

실크/PLGA 필름에서 실크 함량이 망막색소 상피세포의 부착 및 증식 거동에 미치는 영향

조은혜 · 김수진 · 조수진 · 이가영 · 김은유 · 이은용 · 조원형 · 이동원[†] · 강길선[†]

전북대학교 BIN 융합공학과, 고분자·나노공학과, 고분자 융합소재 연구센터
(2010년 9월 29일 접수, 2011년 3월 1일 수정, 2011년 3월 4일 채택)

Effects of Attachment and Proliferation of Retinal Pigment Epithelial Cells on Silk/PLGA Film

Eun Hye Jo, Soo Jin Kim, Su Jin Cho, Ga Young Lee, On You Kim,
Eun Yong Lee, Won Hyung Cho, Dong Won Lee[†], and Gilson Khang[†]

Department of BIN Fusion Tech, Dept of Polymer · Nano Sci & Tech and
Polymer Fusion Research Center, Chonbuk National University, 664-14 Dukjin, Jeonju 561-756, Korea
(Received September 29, 2010; Revised March 1, 2011; Accepted March 4, 2011)

초록: 망막 조직공학을 위한 생체 재료는 기계적 안전성, 생체적합성, 낮은 분해속도 등을 포함하여 *in vivo*에서 잠재적인 유용성을 위한 몇 가지 중요한 특징이 입증되어야 한다. 실크 필름 생체재료는 이러한 기능적인 요구에 맞게 디자인되었다. 0, 10, 20, 40, 및 80 wt%의 실크가 함유된 천연/합성물질과 하이브리드화된 silk/PLGA 필름을 용매 증발법으로 제조하였다. 1, 2, 및 3일 후에 부착된 세포 수를 확인하기 위해 MTT 분석을 하였고 SEM을 통해 필름에 부착된 세포 모폴로지를 확인하였다. 또한, mRNA 발현정도를 알아보기 위해 retinal pigment epithelium (RPE) 세포의 프라이머인 RPE65를 사용하여 RT-PCR을 실시하였고 RPE 세포의 특정 단백질인 cytokeratin의 발현을 확인하고 세포의 증식을 비교하기 위해 면역화학염색을 실시하였다. 본 실험을 통해 실크/PLGA 필름에서 20~40 wt% 실크를 함유한 경우에 RPE 세포의 부착과 증식에 가장 좋은 영향을 미치는 것을 확인하였다.

Abstract: Biomaterials for retinal tissue engineering must demonstrate several critical features for potential utility, including mechanical integrity, biocompatibility, and slow biodegradation. Silk film biomaterials were designed and characterized to meet these functional requirements. We prepared natural/synthetic hybrid silk/PLGA films using 0, 10, 20, 40, and 80 wt% of silk by a solvent evaporation method. MTT assay was used to confirm the number of cells attached on film at 1, 2, and 3 days, respectively. The morphology of cellular adhesion on films was also confirmed by scanning electron microscope (SEM). RT-PCR was conducted to confirm mRNA expression of retinal pigment epithelium (RPE) using RPE65 as a RPEs marker and the expression of cytokeratin were determined by immunofluorescence staining. We confirmed that the silk/PLGA film of 20~40 wt% silk was superior for the adhesion and proliferation of RPEs.

Keywords: silk, PLGA, silk/PLGA film, RPE.

서 론

망막색소상피세포(retinal pigment epithelium, RPE)는 부르크막의 내면에 놓여 있는 육각형의 단세포층으로 주위 조직인 광수용체 및 맥락막 모세혈관층과의 상호작용으로 시기능을 수행하는데 아주 중요한 역할을 한다. 또한 RPE는 생리적으로 광수용체의 영양공급 및 액체 이송, Vitamin A 대사, 물질의 배출 및 세포 탈락물의 탐식, 멜라닌 생성과 재배치 등 시세포의 생존 및 시력 유지에 중요한 역할을 한다.¹⁻³

망막색소변성증(retinitis pigmentosa, RP)과 노인성 황반퇴행(age-related macular degeneration, AMD)을 포함한 망막 변성은 되돌릴

수 없는 시력 장애를 갖게 한다. RP는 단일 유전자 이상에 의한 유전성 질병으로 망막의 시신경 세포 가운데 흑백과 명암을 구별하는 간상세포의 수가 점차 줄어드는 유전성 질병이고 AMD는 주로 노인에게 일어나는 질병으로 신체의 노화에 따라 황반 기능이 저하됨으로써 시력이 떨어지거나 상실되는 질병이다. 이러한 두 질병은 광수용체가 점차적으로 퇴화하여 RPE 세포가 손상되고 결국은 시력을 잃게 된다.⁴⁻⁷

이러한 질병에 의한 시력 손실을 극복하기 위한 방법으로 망막하 공간에 망막색소상피세포 부유액 또는 망막색소상피 미세응집괴를 이식하는 방법과 망막색소상피 이식편을 이식하는 세가지 방법이 있다. 부유액과 망막색소상피 미세응집괴를 이식하는 방법은 주입하는 세포의 손실과 이동을 동반하고 이식 후에 망막하 공간에서 다층의 망막색소상피 형성, 망막하 섬유증을 초래하는 문제점을 가지고 있다.^{5,8}

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

따라서 이식할 때 RPE의 낮은 안정성과 단일상피층의 깨지기 쉬운 단점을 보완하기 위해 재생의학적 RPE 재생용 생분해성 필름을 사용하여 세포의 부착 및 증식을 촉진하는지 확인하였다.

