Polymer(Korea), Vol. 35, No. 5, pp 378-384, 2011

실크 피브로인/젤라틴 하이브리드 지지체의 제조 및 특성분석

김혜린 · 홍민성 · 김수진 · 조한수 · 유일수 · 이동원† · 강길선†
전북대학교 BIN 융합공학과, 고분자 나노공학과
(2010년 9월 30일 접수, 2011년 3월 1일 수정, 2011년 4월 12일 채택)

Preparation and Characterization of Silk Fibroin/Gelatin Hybrid Scaffolds

Hye Lin Kim, Minsung Hong, Su Jin Kim, Hansu Jo, Il Sou Yoo, Dongwon Lee†, and Gilson Khang†
Department of BIN Fusion Technology, Department of Polymer · Nano Science Technology, Polymer Fusion Research Center, Chonbuk National University, 664-14, Dukjin, Jeonju 561-756, Korea
(Received September 30, 2010; Revised March 1, 2011; Accepted April 12, 2011)

초록: 실크 피브로인은 생체적합성과 비독성 및 비면역 특성을 갖는 생분해성 천연고분자로서, 콜라겐의 가수분해로부터 유래되는 천연물질인 젤라틴을 이용하여 실크 피브로인/젤라틴 지지체를 제조하였다. 지지체의 최적화 조건을 찾기 위하여 실크 피브로인의 양과 젤라틴 및 글루타알데히드의 농도를 다르게 하여 제조하였다. 실크 피브로인/젤라틴 지지체는 SEM과 DSC 및 수분흡수성 평가를 통해 특성분석을 하였으며 세포생존율 및 증식률은 WST 방법을 통해 평가되었다. 이 결과 실크 피브로인 0.3 g 지지체에 8% 젤라틴 및 1% 글루타알데히드를 함유한 지지체에서 세포 부착 및 증식을 위해 가장 적합한 특성을 제공한다고 제안되었다. 결과적으로, 실크 피브로인/젤라틴 지지체는 잠재적인 세포 전달체 및 조직공학을 위한 구조 기반역할을 할 수 있을 것으로 사료된다.

Abstract: Silk fibroin is a biocompatible and slowly biodegradable natural polymer. This natural polymer has excellent mechanical properties, non-toxicity, and non-immunogenic properties and has been demonstrated to support tissue regeneration. Also, gelatin is a natural material derived from collagen by hydrolysis and has an almost identical composition as that of collagen. Silk fibroin/gelatin scaffolds have been fabricated by using the freeze-drying method. To establish the scaffold manufacturing condition for silk fibroin and gelatin, we made scaffolds with various compositions of gelatin, glutaldehyde and silk fibroin. The silk fibroin/gelatin scaffolds were characterized using SEM, DSC, and water absorption ability tests. The cellular proliferation was evaluated by WST assay. These results suggested that a scaffold containing 8% of gelatin, 1% of glutaldehyde and 0.3 g of silk fibroin provided suitable characterstics for cell adhesion and proliferation. In conclusion, the silk fibroin/gelatin scaffold may serve as a potential cell delivery vehicle and a structural basis for tissue engineering.

Keywords: silk fibroin, gelatin, scaffold, tissue engineering.

서 론

생체조직공학이란 생체에서 완전히 흡수되고 세포와 친화력이 있는 고분자 지지체와 세포를 생체조직에 이식함으로써 새로운 실질조직을 복원, 재생, 대체하여 정상적인 기능을 유도하는 일련의 기법이다.[1] 이는 세포배양학, 재료공학, 이식수술 분야의 다학제간 조합이며, 이러한 조직공학기법을 이용하여 원하는 조직을 얻을 수 있고 지지체의 모양에 따라 그 모양을 마음대로 주조할 수가 있다. 조직공학분야에 있어서 세포 및 지지체의 생물학적 신호는 매우 중요한 요소이며[2] 사용되는 생체재료지지체의 역할은 생체 내에서 세포가 잘 정착하여 배양될 수 있도록 도와줄 수 있어야 하고 고유의 표현형을 유지하면서 생체재료 지지체에 골고루 분포되어야 하며 분리된 세포가 생체 내에서 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)을 풍부하게 분비함으로써 분화된 조직의 재생을 촉진시켜야 한다.[3] 또한 체내에 이식된 후에도 주변 조직과 융화가 잘 되고 일정기간이 지나면 안전하게 흡수, 분해하는 생체적합성을 가져야 한다.[4]

효과적인 조직재생을 위한 이상적인 지지체에는 체내하중을 견뎌내야 할 충분한 기계적 강도, 세포들의 접착 및 성장이 가능한 표면 화학적 성질, 기공의 마이크로와 매크로적인 구조, 크기 및 형태 등이 필수조건으로서 요구된다. 특히 세포의 점착과 분화가 원활히 이루어질 수 있는 최대의 공극률과 상호연결성이 우수한 공극구조를 지닌 다공성의 3차원 고분자 지지체의 공극률, 공극의 크기, 공극의 모양 등은 지지체가 갖추어야 할 중요한 매개변수이다. 지지체는 다공성구조 내에 파종된 세포와 조직주변으로부터 이동되는 세포 성장에 중요한 역할을 수

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

행한다. 인체 내 대부분의 세포는 부착세포로서 만일 부착할 곳이 없으면 세포는 성장되지 못하고 사멸한다.[5,6] 이러한 세포의 특성으로 인하여 세포치료에 많은 어려움이 있으며 이를 해결하기 위해 지지체가 도입되어 널리 사용되고 있다.

