

피부세포 증식에 관여하는 실크단백질 탐색

한상미* · 이광길 · 여주홍 · 권해용 · 우순옥 · 백하주¹ · 박관규²
농업과학기술원 농업생물부, ¹경상북도보건환경연구원, ²대구가톨릭대학교 병리학교실

Effect of *Bombyx mori*, *Antheraea Yamamai* and *Antheraea pernyi* Silk Protein in Skin Fibroblast Cell Proliferation After Injury

Sang-Mi Han*, Kwang-Gill Lee, Joo-Hong Yeo, Hae-Yong Kweon, Soon-Ok Woo, Yong-Woo Lee, Ha-Ju Baek¹ and Kwan-Kyu Park²

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

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

²Dept. of Pathology, Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu 712-702, Korea

ABSTRACT

We have studied the effect of silk proteins to the cell proliferation of human skin fibroblast cells (CCD-986sk) after injury. Silk proteins were extracted treatment with enzyme or NaOH solution from raw silk and cutted-cocoon shell of *Bombyx mori*, *Antheraea yamamai* and *A. pernyi*. The cell proliferation after *in vitro* injury are increased in treatment by *Bombyx mori* (BM-1, 2), *Antheraea yamami* (AY-1, 2) and *A. pernyi* (AP-1, 2). The silk protein fractions-treated cells exhibited proliferation in a dose dependent between 0.1 µg/ml and 10 µg/ml. But, the macrophage, RAW 264. 7 cell viability was unaffected by the silk protein fractions by MTT assay. The molecular weights of the silk protein fractions were from 300-600 to 900-1500. These results results that the silk protein fractions may function through skin fibroblast proliferation.

Key words : *Bombyx. mori*, *Antheraea yamamai*, *Antheraea pernyi*, skin fibroblast cell

서 론

피부 외상이나 화상 후의 정상적인 상처치유과정은 지혈단계(hemostasis), 염증단계(inflammatory phase), 증식단계, 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 상처부위의 염증세포가 분비하는 매개체들이 신호에 의해서 대식세포들이 상처부위로 모여들고, 사이토카인 등을 분비하면, 상처부위에서 섬유 아세포 등의 이동과 증식이 진행되면서 손

상된 상처부위의 진피층이 기질을 형성하면서 상처부위 치유가 일어나게 된다(Kuroyanagi *et al.*, 1991). 반면, 2차 감염 등으로 염증 세포 등의 이상 증식이 있는 상처에서는 TNF- α , Interlukin-8 등 여러 종류의 염증 유도성 사이토카인 등이 분비되게 되면서, 각질층 형성세포 등의 증식 속도를 감소시키고, 진피 층의 기질형성을 방해 하므로써 손상된 피부의 상처치유 속도를 저하시키게 된다(Shah *et al.* 1992; Shinozaki *et al.*, 1997; Eisinger *et al.*, 1998). 따라서 반흔의 교정은 피부재생과 더불어 매우 중요한 문제이다. 이 반흔의 교정 혹은 크기를 감소시키기 위한 노력은 지속적으로 진행되어 왔으며, 특히 면역학, 결합조직의 생화학, 세포의 성장인자 등에 대한 이해 및 발달과 함께 최근 상당한 연구가 진행되고 있으나, 아직도 피부재생에 있어 반흔을 없앨 방법은 없는 실정이다(Bullard *et al.*, 1997).

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

실크는 피브로인과 세리신으로 구성된 단백질 섬유로서 특유의 부드러움과 독특한 광택으로 심미성이 뛰어나 고급 의료용 소재로서 오랫동안 사용되어 오고 있는 주요 천연자원이다(Kato *et al.*, 1998). 최근에는 섬유소재뿐만 아니라 다양한 용도로 사용하려는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 그 중 실크 분말, 비누, 화장품 등은 이미 상품으로 실용화되어 있다. 특히 사람 피부의 자연보습인자와 유사한 조성을 가지고 있는 세리신은 피부에 대한 보습성, 주름방지 및 tyrosinase 활성 억제효과 등 기능성이 뛰어나므로 화장품과 의약품의 유용 소재로의 첨단 신소재 용으로 개발과 수요가 날로 증가되고 있는 추세이다(이 등, 2001).

