

## 실크 생체막에 대한 세포 부착 및 세포 증식

조유영\* · 권해용 · 이광길 · 남성희 · 이희삼 · 여주홍

농촌진흥청 국립농업과학원 잠사양봉소재과

## The Promotion of Cell Attachment and Proliferation on Silk Fibroin

You-Young Jo\*, HaeYong Kweon, Kwang-Gill Lee, SungHee Nam, Heui-Sam Lee, and Joo-Hong Yeo

Sericultural & Apicultural Materials Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-100, Republic of Korea

Received May 18, 2011; Accepted June 14, 2011

Silk fibroin, a natural protein produced by silkworm, is a good biomaterial which has biodegradability and biocompatibility. To ascertain the effects of silk fibroin on cell growth, silk fibroin films were prepared using silk fibroin aqueous solutions of various concentrations. We investigated the attachment, proliferation, morphology of the cells and the expression levels of genes related to cell attachment and growth on the silk fibroin films. When the cells were cultured on the 0.1 and 1% silk fibroin film, the cell adhesion ability was very excellent. Particularly, overall cell growth on the 1% silk fibroin film was definitely superior to the others. Also, expression levels of genes related cell growth were increased on the 0.1 and 1% silk fibroin film. These results suggest silk as a material for medical applications.

**Key words:** cell attachment, cell proliferation, gene expression, silk fibroin

### 서 론

실크는 누에로부터 생산되는 천연단백질로 수 천년 동안 의 료용 봉합사로 사용되어왔다. 실크는 반복적인 소수성 아미노 산이 주를 이루고 있는 피브로인과 친수성 단백질인 세리신 등 두 종류의 단백질로 구성되어있다[Lucas 등, 1957; Fraser 등, 1966]. 그 중 실크 피브로인은 생체적합성, 생분해성, 통기성, 분해산물의 안전성 및 우수한 기계적 특성 등의 특징[Minoura 등, 1990; Santin 등, 1999; Yeo 등, 2000; Kweon 등, 2001; Horan 등, 2005]으로 인해 매력적인 천연 의료용 소재로 인식 되면서, 최근 조직공학용 지지체와 다양한 용도의 의료용품으 로 개발하기 위해 연구되고 있다[Moy 등, 1991; Sofia 등, 2001; Lv 등, 2004; Kim 등, 2005].

본 연구에서는 실크 피브로인을 이용하여 다양한 형태 및 다 용도의 의료용품을 개발하기 위해, 우선적으로 실크 피브로인 생체막을 제작하고 이 실크 피브로인 생체막에 대한 세포 부착 과 세포 증식에 미치는 영향을 알아보려 하였다. 먼저 염을 이용하여 다양한 농도의 실크 피브로인 수용액을 제조하고 이 용액으로 실크 생체막을 제작하였다. 실크 생체막의 구조를

Fourier transform (FT)-IR과 Differential Scanning Calorimeters (DSC)를 이용하여 분석하였으며, 실크 생체막에 대한 세포부 착, 세포증식, 세포형태 등을 관찰하였다. 또한 세포부착과 세 포증식에 관여하는 유전자의 발현수준을 관찰하였다.

### 재료 및 방법

**실크 피브로인 수용액 및 실크 생체막 제조.** 누에고치로부터 세리신을 제거하고 피브로인만을 얻기 위해 누에고치에 마르세 이유 비누를 넣고 끓여서 정련하였다. 정련된 실크 피브로인을 염화칼슘 : 에탄올 : 물 = 1 : 2 : 8 (물 비율) 용액으로 80°C에서 3 시간 동안 용해시키고 부직포와 탈지면을 이용하여 거른 뒤 염 을 제거하기 위하여 셀룰로오스 투석막(MWCO=12,000~14,000) 으로 3일 동안 증류수에 투석하여 실크 피브로인 수용액을 제 조하였다. 제조된 실크 용액의 농도는 수분분석기(IR-200, Denver Instrument Company, Bohemia, NY)를 이용하여 측정 하였다. 이 실크 피브로인 용액을 평균수로 0.1~3.0%의 농도로 희석 후 0.22- $\mu$ m 필터로 걸러낸 뒤 세포배양용기의 2/3 높이 로 채워 37°C 오븐에서 3일 동안 방치하여 실크 생체 막을 제 조하였다. 제작된 실크 생체막의 두께는 디지털 두께 측정기를 (OMEGA instruments, Seoul, Korea) 이용하여 측정하였다.