천연유래 고분자에는 콜라겐, 히알루론산, 키토산, 알긴산, 실크 피브로인 등이 많이 사용되고 있는데[7] 이는 비교적 우수한 생체 적합성, 상대적으로 풍부함, 상업적 유용성, 쉬운 공정 및 식품의약품 안전청에 승인을 비교적 쉽게 얻을 수 있다는 장점을 갖고 있기 때문이다.[8] 이 중에서도 실크는 피브로인과 세리신으로 이루어진 삼각단면을 가진 장섬유로, 글리신, 알라닌, 세린과 같은 작은 분자량을 가진 아미노산이 전체 아미노산의 약 80~85%의 높은 농도로 피브로인을 구성하고 있다. 따라서 실크 피브로인은 폴리펩티드분자들의 배향과 결정이 잘 발달하여, 실크에 우수한 기계적, 물리적, 화학적 특성을 부여한다.[9] 이러한 실크 피브로인은 산소 및 수분 투과성이 뛰어나고 비독성, 비면역성 및 세포 친화성의 특성으로 세포와 조직성장을 지지한다고 보고된 바 있어서 연골 및 인대의 조직공학용 지지체로서 많은 관심을 받고 있다.[10,11]

젤라틴은 동물의 뼈, 연골, 가죽 등 결합조직의 주요 단백질 성분인 콜라겐의 부분적인 가수분해에 의해 얻어지는 유도단백질로,[12] 비교적 낮은 온도와 농도에서도 점성을 부여하며, 냉각될 때 젤라틴 용액은 선명하고 탄력성 있는 열가역적 젤을 형성하기 시작한다.[13] 최근의 많은 연구 결과에 따르면 조직공학용 지지체로서의 젤라틴은 다양한 ECM 고분자 중에서도 세포의 부착, 뻗음 및 증식과 같은 세포와의 상호작용을 유도하는 물질로 평가되고 있다.[14] 또한 생체내부로 들어가는 경우 항원성이 낮고, 생체흡수율이 빠르기 때문에 안정성이 높다. 이렇듯 천연고분자를 사용한 지지체는 생체적합성이 우수한 장점이 있는 반면, 약한 기계적 물성과 수분이나 체액에 의하여 고분자지지체가 쉽게 용해되는 내구성의 문제점을 수반한다. 따라서 대부분의 천연고분자소재를 사용한 지지체는 가교제와 같은 화학적 처리를 통해 지지체의 기계적 물성을 향상시키는 것이 일반적이다.[15,16]

화학적 처리에 이용되는 가교제의 종류로는 3-디메틸아미노프로핀-*N'*-에틸카보다 에미드 하이드로클로라이드(EDC), 글루타알데히드, *β*-글레세롤포스페이트(*β*-GP) 등이 있다. 이 중 글루타알데히드를 사용하여 가교결합시킨 젤라틴 필름의 기계적 특성에 대한 보고에서는[17] 글루타알데히드를 사용하여 고분자 사슬간의 가교결합을 형성시켜 수분과 체액에 의해 지지체가 용해되는 것을 억제하고 기계적 강도가 증가되는 것을 확인하였다.

본 연구에서는 조직공학적 방법으로 조직적합성을 향상시킬 수 있도록 실크 피브로인에 젤라틴과 가교제를 이용하여 물성을 증가시켜서 기계적 물성평가, 물 흡수성 및 안정성, NIH/3T3 세포를 이식하여 WST로 세포독성평가를 하였으며 지지체구조 및 세포 모폴로지는 SEM을 통해 관찰하여 조직공학적 지지체로서의 응용가능성을 확인하였다.

실 험

시약 및 재료. 천연고분자인 실크 생사는 동국대학교 생명과학연구팀에서 제공받았으며, 젤라틴(Gelatin from porcine skin, Sigma-Aldrich Co. USA)은 3차 증류수를 이용하여 40 ℃ 이상에서 녹여 용액으로 만들어서 사용하였다. 글루타알데히드(Grade I, 25%, Sigma-Aldrich Co)는 가교제로 사용되었다. 모든 화학약품과 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다.

실크 피브로인/젤라틴 지지체 제조.

실크 피브로인 추출. 실크 생사를 0.02 M 인산소다로 90 ℃에서 1시간 동안 끓여 세리신을 제거한 후, 0.3% 계면활성제를 사용하고, 계면활성제를 제거하기 위하여 3차 증류수로 여러 번 세척하여 세리신이 제거된 실크 피브로인 섬유만을 추출하였다. 이후 −80 ℃에서 24시간 동안 보관 후 동결건조하였다.

실크 피브로인/젤라틴 지지체. 실크 피브로인/젤라틴 지지체의 제조 모식도를 Figure 1에 나타내었다. 실크 피브로인에 젤라틴 및 가교제의 첨가방법과 각각의 지지체를 냉각시키는 조건을 달리하여 세포가 성장하기 위하여 최적의 환경을 제공할 수 있는 조건을 찾고자 하였다. 실크 피브로인 섬유를 24웰 플레이트에 넣고 실크 피브로인 주변으로 다공성스폰지 형성을 유도하기 위하여 실크 피브로인 섬유에 4% 젤라틴 용액을 함침시킨 지지체, 4% 젤라틴 용액과 가교제인 2.5% 글루타알데히드 혼합수용액을 함침시킨 지지체를 제조하였다. 각 지지체는 4 ℃와 −20 ℃에서 8시간 동안 보관하고 −80 ℃에서 24시간 동안 냉각시키거나 또는 수용액을 지지체에 분주한 뒤 −80 ℃에서 24시간 동안 냉각시키는 조건으로 제조하였다. 이후 4% 젤라틴만 처리한 지지체에는 2.5% 글루타알데히드 용액을 처리하여 가교시켜 주었다. 그후 모든 지지체는 100% 글리신을 사용하여 가교를 억제시켰고, 이를 제거하기 위하여 3차 증류수로 여러 번 세척하였다. 다시 −80 ℃에서 24시간 동안 냉각시킨 후 동결건조하여 실크 피브로인/젤라틴 지지체를 얻었다.

실크 피브로인 함량과 젤라틴 및 글루타알데히드의 농도를 다르게 처리한 지지체도 위와 같은 동결건조법으로 제조되었다. 실크 피브로인 0.1, 0.2 및 0.3 g을 24웰 플레이트에 넣고 젤라틴용액 2, 4 및 8%와 가교제인 글루타알데히드를 0.25, 1 및 2.5%를 혼합한 용액을 함침시킨 후, −80 ℃에서 24시간 동안 보관하여 충분히 수화시킨 후 동결건조시켰다. 그 후 100% 글리신을 사용하여 가교를 억제시켰고, 이를 제거하기 위하여 3차 증류수로 여러 번 세척하였다. 이 지지체는 −80 ℃에서 24시간 동안 냉각시킨 후 동결건조하여 실크 피브로인/젤라틴 지지체를 완성하였다.

