

## Hairless mouse의 피부상처 후 실크단백질 처리가 표피성장인자의 발현에 미치는 영향

한상미\* · 이광길 · 여주홍 · 권해용 · 우순옥 · 백하주<sup>1</sup> · 박관규<sup>2</sup>  
농업과학기술원 농업생물부, <sup>1</sup>경상북도보건환경연구원, <sup>2</sup>대구가톨릭대학교 병리학교실

## The Effects of *Bombyx mori* Silk Protein for the Expression of Epithelial Growth Factor in the Wound Healing Process of the Hairless Mouse

SangMi Han\*, Kwang Gill Lee, Joo-Hong Yeo, HaeYong Kweon, Soon-Ok Woo, HaJu Baek<sup>1</sup> and Kwan-Kyu Park<sup>2</sup>

Dept. of Agricultural Biology, NIAST, RDA, Suwon 441-100, Korea

<sup>1</sup>Dept. of Wastewater Analysis, KyongsangBuk-Do Government Public Institute of Health & Environment, Daegu 702-702, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Pathology, Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu 712-702, Korea

### ABSTRACT

This study was performed to investigate the effect of silk protein (BM-1) treatment on epidermal growth factor (EGF) expression in the wound healing process by excision on the hairless mouse. Significant wound healing activity was observed BM-1 treated group. In BM-1 treated groups (100~116 ug/day), epithelialization of the incision wound was faster with a high rate of wound contraction. In expression of EGF and EGF mRNA, the lesion of BM-1 treated group made EGF to more induce significantly than control lesion. These data suggest that silk protein (BM-1) treatment have wound healing effect by excision on the hairless mouse.

**Key words :** Bombyx. mori, EGF, Hairless mouse, Wound healing

### 서 론

피부 외상이나 화상 후의 정상적인 상처 치유 과정은 지혈단계(hemostasis), 염증단계(inflammatory phase), 증식 단계, 상처 수축(wound contraction)의 단계를 거치는데, 각 단계에서 정상적인 균형이 맞지 않을 경우 상처치유가 늦어지거나, 혹은 상처 치유 후 흉터를 남기게 된다(McCauley *et al.*, 1994; Piscatelli *et al.*, 1994). 창상 치유의 각 과정에는 염증세포, 각질세포, 섬유 아 세포 등에서 분비되는 여러 종류의 성장인자 혹은 사이토카인과 함께 작용하여 창상 치유에 관여한다(Kaufman *et al.*, 1985; Piscatelli *et al.*, 1994). 즉 정상적인 치유과정에서는 상처 부위의 염증세포가 분비하는 매개체들이 신호에 의해서 대식세포들이 상처부위로 모여들고, 사이토카인 등을 분비하면, 상처부위에서 섬유 아세포 등의 이동과 증식이 진행되면서 손상된 상처부위의 진피층이 기질을 형성하면

서 상처부위 치유가 일어나게 된다(Kuroyanagi *et al.*, 1991).

피부의 치유과정을 촉진하는 인자로는 표피성장인자(Epidermal growth factor; EGF), 혈소판 유래 성장인자(Platelet-derived growth factor : PDGF), 형질변환성장인자(Transforming growth factor: TGF- $\beta$ ), 섬유모세포 성장인자(Fibroblast growth factor; FGF), 인슐린 성장인자(Insulin-like growth factor; IGF), 혈관내피 성장인자(Vascular endothelial growth factor: VEGF) 등이 있다(정, 2000).

실크는 피브로인과 세리신으로 구성된 단백질 섬유로서 최근에는 섬유소재 뿐 만 아니라 다양한 용도로 사용하려는 연구가 활발히 진행되고 있으며 특히 사람 피부의 자연보습인자와 유사한 조성을 가지고 있는 세리신은 피부에 대한 보습성, 주름방지 및 tyrosinase 활성 억제효과 등 기능이 뛰어나므로 화장품과 의약품 의류용 소재로의 첨단 신소재용으로 개발과 수요가 날로 증가되고 있는 추세이다(이 등, 2001).

\*Corresponding author. E-mail: sangmih@rda.go.kr

또한 실크 단백질은 분자량 변화에 따른 아미노산 조성 및 구조 변화 등의 이화학적 특성에 차이는 실크 단백질의 생리활성에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 저분자량의 실크 단백질이 항산화, 혈당강하, 알콜대사 등의 생리활성에 뛰어난 효과와 더불어 피부 상처시 콜라겐 생성, 피부세포의 증식과 같은 면역 활성화에도 효과적이라는 연구 보고가 있다(Yeo *et al.*, 2000; 한 등, 2004).