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 생성과 같은 면역 활성화에도 효과적이라는 연구 보고가 있다(Yeo *et al.* 2000; 여 등, 2004).

따라서 본 연구에서는 가잠과 천잠, 작잠 실크 단백질로부터 다양한 분자량대의 실크 단백질 분획물을 얻어 피부 섬유 아세포와 염증세포의 증식에 미치는 효과를 통해 피부 재생과 반흔 형성 감소의 약제로의 개발 가능성을 알아보았다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

(1) 원료 및 정련

본 연구에 사용한 원료는 가잠(*Bombyx mori*) 및 천잠(*Antheraea yamamai*) 및 작잠(*Antheraea pernyi*) 고치를 사용하였다. 가잠의 정련은 액비 50 : 1에서 5wt%의 마르셀 비누 및 3wt%의 Na₂CO₃ 혼합 용액에 넣어 90°C에서 40분간 2회 처리한 후, 증류수로 3번 정도 같은 작업을 반복하여 충분히 수세하여 사용하였다. 이 때의 연감율은 24%였으며, 이것을 순수 실크 단백질 원료로 하였다. 또한 천·작잠의 정련은 Alkalase와 비이온계 계면활성제를 이용한 권 등(2003)의 방법에 따라 행하였고, 이때의 연감율은 각각 13% 내외였다.

(2) 원료의 가수분해 및 탈염

위에서 얻어진 순수 실크 단백질의 용해는 여 등(2000)의 방법에 따라 제조하였다. 두 가지 가수분해를 행하였는데, 염산 가수분해와 효소 가수분해를 행하였다. 먼저, 염산(2N Guaranteed reagent, Junsei chem. Co. Ltd) 가수분해의 경우, 액비 1 : 50의 조건하에 210°C 및 110°C에서 12

시간동안 가수분해를 행하였다. 그 후, 중화 과정을 거친 후 Quick Filter (Microcloth Q-Filtration, Calbiochem, USA) 로 1차 및 Sephadex G-10 Gel Filtration Chromatography (Pharmacia, GradiFrac, UV-1 detection, Sweden) 장치를 이용하여 염을 분리하였다. 효소 가수분해의 경우도 여 (Yeo *et al.*, 2000)등의 방법에 의해 제조된 용액을 Sephadex G-25 Gel Filtration Chromatography (Pharmacia, GradiFrac, UV-1 detection, Sweden) 장치를 이용하여 피브로인과 염을 완전히 분리하였다. 그 후, 3%(w/w)의 단백질 분해소를 첨가 및 효소 활성 극대화 처리를 한 후, 55°C에서 24시간 가수분해를 실시하였다. 그 후, 100°C에서 5분간 효소의 불활성 처리를 하여 잔유물을 제거한 다음, 0.45 μm 필터(Sartorius, Germany)로 잔유물을 분리하였다.

또한 천잠 및 작잠의 용해는 질산아연(Zn(NO₃)₂·6H₂O)을 이용하여 90°C, 3시간의 환류장치를 이용하여 용해하였다(권 등, 2003). 얻어진 용액은 Quick Filter (Microcloth Q-Filtration, Calbiochem, USA)로 잔유물을 제거한 후 Sephadex G-10 Gel Filtration Chromatography (Pharmacia, GradiFrac, UV-1 detection, Sweden) 장치를 이용하여 순수 저분자화 된 작잠 및 천잠의 수용액을 얻었다. 그 후 얻어진 각 액상 시료를 챔버내 온도가 -5°C 내외를 유지하는 감압 건조 장치(삼원 냉열사, Model : Vacuum Freeze Dryer)를 이용하여 분말을 얻어 시료로 사용하였다.

2. 피부 섬유 아세포 및 염증세포 배양

피부 섬유 아세포주인 CCD-986sk 세포와 염증유발 세포인 대식세포로 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행으로부터 분양 받아 사용하였으며, 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin을 포함하고 있는 DMEM으로 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 계대배양하여 실험에 사용하였다.

3. 시료 처리 및 증식 효과

CCD-986sk 세포주를 6 well plate에 5×10⁵ cell/ml로 하여 4 ml씩 분주하여 3일 동안 배양하여 부착시킨후 바닥을 멸균된 이쑤시개를 사용하여 십자형 모양의 상처를 낸 후 새로운 배지로 교환한 후 시료를 농도별로 처리하였다. 3일 간격으로 시료와 새로운 배지로 교환하여 14일 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하며 세포 증식을 관찰하였다.

