope, Model SCs 500K, UK)를 이용하여 200 µm의 두께로 백금코팅하고 주사전자 현미경(Hitachi Co., Model S-2250 N, Japan)을 이용하여 실크피브로인 함량에 따른 PLGA/실크피브로인 하이브리드 필름에서의 세포의 부착 거동 및 세포 형태를 관찰하였다.

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

결과 및 토론

PLGA/실크피브로인 하이브리드 필름 제조. 함량별 실크피브로인이 함유된 PLGA 필름의 제조방식을 Figure 1에 나타내었다. PLGA 용액의 부피는 일정하게 고정하고 실크피브로인의 함량을 다르게 하였다. 제조된 각각의 PLGA/실크피브로인 하이브리드 필름은 실크피브로인의 함량이 높을수록 거칠어지는 경향을 나타내었고 표면은 덮개를 씌워 메틸렌클로라이드의 증발을 적당히 조절하였다.

PLGA/실크피브로인 하이브리드 필름의 열적거동 분석. 실크 피브로인 함량에 따른 필름의 열적거동을 관찰하기 위해 시차주사 열량분석을 하였고 이 결과를 Figure 2에 나타내었다. PLGA에 하이브리드시킨 실크피브로인의 성분 함량비에 따라서 유리전이온도가 이동하는 것으로 보고되고 있으나, PLGA와 실크피브로인 사이에서는 함량비 변화에 따른 유리전이온도의 이동이 관찰되지 않았다. 각 샘플의 녹는점(T_m)은 50 °C 이상에서 나타났으며 PLGA에 함량을 달리한 실크피브로인 필름의 녹는점은 거의 유사하였다. 이 결과를 바탕으로 PLGA

Table 1. Sequence and PCR Reaction Cycles of GAPDH, NF, and S100 Primer

Species	Protein	Primer sequence	Cycles
Rat	GAPDH	F: 5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3' R: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	28
Rat	NF	F: 5'-TGGAGAATGAGCTGAGAAGC-3' R: 5'-TTCGTAGCTCAATGGTCTC-3'	35
Mouse	S100	F: 5'-GACTCCAGGAGCAAAGGTGAC-3' R: 5'-CATCTTCGTCCAGCGTCTCCA-3'	30

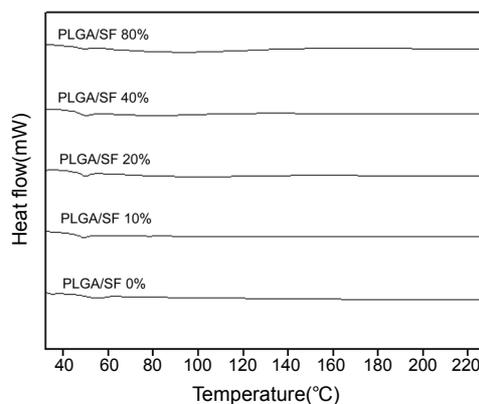


Figure 2. DSC thermogram of PLGA/silk fibroin (0, 10, 20, 40 and 80%) film.

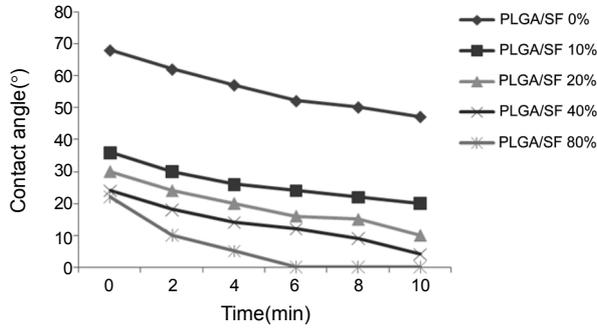


Figure 3. Water-uptake experiments using PLGA/silk fibroin (0, 10, 20, 40 and 80%) film.

필름의 성질에 실크피브로인이 큰 영향을 끼치지 않으며, PLGA/실크피브로인 하이브리드 필름을 *in vivo* 적용시 생체내 이식하더라도 열적으로 안정할 것으로 사료된다.

PLGA/실크피브로인 하이브리드 필름의 친수성 평가. PLGA에 함량을 달리한 실크피브로인으로 제조한 필름 표면의 친수성을 알아보기 위하여 접촉각 측정을 실시하였다. 시료와 물방울이 이루는 각도가 작을수록 친수성을 나타내고 측정결과를 그래프화시켜 Figure 3에 나타내었다. 실크피브로인을 함유하지 않은 PLGA 실험군에 비해 실크피브로인이 함유된 모든 실험군에서의 접촉각이 낮게 나타났고, 실크피브로인의 함량이 증가할수록 접촉각이 작고 물방울의 퍼짐이 빠르게 나타났었다. 초기접촉각 측정에서 80 wt%를 함유한 PLGA/실크피브로인 필름의 경우 다른 실험군과 비교했을 때 빠른 시간내에 작은 접촉각을 보였다.