지지체의 안정성과 수분흡수도. 제조된 지지체의 수분에 대한 안정성을 조사하기 위하여 실크 피브로인 함량과 젤라틴 및 글루타알데히드 농도가 다른 지지체를 0.5 cm×0.5 cm의 크기로 절단하여 인산염완충용액(PBS, pH 7.4) 및 배양액에 침지하고 3시간 동안 인큐베이션 후 형태를 관찰하였다. 수분흡수도는 시료의 건조된 무게를 측정한

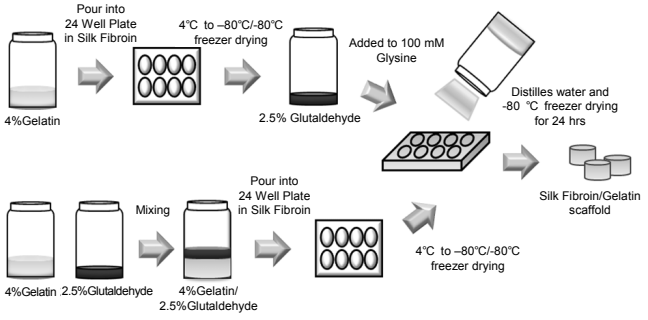

Figure 1. Schematic diagram of the fabricating process of silk fibroin/gelatin scaffold.

후, 24시간 동안 배양액에 침지시킨 뒤 꺼낸 시료의 무게를 측정하여 다음 식에 의하여 계산하였다.

$$\text{Water Uptake}(\%),\ WU=(W_w-W_d)/W_d\times 100$$

이때, W_w는 젖은 지지체의 무게이고, W_d는 건조한 지지체의 무게이다.

지지체 자체의 압축강도 측정분석. 실크 피브로인 함량과 젤라틴 및 가교농도를 달리한 지지체의 강도를 측정하기 위하여 만능물성측정기(TMS-Pro, Food Thechnology Coporation, Sterling, Virginia, USA)를 이용하였다. 만능물성측정기의 설정값으로 측정거리는 2.5%, 측정속도는 1%/min, 측정힘은 0.5 N으로 하였다.

시차주사 열량계 측정. 실크 피브로인 0.3 g 지지체에서 젤라틴 및 가교농도에 따라서 변하는 열분해 거동을 관찰하기 위해 시차주사 열량계(TA Instrument, DSC 2910, USA)를 이용하였다. 시차주사 열량계를 이용하여 −30 ℃에서부터 350 ℃의 범위에서 실크 피브로인/젤라틴 지지체의 열적 성질 변화를 측정하였다. 분석 조건으로 승온 속도는 10 ℃/min로 하였으며 질소기류 하에서 측정하였다.

NIH/3T3 세포의 배양. 쥐 배아 섬유아세포(NIH/3T3 mouse embryo fibroblast, KCLB21658)는 한국세포주은행(Korea Cell Line Bank, Korea)에서 제공받았다. 세포는 RPMI1640에 10% 우태혈청(FBS, Gibco), 1% 항생제(100 units/mL 페니실린과 100 μg/mL 스트렙토마이신)가 함유된 배양액으로 현탁액을 만든 후 세포배양 플라스크에 분주하여 37 ℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 이때 배양액은 3일에 한 번씩 교체해 주었다.

세포 부착 모폴로지(SEM). 실크 피브로인/젤라틴 지지체에서 쥐 배아 섬유아 세포의 부착양상 및 변화된 모폴로지를 확인하고자 주사전자현미경(SEM; S-2250N, Hitachi, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. 실크 피브로인/젤라틴 지지체는 바닥면, 가로축으로 잘라 그 단면을 관찰하였다. 각 샘플들은 카본테이프를 이용하여 금속판에 고정시키고 플라즈마 스퍼터(Model SC 500 K, Emscope, UK)로 200 Å 두께의 백금을 코팅하였다. 각각의 시료를 가속전압 10 kV에서 관찰하였으며, 관찰된 이미지는 이미지 분석프로그램인 P-SEM(Mirero, Korea)를 이용하여 분석하였다.

세포 증식률 측정(WST). 세포증식 능력이나 세포생존 능력을 발색측정으로 정량하기 위해 ELISA 플레이트 리더(E-max, Molecular Device, USA)를 이용하여 WST[2-(4-요오페닐)-3-(4-나이트로페닐)-5-(2,4-다이설포페닐)-2H-테트라졸라움모노 소디움]분석법을[18] 시행하였다. 부착 세포인 NIH/3T3를 트립신을 이용하여 실크/젤라틴 지지체에 수확한 후 세포현탁액을 지지체당 2×10^5 세포/지지체의 농도로 파종하여 상기의 배양액으로 정적배양하였다(각 지지체당 n=4). 1, 2, 3일째에 WST 용액을 10 μL씩 넣고 4시간 동안 37 ℃ 인큐베이터에서 배양하여 96웰 플레이트에 시료를 100 μL씩 분주하여 450 nm의 흡광도로 측정하였다.

통계. 각 실험의 통계학적 분석은 Student's t-test를 시행하여 p 값이 0.05 미만 일 때 통계적으로 유의한 것으로 하였다.[19]

결과 및 토론

실크 피브로인/젤라틴 지지체의 제조 조건 설정. 실크 피브로인 섬유에 4% 젤라틴 용액을 처리하여 냉각시킨 후 가교제인 2.5% 글루타알데히드를 함유한 지지체를 제조한 것과 4% 젤라틴에 가교제인 2.5% 글루타알데히드 가교제의 혼합용액을 함침한 지지체를 제조하였고, 이들을 4 ℃에서 −80 ℃로 24시간 동안 천천히 냉각시키거나 또는 24시간 동안 −80 ℃에서 바로 냉각시키는 조건으로 제조하였다. 각각의 제조방법을 달리한 지지체의 조건 중에서 4% 젤라틴에 가교제인 2.5% 글루타알데히드 혼합지지체를 24시간 동안 −80 ℃에서 냉각시킨 지지체의 외형적 형태가 몰드의 형태와 똑같이 얻어졌으며 수축, 부풀림, 불규칙한 크기 및 여타 결함이 없는 것으로 관찰되었다(Figure 2(A)). 지지체의 내부를 관찰하였을 때 4% 젤라틴과 2.5% 글루타알데히드 가교제를 혼합한 용액을 함침시킨 뒤 냉각시킨 조건을 갖는 지지체 내부의 공극 구조는 규칙적이며 공극과 공극 사이의 연결이 양호하고 대부분이 열린 셀 구조를 하고 있는 것으로 나타났다.[20] 그러나 이 외의 조건을 갖는 지지체는 다공의 형태가 뚜렷하지 못하고 형태가 일그러지며