RAW 264.7 세포는 96 well plate에 1×10⁵ cell/ml로 하여 100 ul씩 분주 후 농도별로 실크 단백질을 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양 후 세포 증식을 관찰하였다.

세포의 증식률은 methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 시약을 이용하여 측정하였다.

4. 실크 단백질의 특성 분석

피부세포의 증식에 효과적인 가잠과 천잠 및 작잠 실크 단백질의 분자량은 gel permeation chromatography (GPC, VISCOTEK)를 사용하였다. 측정온도는 37°C, 유속 5 ml/min, TSK-CELL 컬럼을 사용하였고, pullulan standard series을 표준물질로 하여 검량선을 구하였다.

전아미노산 분석은 실크 단백질 분말을 0.01 N NaOH 10 ml로 4시간 동안 처리한 후 0.1 N HCl 10 ml을 가하여 전체가 20 ml이 되게 한 후 membrane filter로 여과 후 아미노산 분석 시료로 사용하였고, 유리아미노산은 시료를 pH 2.2 loading buffer에 녹인 후 여과하여 사용하였다. 아미노산 조성분석은 Biochrom 20 Amino Acid Analyser (Amersham Pharmacia Biotech, USA)를 사용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 피부 섬유아세포 증식에 미치는 영향

가잠과 천잠, 작잠고치로부터 추출한 단백질은 분자량 500 (Mw 500) 내외와 1,000 (Mw 1,000)내외에서 각기 분획화하여 상처후 피부세포 증식에 효과적인 분획물을 선발하였다. 피부 섬유아세포에 기계적 상처를 준 후 시료를 농도별로 (0.1, 1, 10 µg/ml) 처리한 실험군과 무처리군을 대조군으로 하여 14일간 배양하여 증식률을 구하였다(Natulia *et al.*, 2001). 그림 1은 대조군의 세포 증식을 100으로 한 후 상대적인 세포 증식률을 표시하여 가잠과, 천잠, 작잠에서 각각 2개의 분획물을 선발하였다. 가잠에서 선발한 실크단백질은 0.1 µg의 농도에서는 증식률이 크게 증가하지 않았으나, 10 µg의 농도에서는 무처리군에 비하여 40% 이상 증가되었으며, 분자량 500 이내의 BM-

1이 다소 분자량이 큰 BM-2 보다 증가율이 높았다. 천잠의 경우 분자량 500 이내의 AY-1은 0.1 µg의 농도로 처리했을 때에도 10% 이상의 세포 증식 효과를 보였다. AY-2의 경우엔 0.1과 1 µg의 농도로 처리했을 경우엔 증식 효과가 그리 높지 않았으나, 10 µg/ml에서는 40% 이상의 세포 증식 효과가 있음을 확인하였다. 야잠 실크 분획물을 처리했을 때 AP-1, AP-2 모두 0.1 µg/ml에서는 무처리군과 비슷한 세포 증식률을 보이거나 1 µg/ml로 처리했을 때에는 25% 이상의 증식 효과를 나타내었다. 기계적 상처를 입은 피부 섬유아세포에 가잠과 천잠 및 야잠 실크 분획물 0.1, 1, 10 µg/ml을 처리했을 때 농도 의존적으로 세포증식을 증가시켰다.

Yeo 등(2000)은 흰쥐에 상처를 낸 후 가잠 실크피브로인과 키토산을 혼합한 창상피복제를 도포한 경우 콜라겐 생성이 월등히 증가하고, 상처 치유 속도가 빠르다고 하였다. 이는 상처 후 실크 단백질이 섬유아세포의 증식을 촉진하여 콜라겐의 생성을 유도하여 피부 재생이 빠르게 진행되었음을 시사한다. 이러한 결과로 미루어 가잠뿐 아니라 야잠과 천잠의 실크단백질도 우수한 피부세포 증식 효과를 갖고 있음이 확인되었다. 향후 실크 단백질을 이용한 인조피부 및 치료제로서의 가능성을 세포 단계에서 확인하였다.