따라서 본 연구에서는 생쥐의 피부에 상처를 유발하여 피부 섬유 아세포의 증식을 활성화 시키는 분자량대의 실크단백질을 처리 한 후 치유 과정에서 표피성장인자의 발현을 관찰함으로써 피부 상처의 회복에 미치는 효과를 검증하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

중앙실험동물(서울)에서 구입한 6주령의 성숙 hairless 마우스(SKH1-hr)를 사용하였고, 동물의 사육은 온도 22 ± 2°C, 상대습도 50 ± 10%, 조명시간은 12시간(오전 8시 점 등-오후 8시 소등)으로 설정된 시설에서 수행하였다. 순화 기간을 거쳐 사료와 시료가 함유된 음수는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 모든 실험동물은 Institute of Laboratory Animal Resources의 'Guide for the care and use of laboratory animal' (1996, USA)에 준하여 취급하였다.

대조군 및 처리군 모두의 등에 0.5 × 1 mm 길이의 절개를 피하층까지 가한 후 봉합하지 않은 상태로 두었다(Fig. 1). 실험동물은 각 군당 1마리씩 나누어 처리구는 음수에 실크단백질을 희석하여 자유롭게 섭취하도록 하였다. 대조군은 외상을 가한 후 그대로 두었다. 동물은 처치 후 3, 5, 7일째에 도살하고 창상부위의 조직을 채취하여 표피성장인자인 EGF 발현에 대한 ELISA와 RT-PCR을 수행하였다.

### 2. 실크단백질 선별 및 투여

연구에 사용한 실크단백질은 가잠(*Bombyx mori*) 고치를 사용하였고, 정련 및 가수분해 및 탈염, 건조의 과정 후 얻어진 실크 단백질을 피부 섬유 아세포주인 CCD-986sk 세포를 대상으로 세포 증식율이 우수하다고 인정된 분자량 500대의 분획물을 사용하였다(한 등, 2004).

처리군은 20 ug/ml 농도로 희석한 음수를 자유롭게 식이 하도록 하여 매일 처리하였다. 정상군과 대조군은 음수만을 제공하였다.

### 3. 육안관찰 및 체중측정

최초 투여일로부터 완료일까지 1일 1회 창상 부위의 크기를 측정하고 일반증상과 함께 체중을 측정하였다.

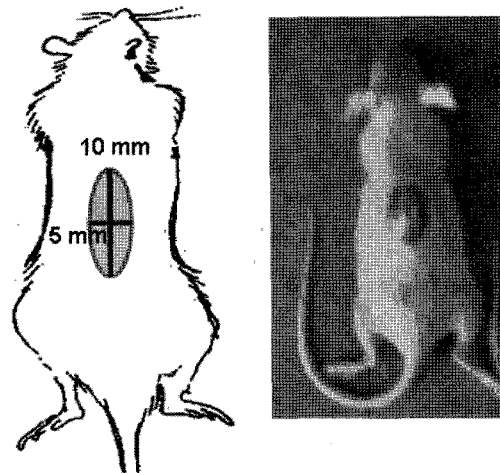


Fig. 1. Skin incision 5 × 10 mm was made on the backs and postoperative wound on back of the hairless mouse.

### 4. 단백질 분리 및 ELISA

적출한 피부조직은 lysis buffer(50 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, 650 mM NaCl, 5% Triton X-100, 200 mM Phenylmethyl-sulfonyl fluoride, 0.02 mM Aprotinin, 2 mM Leupeptin, 5 mM phenanthroline, 28 mM Benzamidine)에 잘라 넣고 homogenizer로 균질화 한후, 13,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 얻은 상층액을 취하였다.

ELISA kit(R&D Systems, UK)를 이용하였다. 분리한 상층액 50 ul를 취하여 일차항체와 이차항체를 순서대로 반응시키고 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine을 첨가하여 발색시킨 다음 ELISA reader로 흡광도를 읽고 EGF 표준용액을 이용한 그래프로부터 시료의 EGF 농도를 환산하였다.