**실크 생체막의 특성분석.** 제조된 실크 피브로인 수용액의 분 자량 분포를 관찰하기 위하여 12.5% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 겔을 이용하여

\*Corresponding author  
Phone: +82-31-290-8506; Fax: +82-31-290-8516  
E-mail: yyjo@korea.kr

전기영동을 실시하고[Lamli, 1970], Coomassie Blue R-250 (Sigma, St. Louis, MO)으로 염색하였다.

시차열분석기(DSC, TA Instrument, New Castle, DE)를 이용하여 제작된 다양한 농도의 실크 생체막에 대한 열적거동을 관찰하였다. 시료를 알루미늄 팬에 밀봉하여 50 mL/분의 질소 기류하에서 10°C/분의 승온 속도로 측정하였다.

적외선 분광광도계를 이용하여 적외선 분광분석을 실시하여 실크 생체막의 구조적 특성을 관찰하였다. 2000~600 cm<sup>-1</sup>의 스펙트럼 범위에서 Attenuated total reflectance (ATR)-FTIR을 측정하였다.

**세포배양.** 세포 생장에 대한 실크 생체막의 영향을 평가하기 위하여, 생쥐유래 섬유아세포 L929를 다양한 농도로 제작된 실크 생체막 위에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하여 세포 부착율과 세포 증식율을 관찰하였다. 세포 배양을 위한 배지는 10% (v/v) FBS (fetal bovine serum, GIBCO, Grand Island, NY)와 100 U 스트렙토마이신과 100 µg/mL penicillin (GIBCO) 이 함유된 DMEM 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium-high glucose, WelGENE, Daegu, Korea)를 사용하였다. 실크 생체막에 대한 세포 부착능력 측정을 간단히 설명하면, 먼저 각 실크 생체막을 70% (v/v) 에탄올로 소독한 뒤 남아있는 에탄올을 제거하기 위하여 phosphate buffered saline (PBS) 용액을 이용하여 3번 세척하고 세포배양 배지를 이용하여 최종적으로 세척하였다. 이렇게 소독된 실크 생체막에 L929 세포(10,000 cells/well)를 접종하고 1시간 또는 2시간 배양한 후에 L929 세포의 실크 생체막에 대한 부착능력을 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)법을 이용하여 측정하였다[Mosmann, 1983]. 세포 증식률을 측정하기 위해서, 앞에서와 같은 방법으로 실크 생체막을 소독하고 1,000개의 세포를 실크 생체막에 접종하였으며, 1~10일 동안 배양하였다. 배지는 매 2~3일마다 교체하였으며, MTT 방법으로 1, 4, 7, 10일에 세포 증식률을 측정하였다. 세포 형태를 관찰하기 위하여, 24 시간 배양된 세포를 70% 에탄올로 3분 동안 고정시킨 뒤 hematoxylin 용액에 염색하여 현미경으로 관찰하였다[Sun 등, 2009]. 본 연구에서 사용한 세포는 모두 passage 4였다.

**세포생장 관련 유전자 발현수준 분석.** 세포부착 및 세포 증식과 같은 세포생장과 관련 유전자의 발현수준을 분석하기 위하여 실크 생체막에서 일정시간 배양한 세포로부터 전체 RNA를 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 제조사에서 제공한 방법에 따라 분리하였다. cDNA 합성과 PCR (Polymerase Chain Reaction)은 *amfiRivert* 1-step RT-PCR kit (GenDEPOT, Barker, TX)를 사용하여 수행하였다. 분석된 유전자는 TGFβ-1 (Transforming Growth Factor-beta 1), Fibronectin, Collagen 타입 I, Collagen 타입 III 였으며 PCR을 위한 프라이머는 다음과 같다. TGFβ-1 (sense, 5'-TGAACCAAGGAGACGGAATACAGG-3'; antisense, 5'-GCCATGAGGAGCAGGAA GGG-3'), Fibronectin (sense, 5'-AGAGCAAGCCTGAGCCTG AAG-3'; antisense, 5'-TCGCCAATCTTGAGGACTGACC-3'), Collagen type I (sense, 5'-ACGGCTGCACGAGTCACAC-3'; antisense, 5'-GGCAGGCGGGAGGTCTT-3'), Collagen type III (sense, 5'-GTTCTAGAGGATGGCTGTAACACA-3'; antisense,