2. 염증세포 증식에 미치는 영향

피부 섬유아세포 증식에 효과적인 실크단백질에 대하여 염증유발에 관련된 대식세포인 RAW 264.7에 대한 세포 독성을 확인하였다. 피부세포 증식에 효과적이었던 0.1, 1, 10 µg/ml 농도 범위에서 가잠(BM-1과 BM-2), 천잠(AY-1과 AY-2) 및 작잠(AP-1과 AP-2) 실크 단백질분획물의 RAW 264.7 세포 증식에 미치는 효과를 그림 2에 나타냈

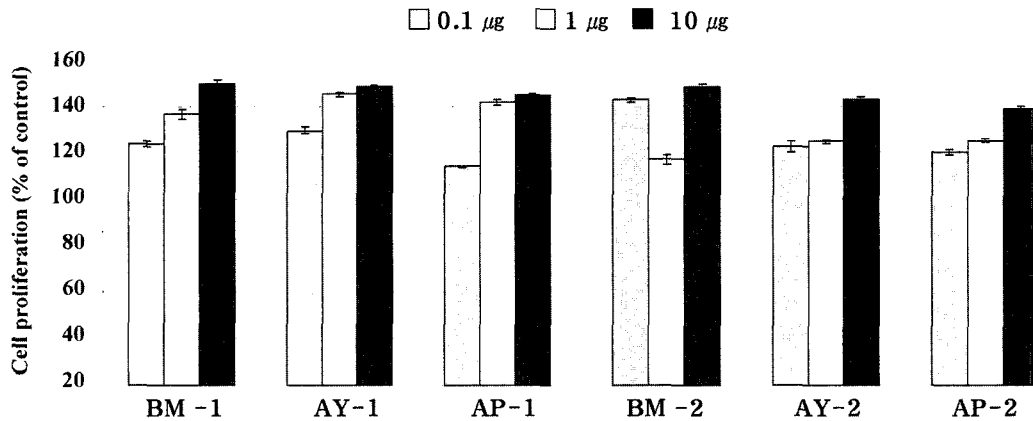


Fig. 1. The effect of silk protein fractions from *Bombyx mori* (BM-1, 2), *Antheraea yamami* (AY-1, 2) and *A. pernyi* (AP-1, 2) on CCD-986sk cell proliferation after *in vitro* injury. The cells were injured in the presence of various concentration of silk protein fractions for 14 days. Then, the cells were further incubated with (MTT) for 4 h. Absorbance was read on an ELISA reader at 565 nm. Data represent mean±SEM of 4 observations.

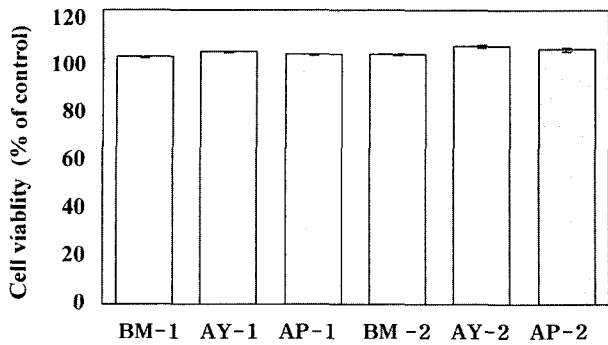


Fig. 2. The cell viability of silk protein fractions from *Bombyx mori* (BM-1, 2S), *Antheraea yamami* (AY-1, 2) and *A. pernyi* (AP-1, 2) on RAW 264.7 cells by methylthiazol-2-yl-2.5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. The cells were treated with various concentration of silk protein fractions for 48 h. Data represent mean±SEM of 4 observations.

다. 결과에서처럼 대조군과 비교 시 특이적인 영향을 미치지 않았다. 이는 향후 실크 단백질이 피부세포 증식 및 반흔 관련 사이토카인 발현 조절에 있어 세포 독성을 갖고 있지 않다는 점에서 매우 흥미로운 결과이다(Border *et al.*, 1990; Broekelmanu *et al.*, 1991). 대식세포에서 실크 단백질 처리 후 각각의 사이토카인 발현에 대한 구체적인 연구의 필요성이 요구된다.