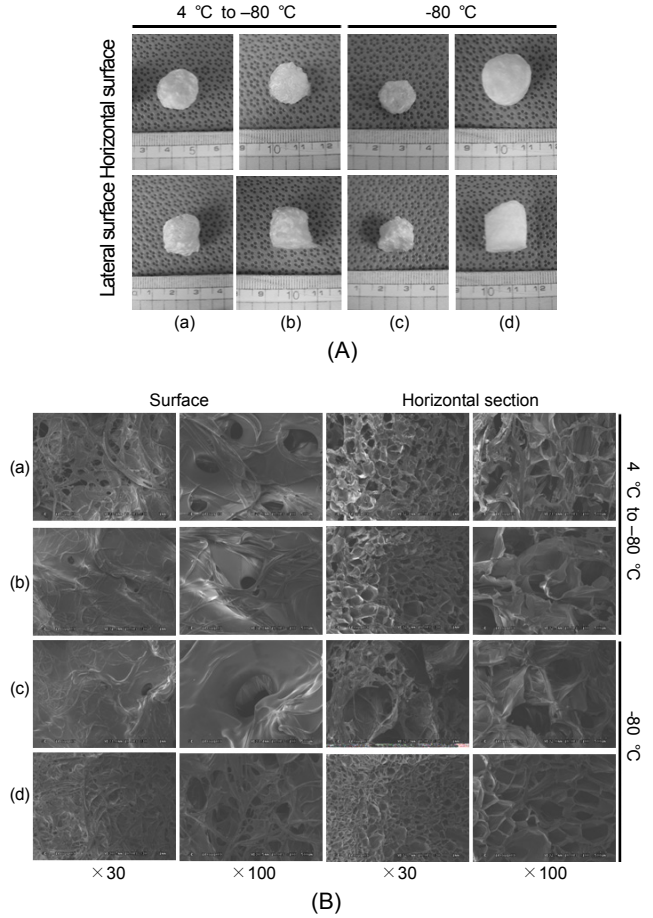

Figure 2. (A) Photographs of 4% gelatin and 2.5% glutaldehyde mixed scaffolds; (a), (c): 2.5% glutaldehyde was added to silk fibroin scaffold after freeze drying with 4% gelatin. (b), (d): silk fibroin scaffold was freeze-dried after adding mixed solution; 4% gelatin and 2.5% glutaldehyde. (B) SEM micrographs of porous silk fibroin/gelatin scaffolds; (a), (c): 2.5% glutaldehyde was added to silk fibroin scaffold after freeze drying with 4% gelatin. (b), (d): silk fibroin scaffold was freeze-dried after adding mixed solution; 4% gelatin and 2.5% glutaldehyde (magnification; x30, x100).

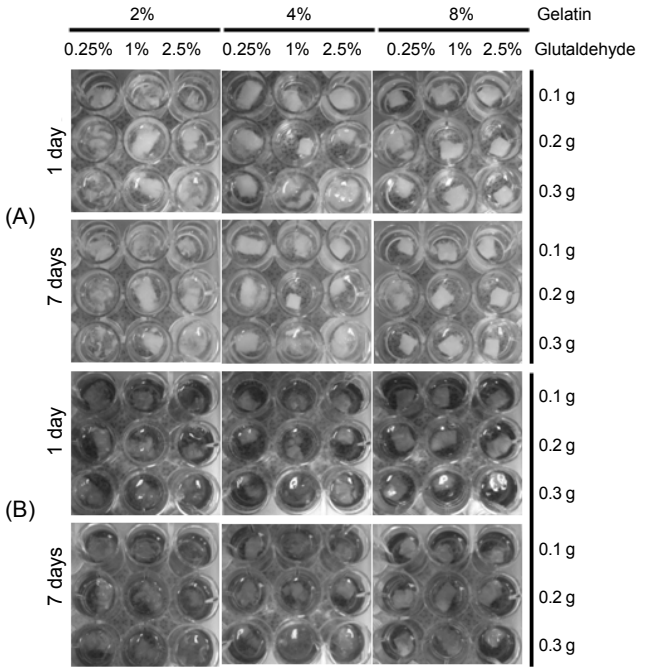

Figure 3. Morphology of silk fibroin/gelatin scaffolds (A) in PBS buffer solution; (B) in culture medium at 37 ℃.

변화된 막힌 다공이 눈에 띄게 형성되었다(Figure 2(B)).

함량을 달리한 실크 피브로인과 젤라틴 및 가교농도에 따른 지지체 제조. 상기의 결과에 따라 −80 ℃에서 냉각시켜서 동결건조 후 얻은 지지체 제조 조건을 바탕으로 실크 피브로인 0.1, 0.2 및 0.3 g에 젤라틴 2, 4 및 8%로 변화를 주고 물성을 개량하기 위하여 글루타알데히드 0.25, 1 및 2.5%의 가교 농도로 처리한 지지체를 육안으로 관찰하였다. 실크 피브로인 함량과 젤라틴 및 가교제의 농도를 달리한 지지체의 외관이 수축되지 않고 몰드의 형태와 같은 크기의 지지체를 제조할 수 있었다.

지지체의 안정성. 지지체의 수분에 대한 안정성을 조사하기 위하여 각각의 지지체를 37 ℃에서 인산염완충용액(PBS, pH 7.4) 및 배양액에 침지하여 1일 및 7일 후의 형태를 관찰하였고 그 결과를 Figure 3에 나타내었다. 실크 피브로인 0.1 g 및 0.2 g 지지체는 인산염완충용액 및 배양액 내에서 고유형태를 유지하지 못하고 풀어짐이 관찰되었다. 반면 실크 피브로인 0.3 g 지지체는 배양액 내에서 풀어지지 않고 약간의 팽창된 형태로 유지하였다. 세포는 지지체의 내부벽면에 부착한 후 증식하여 일정한 형태와 기능을 갖춘 조직으로 형성된다. 따라서 지지체는 조직이 형성되면서 생분해될 수 있어야 하나 세포가 부착하고 증식하는 동안 수분에 의해 급격히 분해되지 않고 형태를 유지하여야 한다.[21] 그러므로 실크 피브로인 0.3 g 지지체는 수분에 의해 급격히 분해되지 않고 세포가 증식하는 동안 안정한 형태를 유지할 수 있을 것으로 사료된다.