먼저 합성고분자 중에서, PLGA는 α -하이드록시산 계열인 폴리글리콜라이드(PGA)와 폴리락타이드(PLA)의 공중합체로 미국 FDA의 승인을 받은 합성고분자로서 조직공학적 다공성지지체와 약물전달 시스템 등에 이용되는 생체재료로 널리 사용되고 있다. 또한 뛰어난 생체 적합성과 생분해성으로 생체내에서 가수분해에 의해 젖산과 글리콜산으로 전환되며 이산화탄소와 물로 체외 배출되어 생분해성 고분자로 많이 사용되고 있고 단량체량을 조절함으로써 분해기간 또한 조절할 수 있다. 그러나 생체활성물질의 결여와 소수성 성질로 인해 세포 부착 및 주변조직과의 융합에 어려움이 있고 세포의 활성이 낮은 단점이 있다.⁹⁻¹³

PLGA의 단점인 생체 활성을 보완할 수 있는 천연 고분자로 실크 피브로인은 실크 벌레 *Bombyx mori*의 고치로부터 얻은 구조의 단백질로 피브로인과 세리신이라는 두 가지 단백질로 구성되어 있다. 또한 실크 단백질은 인체 피부를 구성하고 있는 주요 단백질인 콜라겐 단백질의 아미노산 조성과 매우 유사하다. 실크 단백질은 *in vivo* 이식에서 피브로인의 면역성 없는 반응, 조절할 수 있는 재료 분해 속도, 조화되고 거친 기계적 물성과 수용성 과정 때문에 조직공학과 재생의학 응용을 위한 생체재료로 많이 사용되고 있다. 또한 생체적합성, 산소 및 수분 투과성, 저염증 반응성 등의 특징을 지니고 있어 최근 많은 연구자들이 실크 피브로인을 인공고막, 치주뼈, 인체용 인공시멘트, 인공뼈 등 생체의 학적 소재로 응용하여 확대하고 있다.¹⁴⁻¹⁸

따라서 본 연구에서는 생체활성이 결여된 PLGA의 단점을 보완하고 새로운 생체활성을 부여하기 위하여 실크 분말을 함유하여 천연/합성 물질과 하이브리드화된 실크/PLGA 필름을 함량별로 제조하였으며 어떤 함량의 필름이 망막손상의 재생에 기초하여 RPE 세포의 안정성과 부착, 그리고 세포의 성장을 가장 잘 유도하고 영향을 미치는지 확인하였다.

실 험

실크 준비. 실크생사는 동국대학교 생명과학연구팀(Dongguk University Molecular Biology Laboratory)에서 제공받았으며, 세리신을 제거하기 위해 5% Na_2CO_3 가 포함된 3차 증류수에서 1시간동안 가열한 뒤 걸러내 물로 행궈주고 CaCl_2 와 에탄올이 포함된 3차 증류수에 넣고 100 °C에서 2시간동안 가열한다. 그 후에 2일동안 투석막에 5번 걸러준 후 -80 °C에서 보관한 실크를 동결건조한 뒤, 믹서기로 분쇄한 SIS를 동결분쇄기(6700, SPEX Inc USA)를 이용하여 대략 180 μm 이하의 고운 분말을 얻었다.

시약 및 재료. 실크/PLGA 필름을 제조하기 위해 PLGA(락타이드/글라이콜라이드 몰비 75:25, Resomer® RG 756, Boehringer Ingelheim Chem, Germany)는 평균 분자량 90000 g/mole인 것을 사용하였다. 용매로는 HPLC 등급의 메틸렌클로라이드(MC, Tedia Co In, Phillipsburg, USA)를 사용하였다.¹⁹

세포 및 배양. 본 실험에서 사용한 세포는 ARPE-19(Cell Line, ATCC® catalog NO. CRL-2302)를 사용하였고, ATCC에서 구매하였다. 세포는 DMEM/F12(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco), 10% 우태아혈청(FBS, Gibco) 및 1% 항생제(100 units/mL

Table 1. Processing Conditions for Fabrication of Silk/PLGA Films

Silk content		Size of silk (μm)	PLGA (g)	MC (mL)
(wt%)	(g)			
0	0	< 180	0.3	6
10	0.03			
20	0.06			
40	0.12			
80	0.24			

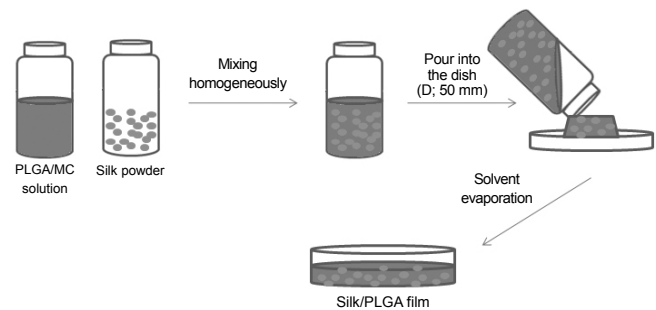


Figure 1. Schematic diagram of the fabrication process of silk/PLGA hybrid films by solvent evaporation method.

페니실린과 100 $\mu\text{g/mL}$ 스트렙토마이신)를 첨가한 배양액을 사용하였고 37 °C, 5% CO_2 조건하에 배양하였다. 배양액은 3일에 한 번씩 교체해 주었다.

실크를 함유한 PLGA 필름 제조. 용매증발법을 이용하여 PLGA 및 실크를 함유한 PLGA 하이브리드 필름을 제조하였다. PLGA 0.3 g을 methylene chloride(MC) 6 mL에 용해시켜 5 w/v%의 PLGA 용액을 준비한 후 PLGA 중량의 0, 20, 40 및 80 wt%에 해당하는 실크를 첨가하여 고루 분산시켰다(Table 1). 또한 상기의 PLGA와 실크의 분산용액(실크/PLGA)을 필름 내에 초음파 분쇄기로 균일하게 분산시킨 후, 직경이 40 mm인 유리접시에 도포하고 잔존 유기용매를 제거하기 위해 실온에서 3~5일 건조시켰다(Figure 1). 그리고 실험에 사용하기 전에 필름을 70% 알코올에 멸균한 뒤 사용하였다.