3. 분자량 및 아미노산 조성

피부세포 증식에 효과적인 가잠의 실크 단백질은 여 등 (1999)의 방법과 동일하게 각각의 성분을 측정하였다. 평균 분자량(Mw)이 300-500 및 950-1500 분획군이 세포 증식에 뛰어난 효과가 있음을 확인되었다(표 1). 동일한 가잠 단백질일 경우 분자량이 좀더 작은 BM-1에서 증식 효과가 다소 높게 나타남을 알 수 있었으며, 이는 천잠과 작잠에서도 비슷한 경향을 띠었다. 이러한 결과에서 분자량이 작은 분획물이 피부 세포 증식에 좀 효과적이며 또한 분자량의 차이는 단백질의 기능성에 영향을 줄 수 있음은 시사한다.

피부세포 증식에 효과적인 가잠, 천잠 및 작잠 실크단백질 분획물의 전 아미노산과 유리 아아미노산 조성은 표 2와 3에서 나타내었다. 아미노산 조성에 있어 저분자량대인 천잠의 AY-1 분획물의 전아미노산 및 유리아미노산 모두 Tyr 함량이 매우 높게(25-48 g/100g) 나타났으며, 작잠의 AP-1 분획물에서는 Lys 함량이 높게(5.2 g/100g) 나타남을 확인 하였다.

유리 아미노산은 어떤 물질이 원래 상태에서 기능성을 나타내는 척도가 될 수 있기에 기능성이 강조되는 의약 및 식품 단백질과 같은 분야에서 중요하게 작용될 수 있다(여 등, 2004). 이는 피부 세포 증식의 기능성 측면에서

볼 때 중요한 인자로 작용할 수 있다는 것을 의미한다.

이러한 실험 결과들에서 피부 세포의 재생에 있어 가잠은 물론 천잠과 작잠의 실크 단백질이 매우 효과적이었으며 특히 저분자량대의 분획물들이 뛰어난 효과와 함께 다른 세포에 대한 세포독성도 갖지 않는다는 것을 확인 하였다. 이는 향후 피부 외상이나 화상 후 치료제로서의 가능성과 함께, 실크 단백질의 기능성과 구조의 상관관계를 밝힐 수 있는 중요한 연구의 기초 자료로서 활용을 기대한다.

Table 1. Molecular weight of the silk protein fractions from *Bombyx mori* (BM-1, 2), *Antheraea yamami* (AY-1, 2) and *A. pernyi* (AP-1, 2) on CCD-986sk cell proliferating after *in vitro* injury

	BM		AY		AP	
	1	2	1	2	1	2
Molecular weight	590	1400	340	940	300	1440

Table 2. Free amino acid compositions of the silk protein fractions from *Bombyx mori* (BM-1, 2), *Antheraea yamami* (AY-1, 2) and *A. pernyi* (AP-1, 2) on CCD-986sk cell proliferating after *in vitro* injury

Amino acid	BM		AY		AP	
	1	2	1	2	1	2
Asp	0.50	0.54	4.56	5.36	2.38	4.28
Ser	5.79	6.54	4.51	19.45	4.31	17.07
Glu	*)	0.64	0.53	2.8	0.69	1.85
Gly	27.55	23.19	7.14	29.1	11.37	33.76
Ala	19.66	14.19	4.39	23.26	8.71	27.61
Ile	0.83	4.59	-	-	-	-
Leu	0.94	10.17	-	1.97	-	0.93
Tyr	2.84	9.43	48.2	6.78	-	6.14
Arg	0.62	0.38	8.25	0.36	2.04	0.49

*) No detect.

Table 3. Total amino acid compositions of the silk protein fractions from *Bombyx mori* (BM-1, 2), *Antheraea yamami* (AY-1, 2) and *A. pernyi* (AP-1, 2) on CCD-986sk cell proliferating after *in vitro* injury

Amino acid	BM		AY		AP	
	1	2	1	2	1	2
Asp	0.48	2.62	0.77	4.57	0.74	4.73
Ser	4.84	45.36	1.93	45.48	1.83	15.23
Gly	35.07	33.94	8.62	25.79	4.93	25.84
Ala	23.91	19.43	4.9	22.69	4.19	21.03
Val	*)	-	0.39	-	0.44	1.69
Met	2.83	3.88	0.54	1.44	-	0.1
Tyr	5.57	6.39	25.32	5.19	-	9.89
Lys	0.79	0.59	0.19	0.18	5.24	0.42

*) No detect.