수분흡수율 측정. 수분흡수력은 체내에 이식된 지지체가 혈액 속에 포함된 세포를 수용할 수 있는 능력을 결정하는 중요한 요소로[22] 상기의 실험을 바탕으로 지지체의 안정성을 유지하는 실크 피브로인 0.3 g을 사용한 지지체를 이용하여 수분흡수력을 측정하였다. 본 연구에서 제조된 실크 피브로인/젤라틴 지지체의 수분흡수도를 나타내었으며(Figure

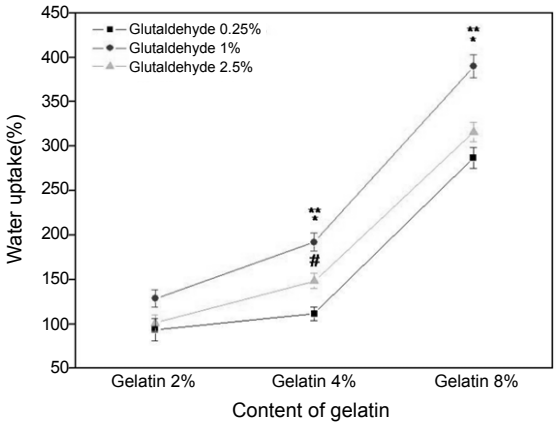

Figure 4. Water−uptake experiments using silk fibroin of 0.3 g scaffold depending on the gelatin and glutaldehyde concentrations. *, **, # denotes significant difference compared with each scaffolds. (p<0.05) (*: glutaldehyde 0.25% vs glutaldehyde 1%, **: glutaldehyde 1% vs glutaldehyde 2.5 and #: glutaldehyde 0.25% vs glutaldehyde 2.5%).

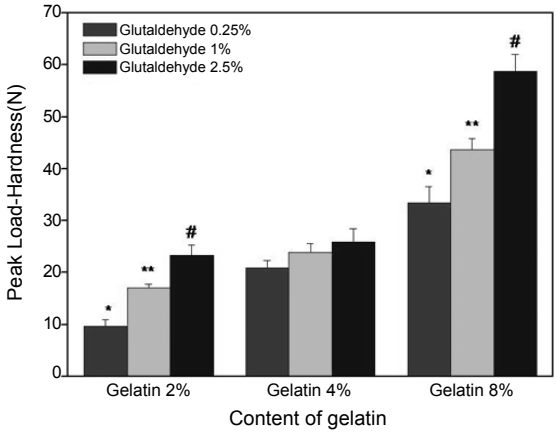

Figure 5. Compressive stress of various scaffolds. *,**,# denotes significant difference compared with each scaffolds (p<0.05) (*: glutaldehyde 0.25% vs glutaldehyde 1%, **: glutaldehyde 1% vs glutaldehyde 2.5% and #: glutaldehyde 0.25% vs glutaldehyde 2.5%).

4) 수분흡수도가 높은 실크피브로인에 젤라틴 농도가 증가함에 따라 더 높은 수분흡수율을 보였다. 젤라틴은 팽화력이 커서 물을 5~10배 흡수하게 되기 때문에 젤라틴의 함유율이 증가할수록 더 높은 수분흡수율을 보인 것으로 사료된다. 또한 지지체 첨가되는 가교제의 종류 및 농도는 수분흡수율에 미치는 요인으로 작용하는데 실크 피브로인/젤라틴 지지체에서 사용한 가교제인 글루타알데히드의 농도를 1%로 함유할 때 가장 높은 수분흡수율을 보였다. 이러한 결과로부터 실크 피브로인/젤라틴 지지체에 세포를 파종하였을 때 세포의 부착도 등 세포와의 상호작용을 증가시켜 유리한 환경을 제공할 것을 예상할 수 있었다.

지지체 자체의 압축강도 측정. 조직공학적 응용가능한 지지체로서 사용되기 위해서는 배양시 또는 이식시에 지속적이며 기계적 물리적 특성을 가진 지지체이어야 한다. 그러한 의미에서 기계적 강도 측정실험은 매우 중요한 의미를 갖는다. 제조한 지지체의 고유의 압축강도를 측정한 결과는 Figure 5에 나타냈으며 젤라틴 및 가교농도가 높아짐에 따라

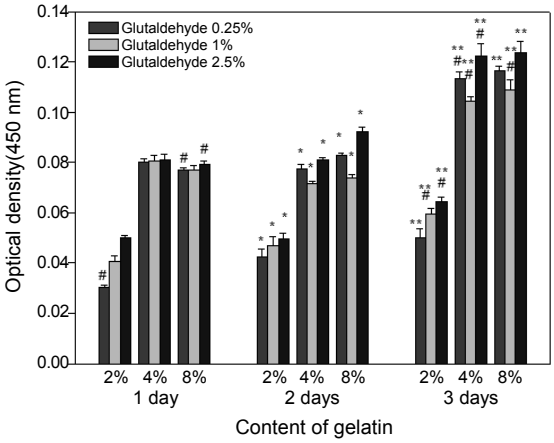

Figure 6. Cell proliferation of NIH/3T3 in silk fibroin/gelatin scaffolds analyzed by WST assay after 1, 2 and 3 days(p<0.05 asterisk means different between *: 1 vs 2 day **: 2 vs 3 days #: 1 vs 3 days).

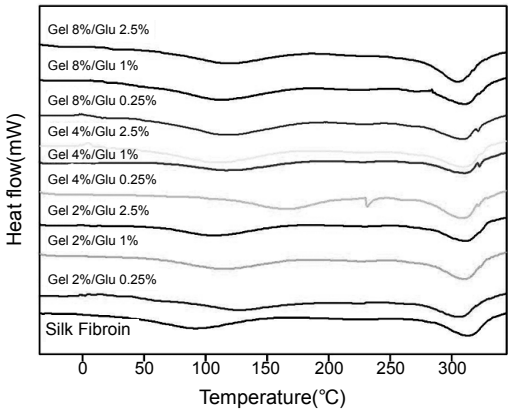

Figure 7. DSC thermograms of silk fibroin/gelatin scaffolds.