SEM 관찰. PLGA 및 함량별 실크/PLGA 필름에서 RPE 세포의 부착형태 및 모폴로지를 알아보기 위해 SEM(Model S-2250N, Hitachi Co., Tokyo, Japan) 측정을 실시하였다. 필름에 1×10^5 의 농도로 파종하고 1, 2 및 3일 배양한 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척하였다. 이를 2.5% 글루타르알데하이드로 24시간 고정한 후 알코올 구배용액(50, 60, 70, 80, 90 및 100%)을 이용하여 각 30분씩 탈수과정을 진행하였다. 각 시료를 잘라 샘플폴더에 고정시키고 플라즈마 스퍼터(Emitect K575, UK)를 이용하여 아르곤가스 하에서 약 200 μm 의 두께로 백금코팅을 실시한 후 주사 현미경 Bio-LV SEM(SN-3000 Hitachi, Japan)을 이용하여 PLGA 및 각각 다른 실크 농도를 가진 실크/PLGA 필름에서 시간에 따른 세포의 부착 거동을 관찰하였다.^{20,21}

면역세포화학적 염색. RPE 세포에서 특이적으로 발현되는 단백질을 확인하고 각각의 필름에서 배양한 세포의 증식을 비교하고자 RPE 특정단백질인 cytokeratin을 이용하여 면역세포화학 염색을 수행하였다. 세포는 1×10^5 세포/필름의 농도로 계산하여 파종하였고 필름에 배양한 세포를 1, 2 및 3일째에 PBS로 세척하고 10% 포르말린 용액으로 고정하여 4 °C에서 하루동안 보관하였다. 다음 날 3-amino-9-

ethyl carbazole(AEC) 방법으로 면역세포화학적 염색을 수행하였고 1:800으로 희석한 mouse anti-cytokeratin 항체(Sigma)를 넣고 1시간 방치한 후에, anti-토끼 면역글로블린 항체(Immunotech, France)를 첨가하여 다시 상온에서 30분동안 반응시켰다. 그 후 아비틴-바이오틴-퍼옥시데이즈 복합체(Immunotech)를 첨가하여 다시 30분 방치하고 크로모젠(Immunotech)발색을 확인하였다. 이를 현미경을 통하여 100 배율에서 관찰하였다.^{22,23}

MTT. MTT[3-(4,5-디메틸치아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드, Sigma] 분석을 통하여 1, 2 및 3일째에 세포의 부착도 및 증식률을 확인하였다. 정해진 날짜에 맞추어 기존의 배양액을 제거하고 새로운 배양액 1 mL을 넣어준 후 MTT 용액(50 mg/mL)을 100 μ L씩 첨가하고 4시간동안 인큐베이터에서 배양하였다. 보라색결정이 생성되면 지지체를 시험관에 옮겨 디메틸설폭사이드(DMSO, Sigma) 용액을 1 mL씩 넣어 결정이 완전히 녹을 때까지 초음파세척기로 1시간동안 용해하였다. 용액을 96웰에 100 μ L씩 분주하고 ELISA 플레이트리더(E-Max, Molecular Device, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.²⁴

mRNA 분리 및 RT-PCR. 함량이 다른 실크가 함유된 실크/PLGA 필름에서 RPE 세포의 유전자의 발현 정도를 확인하기 위하여 RT-PCR을 실시하였다. 세포는 1×10^5 세포/필름의 농도로 계산하여 파종하였다. 배양된 세포의 배양액을 제거하고 1 mL의 Trizol(InvitrogenTM)과 0.2 mL의 클로로포름을 처리하여 세포에서 RNA 층을 분리하였고 상층액을 취하여 이소프로판올(Sigma-Aldrich) 0.5 mL 넣고 Polyacryl CarrierTM(Molecules Res)를 5 μ L 넣어 RNA를 침전시킨다. 분리된 RNA를 Oligo(dT)¹²⁻¹⁸ 프라이머(Invitrogen), $5 \times$ first strand buffer(Invitrogen), dNTP(dGTP, dATP, dTTP, dCTP, Gibco), RNase inhibitor(Invitrogen), SuperScript IIRT (Intvirogen), RNase H역전사 트랜스크립타제(Invitrogen), DNase/RNase free water(Gibco)를 첨가하여 Authorized thermal cycler(TP 600, Takara Bio Inc, Japan)를 통하여 cDNA로 역전사하였다. 이렇게 전사시킨 cDNA는 2유닛 Taq DNA 폴리머라제를 포함한 PCR 마스터키트(Roche, Germany)를 이용하여 각 프라이머(β -actin, RPE65)를 신장시켜 원하는 DNA의 특정 영역을 증폭시켰다. PCR 후 증폭된 DNA를 ethidium bromide solution(Sigma)이 포함된 1.2% (w/v) 아가로스겔(Sigma)에 전기영동을 수행한 후 상대적 발현을 시각화하여 300 nm 자외선 투과조사기(Vilber Lourmat ETX-20M, France)로 촬영하여 밴드의 발현정도를 관찰하였다.^{21,25-27} 프라이머는 제노텍(Korea)으로부터 구입하였으며 프라이머의 염기서열은 Table 2에 나타내었다.

