

견 피브로인의 Rat 콜라겐 성장 효과

여주홍 · 이광길 · 이용우
농업과학기술원 잠사곤충부

Collagen Growth Effects in Rats using *B. mori* Fibroin

Joo-Hong Yeo, Kwang-Gill Lee and Yong-Woo Lee

Department of Sericultural and Entomology, NIAST, RDA, Suwon 441-100, Korea

ABSTRACT

The collagen growth effects in rats using *B. mori* fibroin sponge sheet, pure fibroin solution and chitosan sponge sheet were investigated. Histopathological inspection of the wound 12 days later showed the increase of a vascular ingrowth and the absence of inflammatory cells. Wound healing effects were accelerated in the order of Fibroin sponge sheet \geq Fibroin dressing solution $>$ Chitosan sponge sheet $>$ Control. The mean percentage of collagen production in rats after 12 days was $46.12 \pm 4.58\%$ and $42.11 \pm 5.67\%$ in fibroin sponge sheet and dressing solution-treated rats, respectively. These values were higher than the relative content in the chitosan sponge sheet and control groups, which was 23.87 ± 3.24 and $2.42 \pm 0.32\%$, respectively.

Key words : Silk fibroin, Collagen, Chitosan, Wound materials

서 론

지구상에 존재하는 생물은 동·식물 할 것 없이 모두가 세포를 기본단위로 이루어져 있으며, 그중 인간의 몸은 약 60조개의 세포로 이루어져 있다고 알려져 있다. 형태 및 움직임이 각각 다른 이들 세포는 질서 정연한 집합체 형태의 기능 단위를 주축으로 심장, 간장 및 피부 등의 우리 몸을 이루는 기본조직을 재형성하는 기관을 만든다. 다시말하여 우리 인체 조직은 이들 기관이 기능적으로 집합된 것이라 할 수 있는데, 이는 기본적으로 세포가 있기 때문이고 이들 세포간에는 “풀(아교)”의 역할을 하는 물질인 “콜라겐”이라고 하는 성분이 존재하여 세포의 증식과 기능을 조절하여 준다고 알려져 있다. 또한 콜라겐은 인간 몸 전 단백질의 약 1/3을 차지하고 있고 피부, 뼈 및 연골 등 우리 몸을 지탱하는데 있어 없어서는 안될 대단히 중요한 물질로 알려져 있다. 그렇기 때문에 이 결합 조직의 역할 및 기능이 생체 공학에 있어서도 큰 비중을 차지하고 있고 이에 관한 연구가 다양하게 행하여지고 있다(Minoura *et al.*, 1995, Koyama *et al.*, 1998).

이러한 관점에서 본 연구는 견 피브로인 단백질을 이용

한 sponge sheet 제조 및 순수 용액을 이용하여 Rat에의 콜라겐 증식 효과를 보고하고자 한다. 또한 이미 창상 피복 용도로 사용되어지고 있는 Chitosan(Loke *et al.*, 2000) sponge sheet를 제작하여 그 효과를 아울러 비교하였다. 본 연구 결과로부터 실크 피브로인은 막 뿐만 아니라, 순수 용액 또한 Rat 콜라겐을 증식시킨다는 결론을 얻었다.

재료 및 방법

1. 원료

본 연구에 사용한 견사는 가잠(*Bombyx mori*)으로부터 얻어지는 견사를 사용하였다. 정련은 생사를 육비 50:1에서 5 wt%의 마르셀 비누 및 3 wt%의 Na_2CO_3 혼합 용액에 넣어 90°C에서 40분간 2회 처리한 후, 증류수로 3번 정도 같은 작업을 반복하여 충분히 수세하여 사용하였다. 이것을 순수 피브로인 원료로 하였다. Chitosan 분말은 Aldrich che. Co., Ltd(Louis, USA)의 것을 구입하여 사용하였다(N-acetylation degree : 79%).