이러한 결과는 실크단백질에 포함되어 있는 글리신, 알라닌 등 18종의 아미노산이 비교적 골고루 존재하는 실크피브로인이³² 소수성인 PLGA와 혼합되어 필름의 친수성을 증대시킨 것이라 사료되었다. 그러나 재료의 분해 및 흡수가 너무 빠르게 되면 장기간 세포증식 및 분화 조건을 유지하기 위한 생체재료의 조건을 충족시키지 못하게 된다. 따라서 과량이 아닌 10 및 20 wt%의 실크피브로인을 함유한 PLGA 필름이 세포가 성장하기 위해 적절한 조건이라 사료된다.

PLGA/실크피브로인 필름 내에서의 세포증식을 확인. 실크피브로인 함량을 달리한 PLGA/실크피브로인 필름에서의 세포성장률은 WST 분석을 통해 실시하였다. 세포과중 후 3, 7 및 10일째에 세포 성장을 Figure 4에 나타내었다. 3 및 7일째 세포증식 정도는 조금씩 차이를 보였으나 모든 실험군에서 유의성을 가지고 증식함을 확인하였다. 시간의 경과에 따라 10일째 세포증식률을 살펴보면 40 및 80 wt%의 실크피브로인이 함유된 PLGA/실크피브로인 필름에서의 세포증식률이 가장 저조하였으며 10 wt%의 실크피브로인 함유시 세포의 증식이 활발히 일어남을 확인할 수 있었다.

소수성의 PLGA에 10 wt%의 실크피브로인을 함유시킨 필름이 적절하게 친수성을 증대시킴으로써 증식률이 향상된 것을 확인하였고 상기의 친수성 측정 결과와 부합한 결과를 보이고 있다. 세포가 재료에 부착하기 위해서는 재료에 혈청단백질이 흡착되어야 한다.^{33,34} 소수성의 표면성질로 인해 세포와 재료사이의 직접적인 상호작용이 이루어지지 않은 PLGA 필름에 실크피브로인이 친수성을¹⁴ 부여함으로써 혈청 단백질 흡착을 유도하여 결과적으로 높은 세포생존율을 보인 것으로 사료된다.

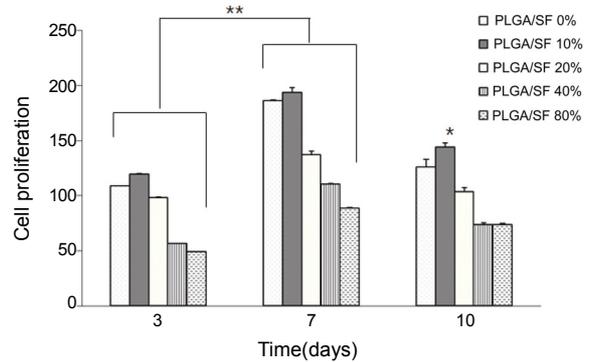


Figure 4. Cell proliferation of SCs in PLGA/silk fibroin (0, 10, 20, 40 and 80%) film analyzed by WST assay after 3, 7 and 10 day (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

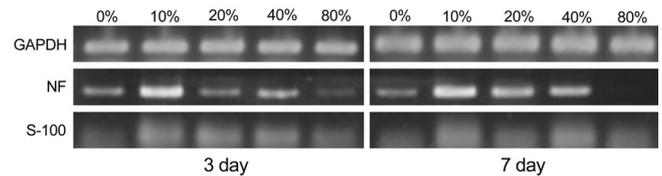


Figure 5. Effect of various slk fibroin contents on the gene expression of SCs specific markers.

PLGA/실크피브로인 하이브리드 필름에서 슈반세포의 mRNA 발현도 확인. 실크피브로인이 함유된 PLGA 필름에서 실크피브로인이 슈반세포의 mRNA 발현에 주는 영향을 확인하고자 각 필름에 세포를 과중한 후 3 그리고 7일째에 RNA 분리 및 RT-PCR을 수행하였다. 이를 통해 신경세포에서 특이적으로 발현하는 단백질 중에서 S100 및 액손의 형태를 유지하는 기능을 하는 neurofilament (NF)의 mRNA 발현정도를 확인하여 Figure 5에 나타내었다. 3일째 각 실험군에서 mRNA 발현은 큰 차이를 보이지 않았지만 PLGA에 10 wt%의 실크피브로인을 함유한 필름에서 아가로스겔상에서 나타난 띠가 굵고 선명함을 확인하였다. 시간이 경과함에 따라 7일째에서도 실크피브로인 함량이 10 wt%인 실험군의 발현정도가 가장 우수했으며 20 wt%인 실험군에서도 약간의 증가를 보였다.