높은 압축강도를 나타내었으며 젤라틴 2%에 비해 8%에서 전체적으로 약 2~3배 정도 높게 나타나고 가교제인 글루타알데히드 농도가 높아질수록 높게 나타났다. 가교제의 첨가량이 증가할수록 전반적으로 기계적 강도가 증가함을 볼 수 있는데 이는 3차원 공극구조의 형성시 가교제의 투입량에 따라 공극구조를 더욱 치밀하게 만들기 때문이라 사료된다.

WST. 세포 친화성을 갖는 실크 피브로인 0.3 g에 젤라틴 및 가교농도를 달리한 지지체 내에 쥐 배아 섬유아세포를 파종하여 배양한 후 WST 분석법을 통하여 세포성장률을 관찰한 결과를 Figure 6에 나타내었다. 1, 2 및 3 일째에 분석한 결과, 시간의 경과에 따라서 젤라틴의 농도가 높아질수록 세포증식률이 높아졌으며 특히 젤라틴 8%를 함유한 지지체에서는 다른 실험군에 비해 월등히 높은 세포증식률을 보였다. 이는 젤라틴이 친수성을 증대시켜 물 흡수성이 향상된 것으로 보이며 실제 세포를 파종하였을 때에 증식률이 향상된 것으로 사료된다. 또한 2, 4 및 8%의 젤라틴에 1%의 글루타알데히드를 함유한 모든 지지체에서 시간의 경과에 따라 유의성 있는 증식률을 보였다. 이를 통해 세포의 증식에 있어서 8%의 젤라틴 및 1%의 글루타알데히드를 함유한 실크피브로인/젤라틴 지지체가 가장 긍정적인 영향을 줄 것으로 생각된다.

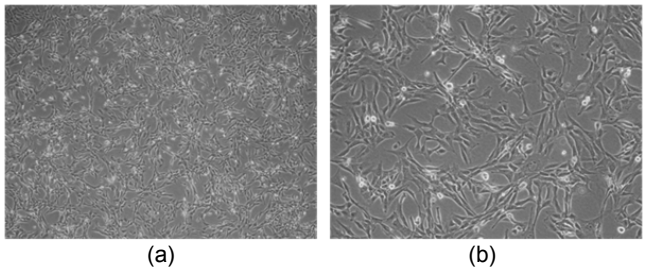

Figure 8. Photographs of cell morphology: (a) NIH/3T3(magnification; x40); (b) NIH/3T3(magnification; ×100).

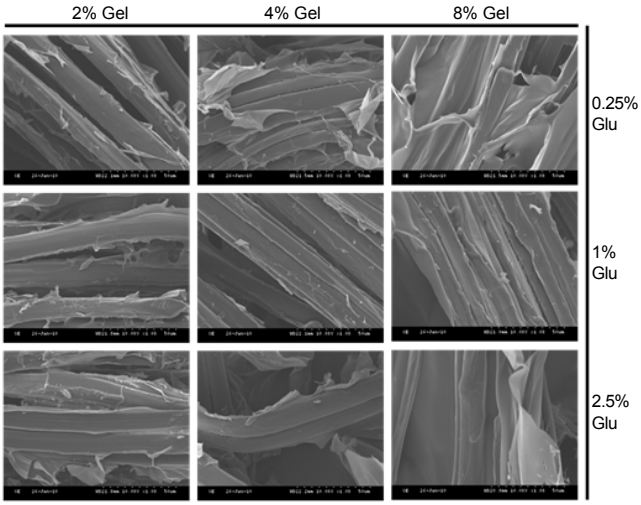

Figure 9. SEM micrographs of sericin-free silk fibers. Silk fibers modified with silk fibroin/gelatin scaffold(magnification; x1.0k).

DSC. 실크 피브로인 0.3 g에 젤라틴 및 글루타알데히드 농도를 달리한 지지체의 열 특성을 살펴보기 위하여 시차열분석을 수행하고 그 결과를 Figure 7에 나타내었다. 실크는 분자가 수소결합에 의해 결합된 배향을 가진 폴리펩티드 사슬로 구성되어 있고 폴리펩티드 사슬이 완전히 늘어난 상태에서 수소결합이 동일 평면내에 존재하는 β 배향의 파괴에 의해 흡열 피크가 나타난다.[23,24] 일반적으로 배향이 잘 된 경우 실크 피브로인의 열분해 흡열피크는 320 ℃ 이상의 온도에서 나타내는 것으로 알려져 있는데[22] Figure 7에서 순수한 실크 피브로인의 흡열피크가 320 ℃ 이상에서 나타난 것으로 보아 배향이 잘 된 것으로 여겨지며 실크 피브로인 0.3 g 지지체에 농도를 달리한 젤라틴 및 글루타알데히드가 함유된 모든 지지체의 흡열피크 또한 거의 유사하게 나타났다. 실크의 열적거동에서 100 ℃ 부근의 흡열피크는 내부 수분의 증발에 기인하는 것으로 알려져 있고, 그 이상의 온도에서는 4% 젤라틴/0.25% 글루타알데히드 지지체가 시프트된 피크를 보이는데 이러한 피크는 시료의 종류 및 가열 속도에 따라 다소 이동되는 것으로 알려져 있기 때문에[21] 이러한 요인들에 기인하여 이동한 것으로 보여진다. 실크 피브로인 지지체에서 젤라틴 및 글루타알데히드 혼합비의 변화는 본래의 실크 피브로인의 흡열피크와 유사하게 나타나는 것으로 보아 실크 피브로인의 열적 거동에 큰 영향을 끼치지 않기 때문에 실크 피브로인/젤라틴 지지체를 생체 내 이식하더라도 열적으로 안정할 것으로 사료된다.