### 6. RNA의 분리 및 역전사-중합효소연쇄반응(RT-PCR)

RNA를 분리하기 위하여 적출한 피부 조직은 액체질소를 사용하여 분쇄한 후 RNAzolB(TEL-TEST, Friendwood, USA)를 사용하여 추출하였다. 분광광도계(Beckman, Peapack, USA)로 RNA의 순도와 정제된 양을 구하였다. 분리한 1 ug의 RNA를 주형으로 1st strand cDNA synthesis Kit (Boehringer Mannheim Co., IN, USA)를 이용하여 oligo dT primed first strand DNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 MgCl<sub>2</sub>의 농도가 1.5 mmol, dNTP 0.5 mmol, 2.5 U/μL의 Taq polymerase와 PCR 완충액에 각기 25 pmol의 iNOS와 house keeping gene인 β-actin primer를 혼합하여 PCR반응기(TaKaRa, Japan)에서 증폭하였다. GAPDH의 primer는 5'-TCACCATCTCTCCAGGAGCG-3', 5'-CTGCTTACCACCTTCTTGA-3', EGF의 primer는 5'-TCTCAACACATGCTACTAGTGGCTGAAATCATG-3', 5'-TCAATATACATGCACACACCATCATGGAGGC-3'를 사용하였

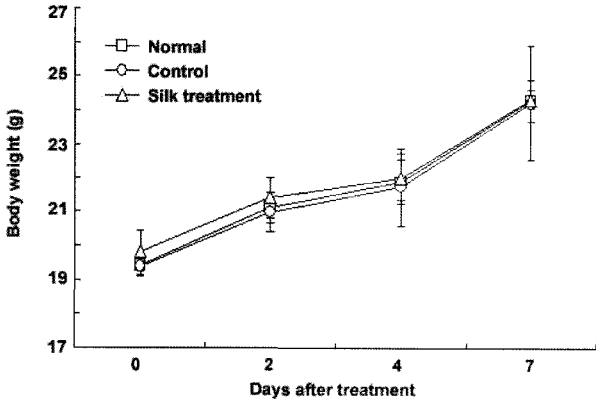


Fig. 2. Body weights in hairless mouse treated with silk proteins (BM-1). Each point represents the mean  $\pm$  S.D; n = 4 in each group.

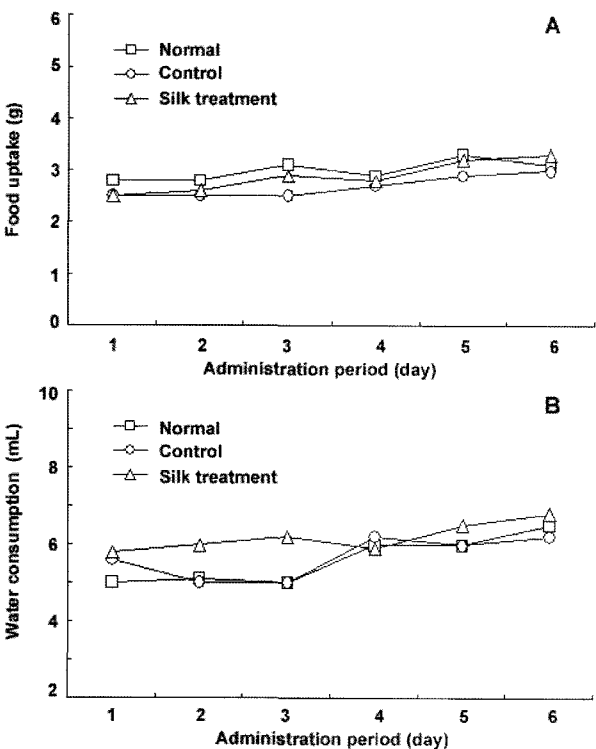


Fig. 3. Daily mean food uptake (A) and water consumption (silk treatment group; adding silk proteins) (B) in hairless mouse treated with silk proteins (BM-1). n = 4 in each group.

Table 1. Effect of topical application of silk proteins on excision wound model

Treatment	Percentage of closure of excision wound area (original wound area 50 mm <sup>2</sup> )		
	Day 3	Day 5	Day 7
Control	22.6 $\pm$ 4.6	53.8 $\pm$ 4.2	68.1 $\pm$ 2.9
BM-1	38.1 $\pm$ 3.7*	65.8 $\pm$ 5.5*	90.0 $\pm$ 4.8*

Values are mean  $\pm$  S.E.; n = 4 in each group. \*p < 0.01 are compared to control.