2. Fibroin 및 Chitosan sponge sheet 제조

위에서 얻어진 순수 견 피브로인의 용해는 Yeo(Yeo *et*

al., 2000)등의 방법에 따라 제조하였다. Chitosan sponge sheet를 제조하기 위하여 4 g의 chitosan 분말을 0.75%(w/w) acetic acid(Guaranteed reagent, Junsei chem. Co. Ltd)에서 60°C로 용해시켜서 필터링을 한 후 0.1 N sodium hydroxide용액을 이용하여 pH 5.0~5.5 범위로 조절하였다. 각각 얻어진 피브로인 및 chitosan 용액은 polystyrene petri dish(직경 14 cm)에 약 35 ml 부어서 자체 제작한 균형대 위에 올린 후 -70°C의 급속 동결 장치에 넣어 동결시켰다. 그 후, 챔버의 온도가 -5°C 내외를 유지하는 감압 건조 장치(삼원 냉열사, Model : Vacuum Freeze Dryer)를 이용하여 sponge형 sheet를 제조하였다. 얻어진 각각의 sponge sheet 형태의 막을 15W ultra-violet lamp 장치에서 20 cm 거리를 두고 5분간 처리하여 분자와 분자 간의 intermolecular cross-linkage이 되도록 유도하였다(Kim et al., 1996). 그 후 ethyleneoxide gas로 2분 정도 멸균 처리를 한 후 동물 임상 실험을 행하였다. 또한 Gel Filtration Chromatography에서 얻어진 농도 2.5% 내외의 순수 건 피브로인 용액 자체를 Dressing 용액으로 동물 실험에 사용하였다.

3. in vivo animal tests

웅성 Sprague-Dawley Rat는 삼육 실험 동물 센터에서 무게가 350±5 g 내외의 것을 구입하여 동물 임상 실험에 사용하였다. 1~2일 정도 안정을 취한 후 자체 제작한 틀에 넣어 움직일 수 없게 한 후, 화상접촉 부위 및 주변의 털을 제거하였다. 미리 준비한 온도 150°C 내외의 전기 화상장치(기본 모델 : Pierce Heating module, USA)에 장착된 자체 제작 기구를 이용하여 처리구 당 각 10마리씩 일률적으로 20초 화상 처리를 하였다. 그 후 화상 부위에 알맞는 sponge sheet를 잘라 환부에 밀착시켰다. 또한 건 피브로인 순수 용액은 아침과 저녁으로 1차례 씩 용액을 환부에 도포 처리하고, 그 후 4일 및 12일 후의 피부 조

직을 절취하여 10% 포르말린 수용액에 환부를 고정하였다. 동물 조직 절편 관찰은 건 피브로인 sponge sheet를 적용한 조직 사진을 대표로 사용하였다.

3. Histologic evaluations

포르말린 수용액에 고정된 환부를 paraffine block에 고정한 후 microtom으로 조직을 절단한 후 절단 조직을 hematoxylin-eosin(H&E) 및 masson's trichrome(M/T)으로 염색을 하였다. 피부 조직에 대한 병리학적 소견 및 콜라겐 생성량은 현미경에 의한 관찰을 하였으며, 단위 면적당 콜라겐 함량의 해석은 CILES software가 부착되어 있는 Image Analyzer(Zeiss IBAS 2.5, Germany)를 사용하여 해석하였다.

결과 및 고찰

1. 피부 조직 형태

건 피브로인 sponge sheet에 의한 Rat 피부 조직의 형태를 관찰하기 위하여 hematoxylin-eosin(M&E) 및 masson's trichrome(M/T)으로 염색한 동물 피부 조직 사진을 대표적으로 Fig. 1에 실었다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 시판 면 거즈로 피복한 12일 후의 대조(A)의 피부 조직의 경우, 피부 조직 내의 염증성 조직 등이 보이고 있으며, 12일 후에도 전체적으로 글곡이 매우 심한 형태를 보이고 있어 조직의 재생이 원활하게 이루어지지 않고 있음을 확인할 수 있었다. 나타내고 있다. 그러나 Fibroin sponge sheet(B)와 Fibroin dressing(C)으로 처리한 경우는 피부 재생 능력이 일수의 경과에 따라 확실히 진전되고 있음을 보이고 있다. 특히 매끄러운 피부 표면과 더불어 조직내의 염증성 조직 등이 현저히 줄어들고 있는 것으로 보아 조직학적 소견에 있어서 정상적인 조직의 생성이 진행되고 있음을 나타내