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

결과 및 토론

PLGA 및 실크 함량에 따른 실크/PLGA 필름에서 RPE 세포의 특정 단백질 발현확인. RPE 세포에서 발현되는 특정 단백질 발현을 확인하고 각각의 필름에서 배양한 세포의 증식을 비교하기 위해 RPE 세포를 배양한 PLGA 및 실크 함량에 따른 실크/PLGA에 AEC 방법을 통하여 면역세포화학적 염색을 실시하였다. RPE 세포에서만 발현되는 특정 단백질인 cytokeratin을 1차 항체로 사용하여 RPE 세포를 관찰하였고 염색을 통해 나온 사진을 1, 2 및 3일을 관찰하였으며 염색 결과는 Figure 3에 나타내었다. 1일째 관찰하였을 때, PLGA 필름과 함량별 실크/PLGA 필름을 비교한 결과 PLGA 필름과 80 wt% 필름에서는 다른 함량에 비해 발색이 약하게 나타나는 것을 확인할 수 있었고, 10 wt%와 20 wt%에서 발색이 더 진하게 나타났다. 이 두 함량보다 40 wt%에서 가장 발색이 진하게 나타난 것을 확인할 수 있었다. 또한 2일과 3일이 지나면서 세포가 증식하는 것을 발색되는 분포를 통해 육안으로 확인할 수 있었고 발색은 20 wt%와 40 wt%에서 가장 넓게 분포가 되어 있었고 PLGA와 80 wt%보다는 10 wt%에서 분포가 많이 된 것을 확인할 수 있었다. 이는 실크의 영향으로 PLGA 필름에 비해 실크/PLGA 필름에서 더 많은 세포가 부착 및 증식을 하는 것으로 사료된다.

PLGA 및 실크 함량에 따른 실크/PLGA 필름에서 RPE 세포의 초기 부착거동 확인. 실크 함량에 따른 실크/PLGA 필름 표면에서 RPE 세포의 부착도, 세포의 형태 및 증식을 육안으로 관찰하기 위해 SEM 분석을 실시하였고 그 결과를 Figure 4에 나타내었다. 세포를 관찰하기에 앞서 세포가 없을 때의 필름 표면을 관찰하기 위하여 세포를 배양하지 않은 PLGA 필름과 실크/PLGA 필름을 SEM을 통해 관찰하였다(Figure 2). 그 결과 80 wt% 실크/PLGA 필름에서 평평하지 않고 울퉁불퉁한 표면을 관찰할 수 있었는데 상피 세포는 표면이 평평하지 않으면 세포간의 접촉 형성을 막아 광범위한 세포간 접촉의 형성을 막는다.²⁸ 또한, 필름의 단면을 관찰한 결과 PLGA 필름에서는 깨끗한 단면을 관찰할 수 있었고, 10, 20 및 40 wt% 실크/PLGA 필름에서는 실크 입자에 의해 부드러운 단면을 관찰할 수 있었으며 80 wt%에서는 실크 양이 많아서 다공이 많이 생긴 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 세포의 증식에 긍정적인 영향을 미치지 않을 것으로 사료되었고 Figure 3의 결과 또한 80 wt%에서 증식이 다른 군에 비해 좋게 나타나지 않아서 80 wt% 실크/PLGA 필름을 제외한 다른 군에서 세포를 배양하고 관찰하였다. 1일째에 RPE 세포의 필름 부착을 관찰했을 때 PLGA 필름에서는 세포가 안정화가 잘 이루어지지 않아 세포 주위가 깨끗하지 않고 지지분한 모습을 관찰할 수 있었고 40 wt% 실크/PLGA 필름에서 세포는 안정된 모습을 관찰할 수 있었지만 40 wt%보다 10

Table 2. Primers and Protocol for Thermal Cycling

Species	Gene	Primer sequence	Protocol	Cycles	Size(bp)
Rabbit	β -actin	F : 5'-gcc atc ctg cgt ctg egac ctg gct-3' R : 5'-gtg atg acc tgg ccg tca ggc agc-3'	D=94 °C; 30 sec A=59 °C; 1 min E=72 °C; 45 sec	25	227
	RPE65	F : 5'-gcc ctc ctg cac aag ttt gac ttt-3' R : 5'-agt tgg tct ctg tgc aag cgt agt-3'	D=95 °C; 15 sec A=60 °C; 30 sec E=72 °C; 1 min	35	259