실크 피브로인/젤라틴 지지체에서 쥐 배아 섬유아세포 부착도. 지

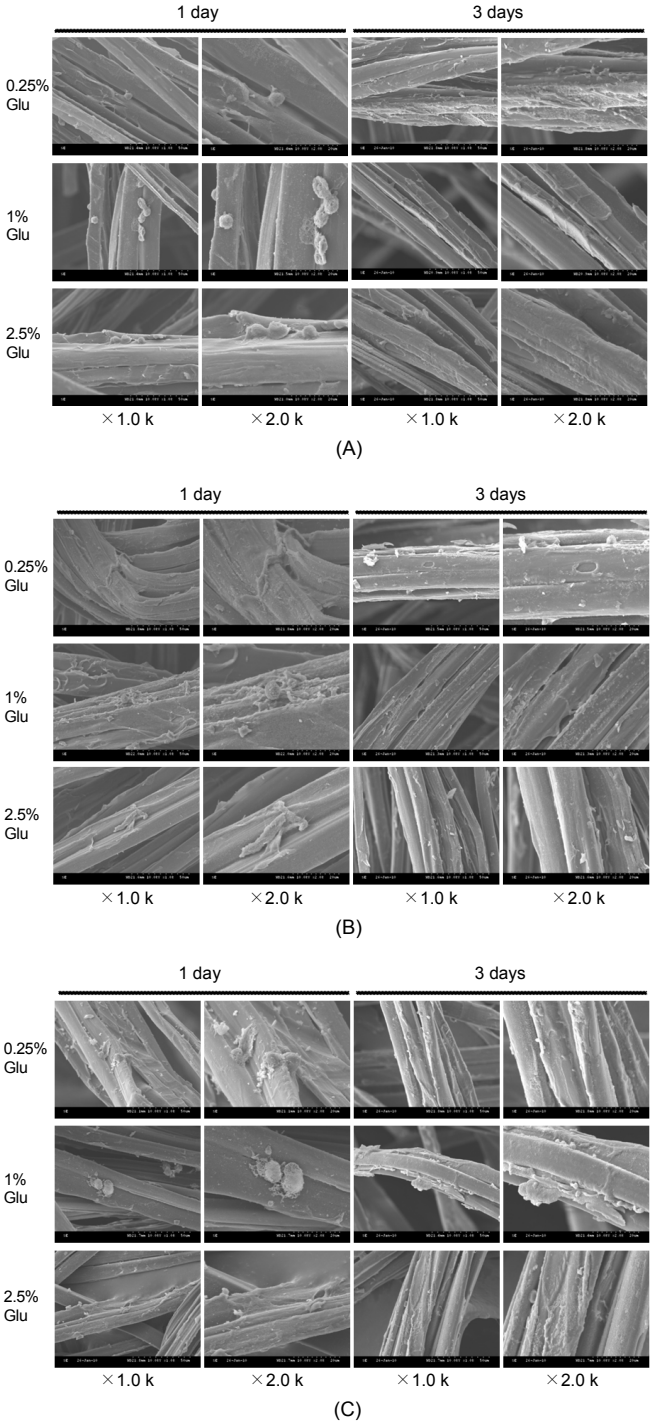

Figure 10. SEM micrographs of NIH/3T3 surfaces of silk fibroin/gelatin of (A) 2%; (B) 4%; (C) 8% scaffolds for 1 and 3 days (magnification; x1.0k , x2.0k).

지체에 형성된 공극은 지지체 내부로 필요한 세포와 영양분을 이동시키는 이동로 역할을 한다. 따라서 지지체 표면에 공극이 없을 경우에는 세포와 영양분의 이동이 용이하지 않아 세포증식이 원활하지 못한 문제점이 야기된다.[19,21] 그러므로 지지체 내부로 세포와 영양분의 이동을 원활하게 해주기 위해서는 지지체 표면에 많은 공극을 형성시켜야 한다. 실크 피브로인에 젤라틴 및 가교농도를 달리한 지지체에서 섬유아세포의 부착 및 증식률을 보기 위하여 SEM 분석을 실시하였다(Figure 8). 실크 피브로인/젤라틴 지지체에 아무것도 파종하지 않았을 때는 Figure 9에서처럼 매끈한 표면을 관찰할 수 있었다. 쥐 배아 섬유아세포를 파종 후 1일째에서 실크 피브로인/젤라틴 지지체에서 둥근형태의 세포만 관찰되었으나 3일째에서는 세포외 기질이 나타나 지지체를 덮고 있는 모습을 보였으며, 젤라틴의 농도가 가장 높은 8%의 젤라틴 및 1%의 글루타알데히드 농도를 함유한 지지체에서 더 많은 세포외 기질이 나타나 지지체를 덮고 있는 모습을 보였다(Figure 10). 이를 통해 실크피브로인/젤라틴 지지체가 세포의 부착 및 증식에 있어서 긍정적인 효과를 주는 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 생체적합성과 세포친화성이 우수한 실크 피브로인에 수분보유력이 뛰어난 젤라틴을 함유시킨 지지체를 제조 후 세포를 파종하여 초기 부착률의 확인과 특성 분석을 하였다. 지지체 제조조건을 최적화시키기 위해 실크 피브로인 섬유에 4% 젤라틴 및 2.5% 가교제를 혼합시켜 만든 지지체를 −80 ℃에서 24시간 냉각시킨 조건에서 몰드 형태와 같은 모양을 하며 여타의 결함이 없는 것을 확인하였고, 지지체 내부에서 열린 공극과 상호연결된 고른 공극구조를 보임을 확인하였다.

상기의 실험을 바탕으로 0.1, 0.2, 0.3 g의 실크 피브로인과 2, 4, 8%의 젤라틴 농도 및 0.25, 1, 2.5%의 글루타알데히드를 이용하여 함량을 달리한 지지체를 제조하였다. SEM을 통하여 제조된 지지체 내부에서 상호 연결된 공극구조를 가짐을 확인하고 세포의 안정적인 부착을 지지함을 확인하였다. 인산염완충액 및 배양액 내에서 지지체의 안정성 평가를 실시한 결과, 실크 피브로인 0.1 g과 0.2 g을 함유하는 지지체는 풀어짐이 관찰되었으나 실크 피브로인 0.3 g을 함유하는 지지체는 약간의 팽창된 형태로 유지되었다. 세포가 부착하고 증식하는 동안 수분에 의해 급격히 분해되지 않고 형태를 유지할 수 있는 실크 피브로인 0.3 g에 젤라틴 및 가교농도를 달리한 지지체를 사용하여 수분흡수율 측정결과에서 젤라틴 농도가 높아질수록 수분흡수율이 뛰어난 것을 보아 수분보유력이 뛰어난 젤라틴의 특성에 영향을 받은 것으로 사료된다.