그에 반해 0, 40 그리고 80 wt%인 실험군에서 NF 및 S100의 mRNA가 매우 미약하거나 발현되지 않음을 확인하였다. 결과적으로 실크피브로인의 함량에 따른 유전자 발현 정도의 차이로 보아 슈반세포의 세포의 기질에서 발생하는 NF 및 S-100과 같은 신경세포의 특이적 유전자는 실크피브로인의 함량이 10 및 20 wt%인 PLGA/실크피브로인 하이브리드 필름에서 더 우세한 신경세포 고유의 표현형을 유지하는 것으로 확인하였다.

PLGA/실크피브로인 하이브리드 필름에서 슈반세포의 부착거동 확인. 함량을 달리한 실크피브로인을 PLGA에 혼합시킨 필름표면에서의 세포증식 및 특성 유지여부를 확인하였다. 슈반세포의 부착과 형태에 실크피브로인이 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포 과중 후 3, 7 및 10일째에 SEM 분석을 실시하였고 이를 Figure 6에 나타내었다. PLGA 필름에서 실크피브로인의 함량이 증가할수록 거친 표면이 관찰되었다. PLGA 필름에서는 7일째까지 신경돌기가 잘 뻗어나온 반면 시간이 지남에 따라 10일째에서는 신경돌기의 뻗음이 미약

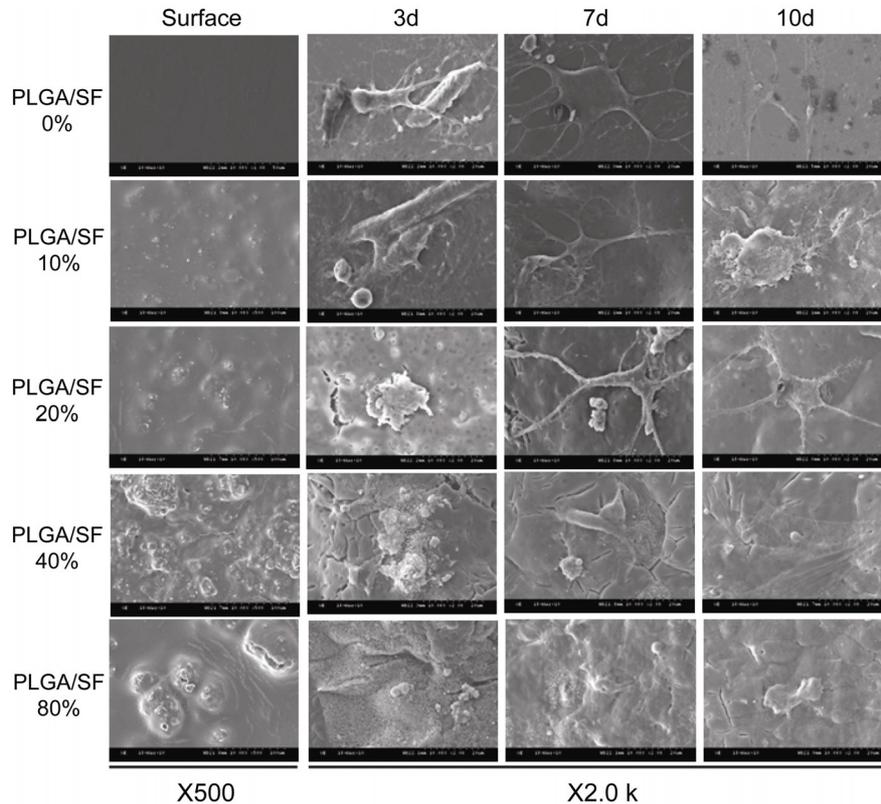


Figure 6. SEM microphotographs of SCs attachment pattern and the proliferative responsiveness on PLGA/silk fibroin (0, 10, 20, 40 and 80%) film surfaces for 3, 7, and 10 days, respectively (magnification: x500, x2.0 k).

하게 퍼져있음이 관찰되었다. 그러나 실크피브로인이 10 및 20 wt%가 함유된 필름에 부착된 슈반세포가 7 및 10일째까지도 세포의 운동 및 신장이 일어날 때 작용하는 세포 기관인 필로도피아 및 라멜리 오도피아가 잘 발달되어 신경돌기가 잘 뻗어 나온 것을 확인할 수 있었다. 이는 PLGA 필름에 비해 실크피브로인이 함유된 PLGA 필름에서 시간이 지남에 따라 지속적으로 세포증식에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료되어진다.