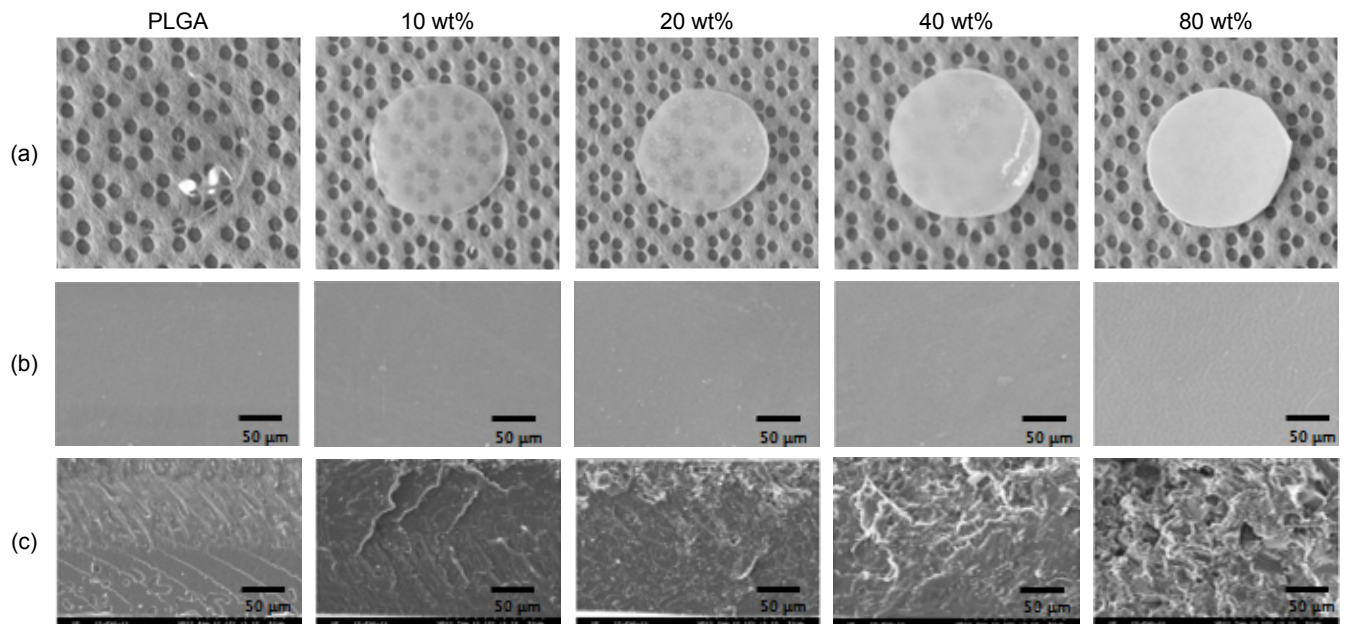


Figure 2. (a) Gross pictures of PLGA and silk/PLGA films: PLGA, silk/PLGA(10 wt%), silk/PLGA(20 wt%), silk/PLGA(40 wt%), and silk/PLGA(80 wt%); (b) surface characterization of PLGA and silk/PLGA films prepared by means of solvent evaporation method; (c) cross section characterization of PLGA and silk/PLGA films prepared by means of solvent evaporation method.

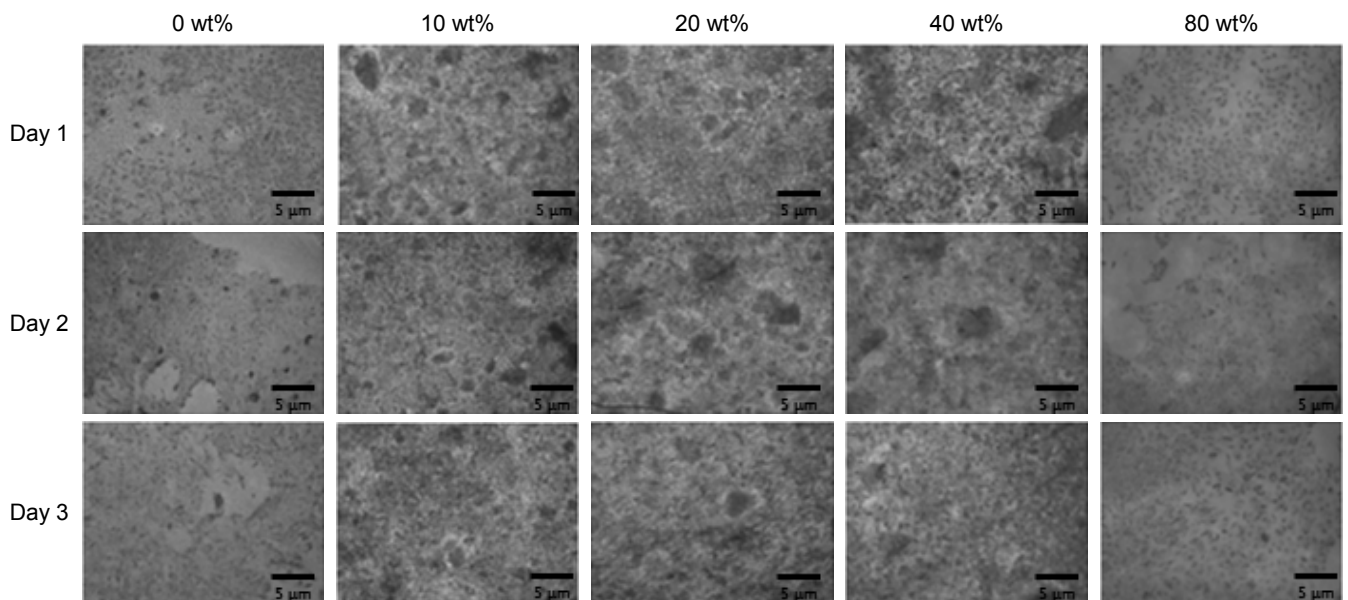


Figure 3. Immunocytochemical staining of RPEs on PLGA, silk/PLGA film after 1, 2, and 3 days (magnification $\times 100$).

wt% 및 20 wt% 실크/PLGA 필름이 더욱 안정되어 바닥에 잘 부착된 세포 형태를 확인할 수 있었다. 또한 PLGA 필름에서는 시간이 3일째가 되어도 세포가 안정되지 않고 증식률도 낮음을 관찰할 수 있었지만 10, 40 wt%, 특히 20 wt%에서 초기 부착뿐만 아니라 시간이 지남에 따라 세포가 안정화된 것은 물론 세포가 잘 증식하는 것도 육안으로 관찰할 수 있었다. 이는 PLGA 필름에서는 소수성 성질에 의해 부착에 도움을 주지 못했지만 실크/PLGA 필름에서는 PLGA의 소수성을 보완하고 세포와 친화력이 있는 재료로 세포의 부착을 돕고 실크에 포함되어 있

는 여러 사이토카인에 의해 세포가 빠르게 안정화된 것으로 사료된다.

PLGA 및 실크 함량에 따른 실크/PLGA 필름에서 RPE 세포의 부착 및 증식 거동 확인. 세포 독성검사인 MTT 분석을 통하여 실크 함량에 따른 실크/PLGA 필름 표면에서 RPE 세포의 부착 및 증식 정도를 확인하기 위해 1, 2, 3일째 관찰하였고 그 결과를 Figure 5에 나타내었다. 분석 결과 PLGA 필름보다 실크/PLGA 필름에서 높은 세포 성장률을 관찰할 수 있었다. 세포의 초기 부착을 확인할 수 있는 1일째 MTT 결과, 20 wt%와 40 wt% 실크/PLGA 필름에서 PLGA 필