다. PCR 시간 및 온도는 94°C에서 2분간 변성시킨 후 94°C에서 45초, 58°C에서 45초, 68°C에서 1분간 반응시키는 조건으로 25회 수행하고, 68°C에서 7분간 반응시켰다. 얻어진 증폭산물은 1% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

## 결 과

### 1. 체중변화 및 식이섭취

정상군을 포함한 모든 처리군에서 시험 기간 동안 사망한 동물은 관찰되지 않았으며, 전 동물에서 BM-1 투여로 인한 특이한 임상증상은 관찰되지 않았다. 투여 전 각 동물은 18.6~19.8 g으로 고른 체중범위를 나타내었으며, 시험물질 투여기간 중 정상군을 포함한 처리군 모두가 체중 증가를 나타내어 최종 체중범위는 23.7~24.6 g이었다. 전 시험 기간 중 체중에 대한 통계적으로(p < 0.05) 유의한 구간 변화는 관찰할 수 없었으며(Fig. 2), 시험 전 기간에 걸쳐 사료, 음수 소비량에 있어서도 군별로 차이를 보이지 않았다(Fig. 3).

### 2. 창상치유 효과

상처부위에 대한 창상 치유 속도를 측정된 결과 Table 1과 같다. 실크단백질을 응용하도록 한 처리군에서 대조군 보다 상처 치유가 빨랐음을 관찰할 수 있었으며, 대조군과 BM-1 처리군 사이의 창상 치유 효과에 대하여 통계적으로 유의차가 인정되었다(Table 1). 상처 부위의 재생율은 3일째 대조군은 22.6%, 처리군은 38.1%의 회복율을 보였으며, 7일째에는 각각 68.1%, 90%의 회복율을 보였다(Table 1).

### 3. 표피성장인자 발현

창상 후 각각 실크단백질을 응용하도록 한 후 3일, 5일, 7일째의 처리군과 대조군의 상처 재생 부위의 피부 조직으로부터 단백질을 추출하여 표피성장인자의 발현을 관찰한 결과 대조군에 비하여 BM-1 처리군에서 발현량이 높게 나타났다(Fig. 4). 또한 5일째 피부조직으로부터 RNA를 분리하여 RT-PCR을 이용하여 확인한 EGF mRNA의 발현에서도 대조군에 비하여 BM-1 실크 단백질을 응용한 처리군에서 크게 증가됨을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

## 고 찰

피부 손상을 받았을 경우 치유 과정은 표피화와 수축 및 교원질의 합성, 신생 혈관의 형성 그리고 육아조직의 생성 등에 의한 일련의 복잡한 병리생리학적 과정이다

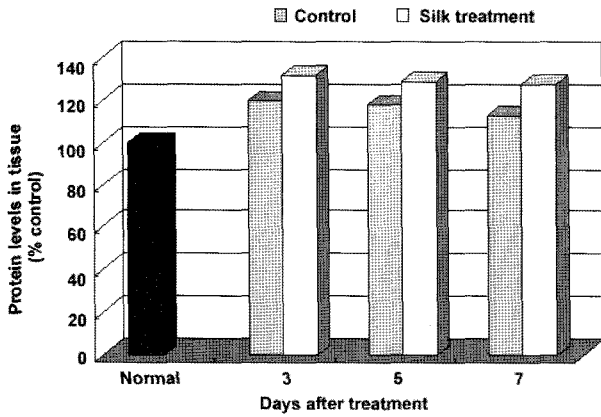


Fig. 4. Effect of silk protein (BM-1) treatment on expression of EGF by excision wound model in hairless mouse. EGF levels in skin tissue were measured by ELISA.