PLGA/실크피브로인 하이브리드 필름이 세포의 부착형태에 영향을 끼침을 확인할 수 있었는데 이는 실크피브로인이 세포간의 아교 역할을 하고 세포의 성장 및 증식에 필수적인 콜라겐의 증식을 촉진하여³⁵ 슈반세포에 영향을 준 것으로 사료되며, 기존의 생체재료와 유사한 정도의 세포점착 및 증식능을 SEM을 통해 확인하였다. 이로써 실크피브로인을 10 및 20 wt%를 함유한 PLGA/실크피브로인 하이브리드 필름은 우수한 슈반세포의 점착 및 성장거동을 제공하여 세포의 부착을 유도하고, 세포의 이동 및 활발한 증식과 돌기의 뻗음 등, 본연의 형태를 유지하는데 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료된다. 그러나 40 및 80 wt%로 실크피브로인이 과량 함유시 세포부착에는 도움을 주나 거침도와 같은 표면성질에 의하여 슈반세포의 형태유지에는 알맞은 상호관계를 제공하지 못한 것으로 사료된다. 이것은 세포의 점착과 증식분화를 효과적으로 유도해야 하는 생체재료로서의 조건을 충족시키기에 충분하다고 사료된다.

결론

조직공학적 세포이용에 있어서 세포는 지지체 이식되기 전까지 충분한 양으로 배양되어야 하며 *in vitro*에서 본연의 특성을 유지해야 하므로 세포의 증식, 분화 정도, 형태학적 평가 및 특성유지 평가 실험은 매우 중요하다.

본 연구에서는 생분해성 고분자인 PLGA에 천연유래 섬유단백질인 실크피브로인을 함량별로 첨가한 필름을 제조하여 소수성의 특성을 개선하고 표면에 생활성을 부여하며 슈반세포의 초기 부착 및 표현형 유지에 최적환경을 설정하고자 하였다. 용매증발법으로 제조된 PLGA/실크피브로인 하이브리드 필름은 유리접시의 모양과 크기, 고분자 용액의 농도 및 양을 조절하면 손쉽게 필름의 두께와 모양, 크기를 조절할 수 있다. DSC를 통해 PLGA와 실크피브로인 사이에서는 함량비 변화에 따른 유리전이온도의 이동은 관찰되지 않아 PLGA 필름의 성질에 실크피브로인은 큰 영향을 미치지 않음을 확인하였으며 PLGA/실크피브로인 하이브리드 필름을 *in vivo* 적용시 지지체를 생체 내 이식하더라도 열적으로 안정할 것으로 사료된다.

친수성 평가를 위한 물접촉각 측정을 통해 10 및 20 wt% 실크피브로인 함량이 세포 증식 및 분화 조건을 유지하기 위해 적합하며, 80 wt%와 같은 과량의 실크피브로인 함량은 PLGA의 유연성을 감소시키며 불규칙한 표면 거칠기정도가 세포의 부착 및 증식에 부정적인 영향을 줄 것으로 사료되었다. PLGA/실크피브로인 하이브리드 필름에 신경의 축삭에 여러 영양인자 및 수조를 제공하는 슈반세포를 과

중하여 WST 분석을 실시한 결과, 초기 부착도 및 증식률은 10 wt% 실크피브로인 함량에서 유의성을 가지며 우세한 것을 확인하였고, RT-PCR 분석으로부터 PLGA에 10 및 20 wt%의 실크피브로인을 함유한 필름이 우수한 단백질이 관찰되었다.

세포가 증식하는 동시에 본래의 특성 또한 유지하는지를 알아보고자 실시한 SEM 분석에서도 10 및 20 wt%의 실크피브로인이 함유된 필름에서 슈만세포가 필로도피아 및 라멜리오도피아가 잘 발달된 형태를 보이고 지속적으로 유지되는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 실크피브로인이 10 및 20 wt%가 함유된 PLGA/실크피브로인 하이브리드 필름이 세포에 알맞은 상호관계를 제공하여 긍정적으로 작용하고 더불어 3차원적 PLGA/실크피브로인 하이브리드 지지체의 설계에 있어서 중요한 인자로 작용할 것으로 사료된다.