적 요

가잠과 천잠 및 작잠의 실크 단백질 분획물로부터 피부 섬유아세포에 대한 증식 효과를 알아본 결과 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

1. 가잠 및 천·작잠 단백질로부터 다양한 분자량대의 실크 단백질을 순수 분리 분획화 하여 사람 피부세포 (human skin fibroblast; CCD-986sk)에 기계적 상처를 준 후 처리한 결과, 평균 분자량(Mw)이 300-500 및 950-1500 분획군이 세포 증식에 뛰어난 효과가 있음을 확인·선발하였다.

2. 가잠의 경우 평균 분자량 590(BM-1), 1400(BM-2)에서, 천잠은 340(AY-1), 940(AY-2), 작잠에서는 300(AP-1), 1440(AP-2)에서 10 µg/ml의 농도로 처리했을 경우 피부 섬유아세포의 증식이 무처리구에 비하여 40% 이상의 증식 효과를 갖았다. 또한 유효 농도 범위에서 대식세포인 RAW 264.7 세포에 대해서는 세포독성을 지니지 않았다.

3. 아미노산 조성에 있어 저분자량 AY-1 분획의 전아미노산 및 유리아미노산은 Tyr 함량이 매우 높게(25-48 g/100g) 나타났으며, 작잠의 저분자 분획인 AP-1에서는 Lys 함량이 높게(5.2 g/100g) 나타남을 확인하였다.

4. 동일한 실크 단백질일 경우 저분자량 분획물에서 피부 세포 증식에 좀 더 효과적이었다.

인용문헌

권해용, 이광길, 여주홍, 박용환 (2003) 질산아연에 의한 작잠견피브로인의 용해와 특성. *한잠학지*, **45**(2): 121-125.

여주홍, 이광길, 이용우, 남진, 김선여 (1999) 용해조건에 따른 견 단백질의 조성 변화. *분석과학회지*, **12**(4): 306-311.

여주홍, 이광길, 권해용, 우순옥, 한상미, 이용우, 김진일, 김성수, 山村 城 (2004) 견 피브로인 효소 가수분해물의 동물 인지기능 향상 효과. *한잠학지*, **46**(1): 23-27.

이광길, 여주홍, 이용우, 권해용, 김종호 (2001) 세리신 단백질의 생리활성과 피부친화성 탐색. *한잠학지*, **45**(2): 109-115.

Border, W. A., S. Okuda, L. R. Languino, M. B. Sporn and E. Ruoslahti (1990) Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor β1. *Nature*, **346**: 371-374.

Broekelmann, T. J., A. H. Limper, T. V. Colby and J. A. McDonald (1991) Transforming growth factor β1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human

pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci.*, **88**: 6642-6646

Bullard, K. M., D. L. Cass, M. J. Banda and N. Scott Adzick (1997) Transforming growth factor beta-1 decreases interstitial collagenase in healing human fetal skin. *J Pediatr Surg.*, **32**(7): 1023-1102.

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.

Kato, N., S. Sato, A. Yamanaka, H. Yamada, N. Fuwa and M. Nomura (1998) Silk Protein, Sericin, inhibits Lipid Peroxidation and Tyrosinase Activity. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **62**(1): 145-147.

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.

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

Natalia, G., K. Kugathasan, C. N. Chesterman and L. M. Khachigian (2001) Early growth factor-1 mediates insulin-inducible vascular endothelial cell proliferation and regrowth after injury. *J. cellular Biochemistry* **81**: 523-534.

McCaughey, 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-β. *Ann. Plast. Surg.*, **33**: 38-45.

Shah, M., D. M. Foreman and M. W. J. Ferguson (1992) Control of scarring in adult wounds by neutralising antibody to transforming growth factor-β. *Lancet*, **339**: 213-224.

Shinozaki, M., S. Kawara, N. Hayashi, T. Kakinuma, A. Igarashi and R. D. Rosenberg (1997) Induction of subcutaneous tissue fibrosis in newborn mice by transforming growth factor-β : simultaneous application with basic fibroblast growth factor causes persistent fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun.*, **237**: 292-296.

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**(1): 59-64.