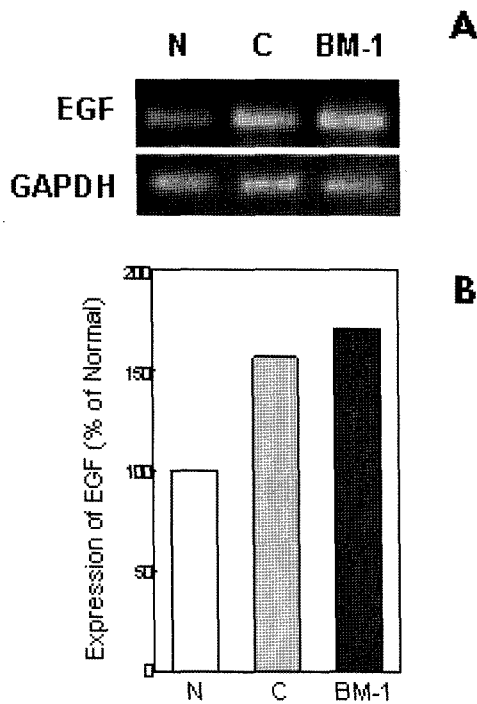


Fig. 5. Effect of silk protein (BM-1) treatment on expression of EGF mRNA by excision wound model in hairless mouse. RT-PCR analysis of EGF and GAPDH mRNA from wounded tissue on day 5 and each lane in (A) corresponds to each in (B). The EGF data were normalized to the GAPDH transcript control. N; normal, C; control, BM-1; BM-1 treatment hairless mouse.

(Clark, 1985). 섬유아세포는 증식과 이동을 하며 창상을 수축시키고, 교원질 등의 세포 기질을 생성한다. 이러한 일련의 과정은 창상 주위에 존재하는 세포에 의해 분비되는 각종 성장인자들에 의해 조절되는데, 이런 성장인자들에는 PDGF, basic fibroblast growth factor(bFGF),

TGF- $\beta$ , EGF 등이 있다(Hatamochi *et al.*, 1994; Eisinger *et al.*, 1998). 특히 피부 전층결손 창상에서는 주로 수축이 중요한 역할을 하고, 피부 부속기관이 남아 있는 부분 결손 창상에서는 표피화가 중요한 역할을 하게 되는데 EGF가 관여하게 된다(Brown, 1986). 1962년 Cohen은 생쥐의 상하악선 추출물을 신생 생쥐에 주사하여 안검의 조기 개방, 절치의 조기 맹출과 같은 신체 발달상의 변화를 관찰하고 53개의 아미노산으로 구성된 폴리펩타이드를 분리하여 표피성장인자라고 명명하였다(Cohen, 1962). EGF는 표피성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor, EGF-R)에 결합하여 수용체의 티로신 키나제(tyrosin kinase)를 활성화시켜 세포의 증식과 분화를 촉진시키는 것으로 알려져 있으며, EGF가 활성화되면 피부세포의 증식 및 이주와 더불어 유사분열이 촉진되어 상처 부위의 치유를 가속화시킨다는 것을 알 수 있다(King, 1985). 많은 연구자들은 피부 창상에 있어서 EGF가 상처 치유에 있어서 중추적인 역할을 함에 착안하여 EGF 발현을 촉진시키거나, EGF를 함유한 치료제를 개발하고자 하였다. 흰쥐의 상처부위에 EGF의 크림형 제재를 국소 도포하여 창상 치유가 촉진되었다는 보고가 있었다(김 등, 1991).

가잠고치로부터 추출한 분자량 500(Mw 500)대의 실크 단백질 분획물, BM-1이 기계적 상처를 준 피부 섬유아세포의 재생과 증식을 촉진하는 것으로 확인되었다(한 등, 2004). 본 연구에서는 섬유아세포의 재생을 촉진하는 BM-1을 hairless mouse에 상처를 준 후 매일 음수에 혼입하여 투여했을 때 상처 치유에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. BM-1을 음수에 녹여 투여하더라도 실험 기간동안 hairless mouse의 체중과 사료 및 음수 섭취량에 있어서는 유의할 만한 변화를 보이지 않았다. 상처 치유 속도에 있어서는 BM-1을 음용한 시험구에서 빠르게 진행되었음을 확인할 수 있었으며, 대조군에 비하여 치유 부위의 조직에서 EGF 단백질 발현과 EGF mRNA 발현이 높게 나타남을 확인하였다. 이러한 결과들로 미루어 피부 상처의 초기 치료에 BM-1 실크단백질은 처리하는 것은 표피성장인자인 EGF의 발현을 촉진시켜 피부 재생을 활발하게 하는 것으로 추정된다.

### 적 요

피부 섬유아세포에 대한 증식을 촉진하는 가잠의 실크 단백질 분획물, BM-1이 상처 치유 과정에 미치는 효과를 검증하기 위하여 hairless mouse의 등쪽에 인위적인 창상을 유발한 후 표피성장인자의 발현 정도를 관찰하였다. 실험은 창상 유발 후 단순 음수만을 실시한 대조군과 매일 BM-1(100~116 ug)을 포함한 음수를 식이하도록 한 처

리군으로 구분하여 7일간 진행하였다.