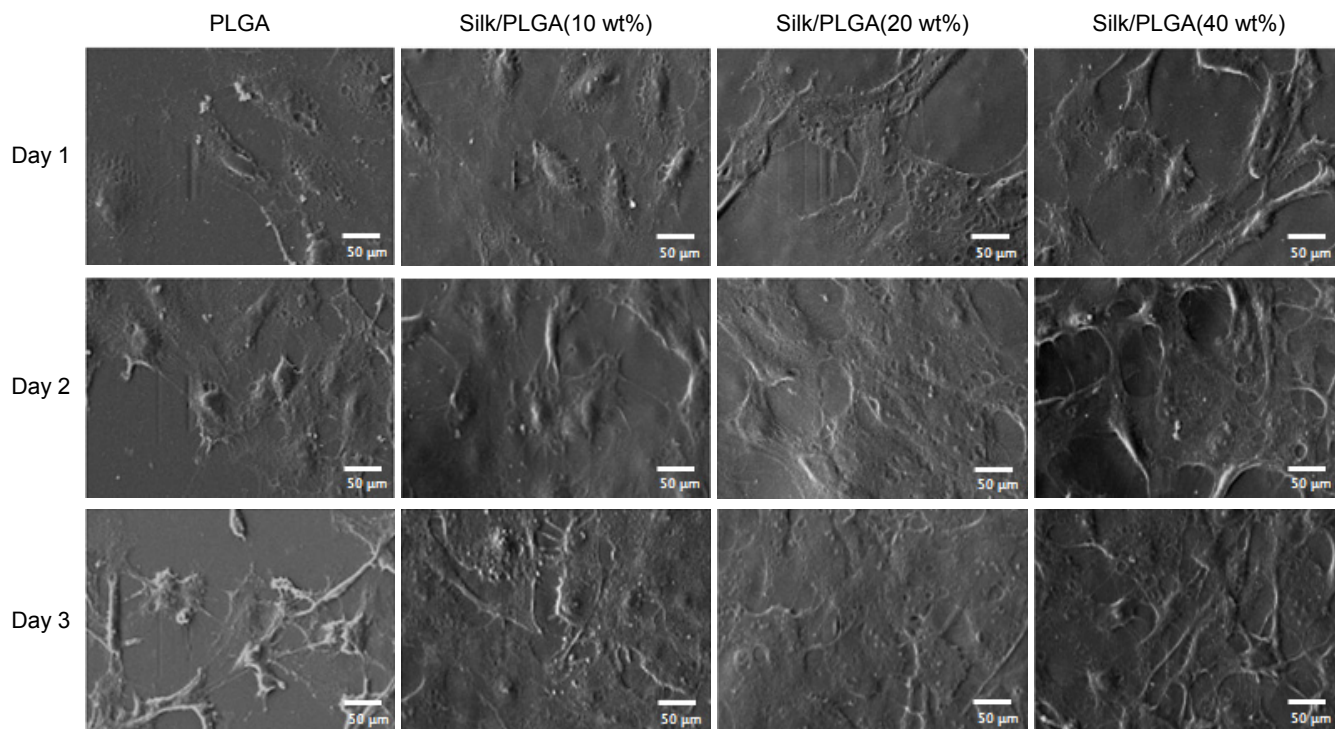


Figure 4. SEM images of RPEs morphologies on PLGA and silk/PLGA film surfaces (magnification $\times 1000$).

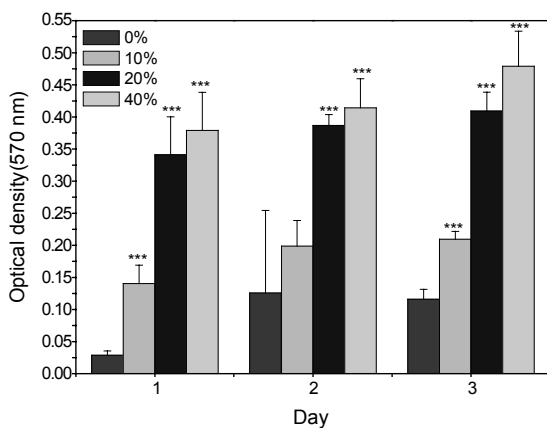


Figure 5. RPEs viability in silk/PLGA film analyzed by MTT assay after 1, 2 and 3 days post-seeding (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

름과 비교했을 때 확연하게 높은 성장을 나타나는 것을 관찰하였다. 또한, 2, 3일째 PLGA 필름에서는 다른 군에 비해 낮은 성장을 나타냈으며 2일째에서는 증식을 하였으나 3일째에서는 다시 감소하여 시간이 지남에 따라서 경향성 있는 모습을 관찰하기 어려웠다. 10, 20, 40 wt% 실크가 함유된 실크/PLGA 필름에서는 세포가 시간이 지남에 따라 증식하는 것을 확인할 수 있었으며 경향성이 있게 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 특히, 20, 40 wt% 실크를 함유한 실크/PLGA 필름에서 가장 높은 증식을 유지하는 것을 관찰할 수 있었다. 이와 같은 결과는 PLGA 필름에서는 소수성 성질에 의하여 세포와 필름 사이에 직접적인 상호작용이 이루어지지 않았지만 실크/PLGA 필름에서는

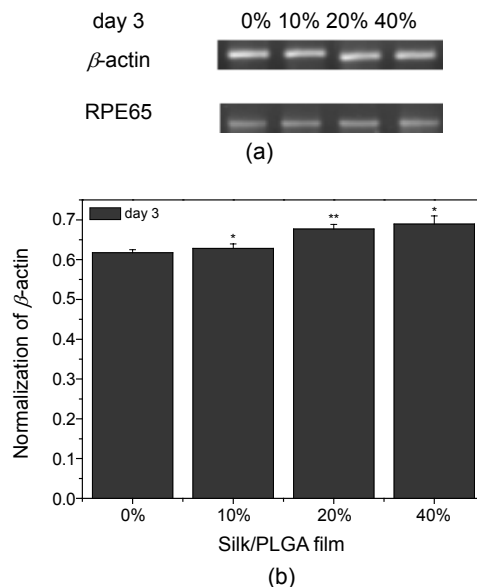


Figure 6. Gene expression profiles of β -actin, RPE65 as analyzed by RT-PCR after 3 days: (a) Result of agarose gel electrophoresis; (b) Normalization of β -actin expression by RPE65 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

PLGA의 소수성을 보완하고 세포와 친화력이 있는 재료로 세포의 부착을 돕고 실크에 포함되어 있는 여러 사이토카인이 세포 활성을 증가시켜 활발한 세포 증식을 유도한 것으로 사료된다.