또한 실크 피브로인/젤라틴 지지체에서 사용한 가교제인 글루타알데히드의 농도를 1% 함유할 때 가장 높은 수분흡수율을 보였다. 이러한 결과는 쥐 배아 섬유아세포를 이용한 WST 분석 결과에서 마찬가지로 실크 피브로인 0.3 g에서 젤라틴 함유율이 높아질수록 세포의 성장에 긍정적인 영향을 미침을 확인하였고 1%의 글루타알데히드를 함유한 모든 실험군에서 유의성 있는 증식률을 나타내어 실크 피브로인/젤라틴 지지체에 세포를 파종하였을 때 세포의 부착도 등 세포와의 상호작용을 증가시켜 유리한 환경을 제공할 것을 예상할 수 있었다. 물을 많이 포함하는 기재는 압력에 대한 저항과 스트레스에 대항하는 보호기능 및 높은 탄성력을 제공하며, 가교농도가 높아질수록 기계적 특성이 향상되는 성질은 압축강도의 결과에서 확인하였다. 또한 DSC 분석을 통해 실크 피브로인 0.3 g 지지체에서 젤라틴 및 글루타알데히드 혼합비의 변화 또는 다른 가교농도 처리 여부에 거의 영향을 받지 않는 것으로 생각되어 *in vivo* 적용시 지지체를 생체 내 이식하더라도 열적으로 안정할 것으로 사료된다.

따라서 이상의 결과로부터 본 연구에서 제조한 실크 피브로인 0.3 g 지지체에 8%의 젤라틴 및 1%의 글루타알데히드를 혼합시킨 지지체에

서 적당한 친수성을 갖고 세포의 부착 및 성장에 도움을 주며 조직공학 지지체로 응용하기에 적절한 조건이 형성될 가능성을 확인하였다.

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

참 고 문 헌

1. S. H. Kim, S. J. Yun, J. W Jang, M. S. Kim, G. Khang, and H. B. Lee, *Polymer(Korea),* **30**, 14 (2006).
2. Y. K. Ko, S. H. Kim, J. S. Jeong, H. J. Ha, S. J. Yoon, J. M. Rhee, M. S. Kim, and H. B. Lee, *Polymer(Korea),* **31**, 14 (2007).
3. G. Khang, S. J. Lee, M. S. Kim, and H. B. Lee, "Tissue Engineering", in *Webster's Biomedical Engineering Handbook*, S. Webster, Editor, John & Wiley Press, NY, p 366 (2006).
4. J. H. Lee, S. J. Park, H. J. Chun, and C. H. Kim, *Inter. J. Tissue Reg.,* **1**, 1, (2010).
5. G. Khang, J. M Rhee, J. H. Lee, I. Lee, and H. B. Lee, *Macromol. Res.*, **8**, 276 (2000).
6. B. L. Seal, T. C. Pterom, and A. Panitch, *Mater. Sci. Eng.*, **34**, 147 (2001).
7. F. T. Moutos, L. E. Freed, and F. Guilak, *Nature Materials,* **6**, 162 (2007).
8. W. H. Wong, D. J. Mooney, and A. Atala, *Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds,* Boston, MA, Birkhauser, Chap 4 (1996).
9. L. Meinel, O. Betz, R. Fajardo, S. Hofmann, A. Nazarian, E. Cory, M. Hilbe, J. M. Cool, R. Langer, G. Vunjak-Novakovic, H. P. Merkle, B. Rechenberg, D. L. Kaplan, and C. Kirker-Head, *Bone*, **39**, 4 (2006).
10. L. Uebersaxa, M. Mattottia, M. Papaloïzosb, H. P. Merkle, B. Gander, and L. Meinel, *Biomaterials*, **28**, 30 (2007).
11. M. Garcia-Fuentesa, A. J. Meinela, M. Hilbeb, L. Meinel, and H. P. Merkle, *Biomaterials*, **30**, 28 (2009).
12. D. Ledward, P. Philips, and P. Williams, "Gelatin", in *Handbook of Hydrocolloid*, Boca Raton, CRC Press, p 67 (2000).
13. V. Normand, S. Muller, J. C. Ravey, and A. Parker, *Macromolecules*, **33**, 1063 (2000).
14. Y. J. Kim, *Polymer(Korea)*, **32**, 5 (2008).
15. L. Zhensheng, H. R. Ramay, K. D. Hauch, D. Xiao, and M. Zhang, *Biomaterials*, **26**, 18 (2005).
16. J. S. Mao, H. F. Liu, Y. J. Yin, and K. D. Yao, *Biomaterials*, **24**, 1621 (2003).
17. A. Bigi, S. Panzavolta, and N. Roveri, *Biomaterials*, **19**, 739 (1998).
18. H. L. Kim, S. J. Kim, H. Yoo, M. Hong, D. Lee, and G. Khang, *Inter. J. Tissue Reg.*, **1**, 81 (2010).
19. H. L. Kim, H. Yoo, H. J. Park, Y. G. Kim, D. Lee, Y. S. Kang, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **35**, 7 (2011).
20. A. Bigi, B. Braccia, G. Cojazzib, S. Panzavolta, and N. Roveri, *Biomaterials,* **19**, 24 (1998).
21. M. S. Choi, H. D. Han, H. Seong, E. S. Park, S. C. Chi, and B. C. Shin, *J. Korean Chem. Soc.*, **50**, 3 (2006).
22. Y. S. Choi, S. B. Lee, S. R. Hong, Y. M. Lee, K. W. Song, and M. H. Park, *J. Mater. Sci.,* **12**, 67 (2001).
23. H. K. Choi and J. H. Hahm, *Korean J. Seric. Sci.*, **37**, 142 (1995).
24. H. Y. Kweon, K. Lee, J. Yeo, S. O. Woo. S. M. Han, Y. W. Lee, J. H. Lee, and Y. H. Park, *Korean J. Seric. Sci.*, **46**, 28 (2004).