1) 대조군과 처리군간에 체중 및 사료와 음수 소비량에 유의할 만한 차이는 없었다.

2) 상처 부위의 재생율은 3일째 대조군은 22.6%, 처리군은 38.1%의 회복율을 보였으며, 7일째에는 각각 68.1%, 90%의 회복율을 보여 처리군의 재생 속도가 유의하게 빠름을 알 수 있었다.

3) 대조군에 비하여 처리군의 피부 상처 조직에서의 표피성장인자의 단백질 발현과 mRNA의 발현이 높게 나타나는 양상을 보였다.

따라서, 실크 단백질, BM-1은 피부 창상의 치유 과정에서 표피성장인자를 활성화시킴으로서 상처 치유시간을 단축시키고 치유를 촉진하는 것으로 사료된다.

### 인용문헌

김성우, 홍성표, 이두현 (1991) 표피성장인자 (Epidermal Growth Factor)가 창상 치유에 미치는 효과에 대한 실험적 연구. 대한성형학회지 **18**: 5~12.

이광길, 여주홍, 이용우, 권해용, 김종호 (2001) 세리신 단백질의 생리활성과 피부친화성 탐색. 한국잠사학회지 **45**: 109~115.

정문진 (2000) 상처회복과 세포이동. Trends in Medical Research cell Organization. **7**: 20~26.

한상미, 이광길, 여주홍, 권해용, 우순옥, 백하주, 박관규 (2004) 피부세포 증식에 관여하는 실크단백질 탐색. 한국잠사학회지 **46**: 72~76.

Brown, G. I., L. L. 3rd, Curtsinger, J. R., Brightwell, D. M., Ackerman, G. R., Tobin, H. C. Jr, Polk, C. George-Nascimento, P. Valenzuela and G. S. Schultz (1986) Enhancement of epidermal regeneration by biosynthetic epidermal growth factor. *J. Exp. Med.* **163**: 1319~1324.

Clark, R. A. F. (1985) Cutaneous tissue repair: Basic biologic consideration. *J. Am. Acad. Dermatol.* **13**: 705~725.

Cohen, S. (1962) Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J. Biol. Chem.* **237**: 1555~1562.

Eisinger, M., S. Sadan, I. A. Silver and R. B. Flick (1998) Growth regulation of skin cells by epidermal cell-derived factors: implications for wound healing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**: 1937~1941.

Hatamochi, A., K. Mori and H. Ueki (1994) Role of cytokines in controlling connective tissue gene expression. *Arch. Dermatol. Res.* **287**: 701~730.

Kaufman, T., P. Nathan, M. Levin, P. A. Hebda, E. H. Eichenlaub and B. Korol (1985) Drug-loaded synthetic dressings: effect on contraction, epithelialization, and collagen synthesis of deep second-degree experimental burns, *Ann. Plast. Surg.* **14**: 420~427.

King, L., E. (1985) What does epidermal growth factor do and how does it do it? *J. Invest. Dermatol.* **84**: 165~167.

Kuroyanagi, Y. E. Kim and N. Shioya (1991) Evaluation of a synthetic wound dressing capable of releasing silver sulfadiazine. *J. Burn care. Rehabil.* **12**: 106~115.

McCauley, R., Y. L. V. Chopra, D. Herndon and M. Robbison (1994) Cytoprotection of human dermal fibroblasts against silver sulfadiazine using recombinant growth factor. *J. Surg. Res.* **56**: 378~384.

Piscatelli, S. J., B. M. Michaels, P. Gregory, R. W. Jennings, M. T. Longaker, M. R. Harrison and J. W. Siebert (1994) Fetal fibroblast contraction of collagen matrices *in vitro*; the effects of epidermal growth factor and transforming growth factor- $\beta$ . *Ann. Plast. Surg.* **33**: 38~45.

Yeo, J. H., K. G. Lee, H. S. Lee, Y. W. Lee and S. Y. Kim (2000) Studies on PVA/Chitosan/Fibroin blend sponge sheets: Preparation and wound healing effects in rats, *Int. J. Indust. Entomol.* **1**: 59~64.