PLGA 및 실크 함량에 따른 실크/PLGA 필름에서 RPE 세포의 특정 mRNA 발현정도 확인. PLGA 필름과 실크/PLGA 필름에서 배

양한 RPE 세포에서 실크의 함량에 따라 RPE 세포의 특성 및 기능에 어떠한 영향을 주는지 확인하기 위해 RT-PCR을 실시하였다. mRNA 발현정도를 알아보기 위해 RPE 세포의 프라이머인 RPE65를 사용하여 mRNA 발현정도를 house keeping gene인 β -actin으로 표준화시켜 그래프화하였다. Figure 6(a)는 β -actin과 RPE에 특이적으로 존재하는 프라이머인 RPE65의 발현도를 관찰할 수 있는 밴드로 그림에서와 같이 β -actin이 일정하게 발현됨을 확인할 수 있었으며, 모든 군에서 RPE65가 나타난 것을 확인할 수 있었고 발현세기를 정확히 확인하기 위하여 (b)와 같이 그래프로 나타내었다. (b)는 RPE65의 발현여부를 표준화하여 결과를 그래프로 나타내었다. 그래프에서 확인할 수 있듯이, 3 day에서 각각의 mRNA 발현은 함량이 높아질수록 즉, PLGA 필름, 10, 20, 40 wt% 실크/PLGA 필름 순으로 발현이 강하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 특히, PLGA나 10 wt% 실크/PLGA 필름보다 20 wt%와 40 wt% 필름에서 더욱 발현이 강하게 나타난 것을 확인할 수 있었고, 이 결과는 앞에서 기술하고 있는 결과에 부합한다. 이러한 결과에 따라 실크에 포함되어 있는 사이토카인이 RPE 세포의 표현형 유지에 더 좋은 영향을 주는 것으로 사료된다.

결 론

PLGA는 뛰어난 생체적합성, 생분해성이고 단량체량을 조절할 수 있으며 이를 통해 분해 기간 또한 조절할 수 있다는 장점으로 많이 사용되고 있지만 생체활성 물질의 결여와 소수성 성질로 인해 세포 부착 및 주변조직과의 융합에 어려움이 있고 세포의 활성이 낮은 단점을 가지고 있다. 이러한 PLGA의 단점을 보완하고 새로운 생체활성을 부여하기 위하여 천연/합성물질과 하이브리드화된 실크/PLGA 필름을 제조하였다. 실크는 피브로인의 면역성 없는 반응과 재료 분해 속도를 조절할 수 있으며 생체적합성, 산소 및 수분 투과성, 저염증 반응성 등의 특징을 지니고 있어 생체 의학적 소재로 응용하여 확대하고 있다.

따라서 본 연구에서는 실크를 함유한 실크/PLGA 필름이 RPE 세포에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험으로써 합성 생분해성 고분자인 PLGA 필름과 천연 생분해성 고분자인 실크를 10, 20, 40, 80 wt% 함유한 실크/PLGA 필름을 제조한 뒤 필름에 RPE 세포를 파종하였고 SEM, 면역화학적 염색, MTT, RT-PCR을 통해 세포의 성장 및 거동을 관찰하였다. 이러한 실험을 통해 망막 손상의 재생에 기초하여 어떤 함량의 필름이 RPE 세포의 안정성과 부착, 그리고 세포의 성장을 가장 잘 유도하고 영향을 미치는지 관찰하였다.

세포 실험을 하기 전에 먼저 세포를 파종하지 않은 필름을 SEM을 통해 표면을 관찰했을 때, 80 wt% 실크/PLGA 필름에서 평평하지 않은 표면을 관찰할 수 있었는데 상피 세포는 표면이 평평하지 않으면 세포 간의 접촉 형성을 막아 세포의 성장을 저해시킬 수 있다고 알려져 있다. 이를 확인하기 위해 AEC 방법으로 면역세포화학적 염색을 하였고 결과로 80 wt% 실크/PLGA 필름에서는 다른 함량에 비해 발색이 약하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 다음 실험에서는 80 wt% 실크/PLGA 필름은 제외시키고 실험을 진행하였다. 나머지 필름에서는 PLGA 필름에서 발색이 약하게 되는 것을 확인할 수 있었고 20 wt%와 40 wt%에서 가장 진하게 된 것을 확인할 수 있었다. 생체세포는 일반적으로 물질표면에 부착하여 증식하는 것이 많기 때문에 세포와 친화력을 가진 재료가 세포 지지체로 사용될 수 있다. 콜라겐이나 피브로

넥틴(fibronectin) 등은 포유동물의 세포 배양판으로 사용되고 있는 대표적인 천연고분자 물질이다. 이들은 공통적으로 세포인식기능을 가지고 있다고 알려져 있는 Arg-Gly-Asp(RGD) tripeptide를 가지고 있으므로 세포의 부착과 증식을 촉진하는 역할을 한다고 알려져 있다. 이를 통해 실크의 사이토카인 영향으로 실크/PLGA 필름에서 더 많은 세포가 부착과 증식에 도움을 준다는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 세포를 필름에 파종한 후에 SEM을 통해 세포 모폴로지를 관찰했을 때, 20 wt% 실크/PLGA 필름 표면에서 초기 부착은 물론 시간이 지남에 따라 세포가 가장 안정되게 부착한 것을 관찰할 수 있었고 증식 또한 활발하게 일어나는 것으로 보아 실크에 포함되어 있는 사이토카인의 영향으로 초기부착이 빠르게 안정화되고 증식에도 영향을 주는 것을 확인할 수 있었다. MTT 결과에서는 20과 40 wt% 실크/PLGA 필름에서 가장 높은 증식을 유지하는 것을 관찰할 수 있었다. 이를 통해 PLGA의 소수성을 보완하고 세포와 친화력이 있는 재료로 세포의 부착을 돕고 실크에 포함되어 있는 여러 사이토카인이 세포 활성을 증가시켜 활발한 세포 증식을 유도했다는 것을 확인할 수 있었고, RT-PCR 결과에서도 마찬가지로 20 wt%와 40 wt% 실크/PLGA 필름에서 더욱 발현이 강하게 나타난 것을 확인할 수 있었고, 이 결과는 앞에서 기술하고 있는 결과에 부합한다. 결과를 조합해 보았을 때 20 wt%와 40 wt%의 실크/PLGA 필름에서 가장 좋은 결과를 확인할 수 있었다.