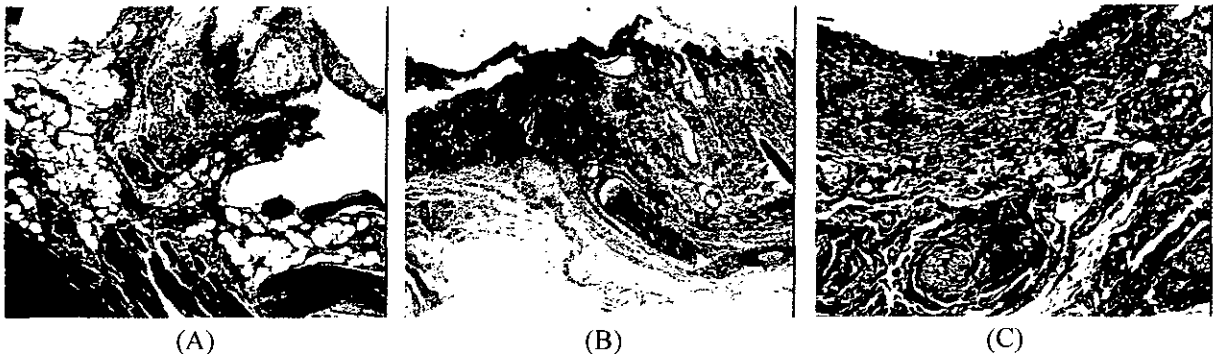


Fig. 1. Histologic appearance in the surface of dermis 12 days after placement. A : Control (non-treated), B and C : fibroin sponge sheet and chitosan sponge sheet treated site.

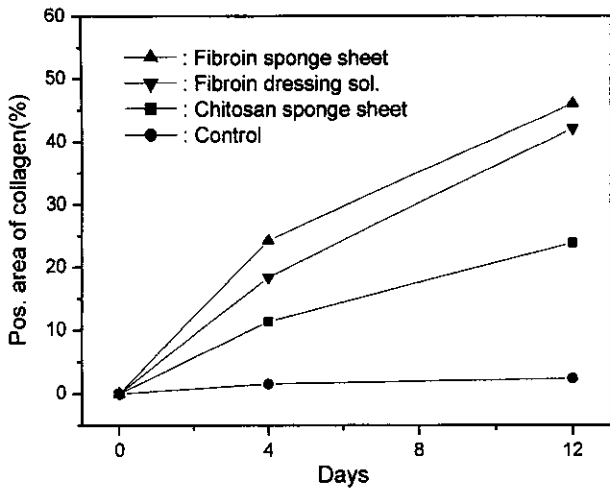


Fig. 2. Quantitation of collagen contents produced in wound area 12 days after dermal graft by using image analysis. Values are the mean \pm S.D. (n=5).

고 있다. 이는 Fig. 2에 나타나 있는 조직 내의 collagen 생성과 밀접한 관계가 있는데, 그 이유는 왕성한 혈류의 촉진으로 인한 세포 조직 내의 피브리노젠 등이 피브로인 성분 내의 세포 접합인자와의 친화력에 의하여 조직 내의 collagen 생성을 촉진시킨 것으로 생각되어진다. 가잠 및 야잠 피브로인의 경우 세포 친화인자가 포함된 관계로 피부 친화성이 매우 좋다고 하는 연구보고(Minoura et al., 1995) 및 최근 일본에서 견 피브로인의 β -sheet domain 구조를 Modeling으로 하여 그 turn부분에 RDG (R:Arginine, D:Glycin, G:Asparatic acid)를 접합시킨 합성 단백질을 다양한 세포 친화 용도로 실용화시킨 예(Sanyo Chem. Co. Ltd, 2000)를 볼 때 Fig. 1의 결과를 더욱 뒷바침하여 준다고 할 수 있다.

2. Rat 콜라겐 증식 효과

Fig. 2는 견 피브로인 sponge sheet, 순수 Dressing용액, Chitosan sponge sheet 등을 Rat에 적용시켰을 경우의 콜라겐 증식 효과를 수치화 한 그림이다.