감사의 글: 본 연구는 세포응용 사업단(SCRC 4110) 및 세계수준의 연구중심 대학(WCU R31-20029)의 연구지원에 의하여 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- N. Zhang, H. Yan, and X. Wen, *Brain Res. Rev.*, **49**, 48 (2005).
- J. Palace, *J. Neurol. Sci.*, **265**, 21 (2008).
- R. Jandial, I. Singec, V. J. Duenas, A. L. Ho, M. L. Levy, and E. Y. Snyder, *Inter. Congress Series*, **1302**, 154 (2007).
- C. D. Mills, A. J. Allchorne, and R. S. Griffin, *Mol. Cell. Neurosci.*, **36**, 185 (2007).
- M. Nissinen, H. Honkanen, O. Lahti, M. Kangas, J. Peltonen, and S. Peltonen, *Mol. Cell. Neurosci.*, **37**, 568 (2008).
- T. Imaizumi, K. L. Lankford, and J. D. Kocsis, *Brain Res.*, **854**, 70 (2000).
- G. H. Doherty, C. Oldreive, and J. Harvey, *Neurosci.*, **154**, 1297 (2008).
- D. P. Yang, D. P. Zhang, and K. S. Mak, *Mol. Cell. Neurosci.*, **38**, 80 (2008).
- L. B. Dahlin, *Current Orthopaedics*, **22**, 9 (2008).
- C. Cheng, C. A. Webber, J. Wang, Y. Xu, J. A. Martinez, W. Q. Liu, D. McDonald, G. F. Guo, M. D. Nguyen, and D. W. Zochodne, *Exp. Neurol.*, **212**, 358 (2008).
- G. Khang, S. K. Kim, and K. D. Hong, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 136 (2004).
- J. Caddick, P. J. Kingham, and N. J. Gardiner, *Glia*, **54**, 840 (2006).
- B. Movaghara, T. Tiraihia, and S. A. Mesbah-Naminb, *Cell Biol. Int.*, **30**, 569 (2006).
- N. Minoura, S. Aiba, M. Higuchi, Y. Gotoh, M. Tsukada, and Y. Imai, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **208**, 511 (1995).
- 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).
- J. Chen, G. H. Altman, V. Karageorgiou, R. Horan, A. Collette, and V. Volloch, *J. Biomed. Mater. Res.*, **67**, 559 (2003).
- H. J. Jin and D. L. Kaplan, *Nature*, **424**, 1057 (2003).
- H. J. Jin, S. V. Fridrikh, and G. C. Rutledge, *Biomacromolecules*, **3**, 1233 (2002).
- L. Meinel, O. Betz, R. Fajardo, S. Hofmann, and A. Nazarian, *Bone*, **39**, 4 (2006).
- L. Uebersaxa, M. Mattottia, and M. Papaloizosz, *Biomaterials*, **28**, 30 (2007).
- M. Garcia-Fuentesa, A. J. Meinela, M. Hilbeb, L. Meinela, and H. P. Merkle, *Biomaterials*, **30**, 28 (2009).
- E. J. Kim, J. H. Song, and M. S. Kim, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 41 (2004).
- G. Khang, E. K. Jeon, and J. M. Rhee, *Macromol. Res.*, **11**, 334 (2003).
- P. J. Kingham, D. F. Kalbermatten, D. Mahay, S. J. Armstrong, M. Wiberg, and G. Terenghi, *Exp. Neurol.*, **207**, 267 (2007).
- J. W. Jang, K. S. Park, and S. H. Kim, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **2**, 34 (2005).
- G. Khang, J. H. Jeon, and J. C. Cho, *Polymer(Korea)*, **23**, 471 (1999).
- G. Khang, M. S. Kim, and S. H. Cho, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 9 (2004).
- S. Sagnella, E. Anderson, N. Sanabria, R. E. Marchant, and K. Marchant, *Tissue Eng.*, **11**, 226 (2005).
- Y. Iwasaki, S. Sawada, N. Nakabayashi, G. Khang, H. B. Lee, and K. Ishihara, *Biomaterials*, **20**, 2185 (1999).
- G. S. Khang, M. S. Kim, B. H. Min, I. W. Lee, J. M. Rlee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **3**, 376 (2006).
- T. K. Morrissey, N. K. Leitman, and R. P. Bunge, *J. Neurosci.*, **11**, 2433 (1991).
- H. Liu, H. Fan, Y. Wang, S. L. Toh, and J. C. Goh, *Biomaterials*, **29**, 662 (2008).
- K. S. Park, S. M. Kim, M. S. Kim, I. W. Lee, J. Lee, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **30**, 445 (2006).
- A. Y. Oh, S. H. Kim, S. J. Lee, J. Yoo, V. D. Mark, J. M. Rlee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **32**, 403 (2008).
- C. Li, C. Vepari, H. Jina, H. J. Kim, and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, **27**, 3115 (2006).