결론적으로 실크에 함유되어 있는 여러 사이토카인이 PLGA의 생체활성 결여와 소수성 성질을 보완하고 세포의 부착, 성장 및 분화 등의 기능적인 면에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 판단된다. 본 실험은 실크/PLGA 필름이 망막기능재생을 위한 조직 재생이나 상처치유에 매우 유용하게 작용할 수 있다는 정보를 제공할 것이다.

감사의 글: 본 연구는 세포융용사업단(SC4110), KRF2008-314-D00115와 WCU(R31-20029)의 지원으로 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. S. D. Kim, J. W. Jeong, S. J. Kwon, and W. B. Kim, *J. Korean Ophthalmol. Soc.*, **37**, 1460 (1996).
2. J. H. Lee and J. W. Kim, *J. Korean Ophthalmol. Soc.*, **51**, 276 (2010).
3. L. C. Lu, M. J. Yaszemski, and A. G. Mikos, *Biomaterials*, **22**, 3345 (2001).
4. E. B. Lavik, H. Klassen, K. Warfvinge, R. Langer, and M. Young, *Biomaterials*, **26**, 3187 (2005).
5. A. Kubota, K. Nishida, M. Yamato, J. Yang, A. Kikuchi, T. Okano, and Y. Tano, *Biomaterials*, **27**, 3639 (2006).
6. S. Singh, S. Woerly, and B. J. Mclaughlin, *Biomaterials*, **22**, 3337 (2001).
7. A. L. Yu, R. L. Lorenz, C. Haritoglou, A. Kampik, and U. C. Welge-Lüssen, *Exp. Eye Res.*, **88**, 495 (2009).
8. J. H. Kang and H. W. Kwak, *J. Korean Ophthalmol. Soc.*, **41**, 1843 (2000).
9. C. Kim, S. H. Kim, and Y. S. Song, *et al.*, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **6**, 825 (2009).

10. G. Khang, E. K. Jeon, J. M. Rhee, I. Lee, S. J. Lee, and H. B. Lee, *Macromol. Res.*, **11**, 334 (2003).
11. S. H. Jung, J. W. Jang, S. H. Kim, H. H. Hong, A. Y. Oh, J. M. Rhee, Y. S. Kang, and G. Khang, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **5**, 643 (2008).
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. W. J. Hwang, S. N. Jeong, Y. S. Kim, S. H. Pi, H.-K. You, C.-P. Chung, and H.-S. Shin, *J. Korean Acad. Periodontol.*, **39**, 129 (2009).
15. G. H. Altman, F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R. L. Horan, J. S. Chen, H. Lu, J. Richmond, and D. L. Kaplan, *Bio-materials*, **24**, 401 (2003).
16. Y. Wang, D. D. Rudym, A. Walsh, L. Abrahamsen, H. J. Kim, J. S. Kim, D. L. Kaplan, and CAh Kirker-Head, *Bio-materials*, **29**, 3415 (2008).
17. V. Benfenati, S. Toffanin, R. Capelli, L. M. A. Camassa, S. Ferroni, D. L. Kaplan, F. G. Omenetto, M. Muccini, and R. Zamboni, *Biomaterials*, **31**, 7883 (2010).
18. C. Acharya, S. K. Ghosh, and S. C. Kundu, *Acta Biomater.*, **5**, 429 (2009).
19. J. Y. Lim, S. H. Kim, J. W. So, J. H. Choi, J. M. Rhee, H. S. Shin, and G. Khang, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **5**, 437 (2008).
20. A. Y. Oh, S. H. Kim, and J. H. Moh, *et al.*, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **5**, 235 (2008).
21. S. M. Kim, S. H. Kim, C. M. Kim, A. Y. Oh, I. W. Lee, M. S. Kim, J. M. Rhee, G. Khang, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **4**, 583 (2007).
22. A. Y. Oh, S. H. Kim, S. H. Jung, H. H. Hong, J. M. Rhee, H.-S. Shin, and G. Khang, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **5**, 430 (2008).
23. C. M. Kim, S. M. Kim, S. H. Kim, I. W. Lee, M. S. Kim, J. M. Rhee, G. Khang, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **4**, 60 (2007).
24. M. O. Beak, S. H. Kim, J. W. So, J. Y. Kim, J. H. Choi, J. M. Rhee, H. B. Lee, and G. Khang, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **5**, 229 (2008).
25. J. H. Choi, J. W. Jang, and S. H. Kim, *et al.*, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **5**, 877 (2008).
26. A. Y. Oh, S. H. Kim, S. H. Jung, H. H. Hong, N. R. Jeon, S. J. Lee, M. Van Dyke, J. J. Yoo, J. M. Rhee, and G. Khang, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **5**, 855 (2008).
27. B. S. Choi, S. H. Kim, S. J. Yoon, H. J. Ha, M. S. Kim, Y. I. Yang, Y. S. Son, J. M. Rhee, H. B. Lee, and G. Khang, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **3**, 295 (2006).
28. N. E. Vrana, A. Elsheikh, N. Builles, O. Pamour, and V. Hasirci, *Biomaterials*, **28**, 4303 (2007).