처리 12일 후 각각의 결과로 미루어 볼 때, 콜라겐 증식 효과는 피부 단위 면적 당 환산할 경우 견 피브로인 sponge sheet \geq 견 피브로인 Dressing 용액 > Chitosan sponge sheet > Control의 순으로 나타났다. 현재 창상 피복 관련 소재로 Chitosan을 이용한 소재가 몇가지 개발이 되어 있으나 본 연구에서는 견 피브로인을 이용한 창상 피복 관련 소재가 더 많이 단위 면적 당 콜라겐을 증식시킬 수 있음을 나타내고 있다. 더우기 본 연구에서는 어떠한 항생제도 포함하지 않음에도 불구하고 12일 후 견 피브로인 sponge sheet의 경우 46% 및 순수 dressing 용

액의 경우 42% 정도의 콜라겐을 증식시킨 것으로 보아 이에 대한 효과를 더욱 확신시켜 주고 있다. 한편, 콜라겐 증식 효과에 있어 대조구로 사용한 시판 거즈의 처리 12일 후의 단위 면적 당 콜라겐 증식량은 2.2%인데 비해 견 피브로인 sponge sheet의 46%는 20배 이상 콜라겐 증식 효과를 나타내었다. 때문에 견 피브로인의 경우 피부 결손 부위 적용 소재(membrane 및 solution 형태) 뿐 아니라 피부 친화성 소재를 개발하는데 있어서 첨가물을 비롯한 다양한 소재 개발로의 응용도 가능할 것으로 생각되어진다. 또한 가잠 피브로인 뿐 아니라 야잠 피브로인을 이용한 생물공학 소재 적용 연구도 충분히 그 가능성을 가지고 있을 것으로 생각되어진다. 아울러 왜 실크 피브로인이 Rat 콜라겐을 증식시키는데에 대하여는 좀더 구체적인 기초 연구가 이루어져야 할 것으로 생각되어진다.

적 요

견 피브로인 sponge sheet, Dressing 용액 및 Chitosan sponge sheet의 Rat 콜라겐 증식 효과를 알아본 결과, 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

1. 견 단백질의 막 및 Dressing 용액의 경우 Rat 조직의 콜라겐 증식을 촉진하는 결과를 얻었다.
2. 본 연구에 사용한 소재 중 Rat 조직의 콜라겐 증식에 있어서 견 피브로인 sponge sheet막이 12일 후 최고 46%, Dressing 용액이 42%, Chitosan sponge sheet가 23.8%의 Rat 콜라겐 증식 효과가 얻어져, 견 피브로인 sponge \geq 견 피브로인 Dressing 용액 > Chitosan sponge sheet > Control의 순으로 콜라겐 증식 효과를 나타내었다.
3. 견 피브로인의 경우 막 뿐만 아니라 용액의 상태도 Rat 콜라겐 증식 효과를 나타내어 창상 피복 용도의 다양한 소재 개발을 할 수 있을 것으로 생각되어진다.

인용문헌

- Kim H.J., Jeong Y. I., Kim S. H., Lee Y. M., and C. S. Cho (1997) Clonazepam Release from Core-shell Type Nanoparticles *In Vitro*, *Arch. Pharm. Res.* **20**(4) : 324-329.
- Kim I. S., S. H. Kim, C. S. Cho (1996) Drug Release from pH-sensitive Interpenetrating Polymer Net-works Hydrogel Based on Poly (ethylene glycol) Macromer and Poly(acrylic acid) Prepared by UV Cured Method, *Arch. Pharm. Res.* **19**(1) : 18-22.
- Koyama T., N. Minoura M. Nagura, K. Kobayashi (1998) Attachment and growth of cultured fibroblast cells on PVA/Chitosan-blended hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res.* **39** : 486-490.
- Minoura N., S. Aiba, Y. Gotoh, M. Tsukada, and Y. Imai (1995)

Attachment and growth of cultured fibroblast cells on silk protein matrices. *J. Biomed. Mater. Res.* **29** : 1215-1221.
Loke W.K., S. K. Lau, L. L. Yong, E. Khor, C. K. Sum, Wound Dressing with Sustained Anti-Microbial Capability. *J. Biomed. Mater. Res.* **53** : 8-17 (2000).
三洋化成工業(株)(2000) SmartPlastic -The Intelligent Choice for

Enhanced Cell Performance.
Yeo, JH, K. W. Lee, H. C. Kim, Y. L. Oh, A. J. Kim and S. Y. Kim (2000) The Effects of PVA/Chitosan/Fibroin (PCF)-Blended Spongy Sheets on Wound Healing in Rats. *Biol. Pharm. Bull.* **23**(10) : 1220-1223.