5'-TTGCTTGCCTGTTTGGATATTC-3'), GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; sense, 5'-ACGGCAAATTCAACG GCACAG-3'; antisense, 5'-AGACTCCACGACATACTCAGCA C-3') [Kenyon 등, 2003]. PCR반응은 PCR기기 (PCR thermal cycler, Takara, Shiga, Japan)를 이용하여 94°C에서 4분 predenaturation 후, 94°C에서 60초 동안 denaturation, 50°C에서 60초 동안 annealing, 72°C에서 60초 동안 extension 반응을 35 cycle 반복 실시하였고, 마지막으로 72°C에서 10분 동안 최종 extension하였다[Kenyon 등, 2003]. PCR반응으로 생성된 산물은 1% 아가로스겔을 이용하여 전기영동하고 UV하에서 관찰하였다. 얻어진 이미지는 Image J program (NIH, Bethesda, MD)을 이용하여 분석하였다.

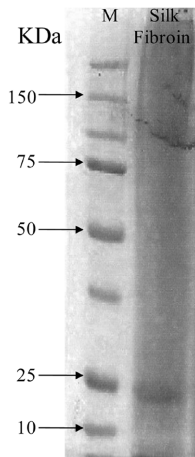
**통계학적 분석.** 각 실험은 최소 4회 이상 반복 실험을 수행하였다. 통계분석(STASTICA)은 mean ± SD로 표시하였고, ANOVA (one-way analysis of variance) 분석을 통하여 신뢰도 95% ( $p < 0.05$ )로 분석하였다.

## 결과 및 고찰

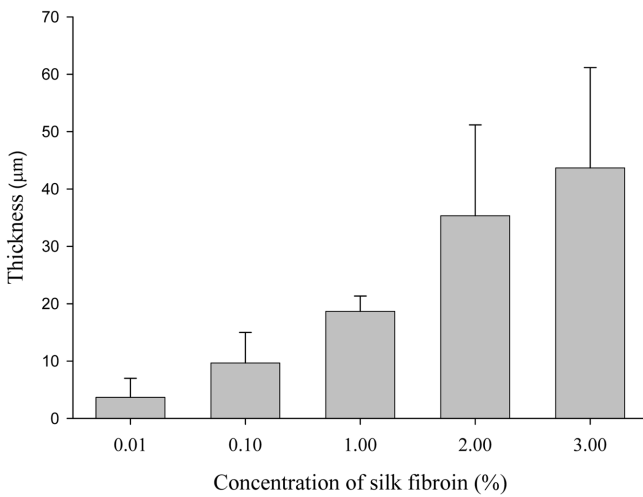
**실크 피브로인 제조 및 특성분석.** 실크 피브로인은 천연 고분자 단백질로, 뛰어난 생체적합성과 생분해성을 가지고 있으며, 면역반응이 거의 없는 것으로 알려져 최근 촉망받는 의료용 소재 중 하나로 주목 받고 있다. 그러나 실크 피브로인은 강력한 수소결합과 결정성 구조를 갖는 섬유상 단백질로 다른 천연 또는 합성 고분자 재료와 달리 유기용매나 물에 쉽게 용해되지 않는다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 오랜 기간 동안 실크 피브로인 분자 결합을 끊는 다양한 방법들을 개발하기 위한 많은 연구가 수행되었다. 연구된 대표적인 방법으로 산 가수분해방법, 효소 가수분해방법, 중성염을 이용한 용해법을 들 수 있다. 가수분해에서 실크 피브로인은 산이나 효소에 의해서 펩타이드 결합이 가수분해되며, 중성염을 사용하는 경우 실크 피브로인 분자간 수소결합이 절단되어 용해된다. 일반적으로 가수 분해 방법으로 실크를 용해할 경우 염을 이용하는 경우보다 얻어지는 실크 피브로인의 분자량은 매우 작다. 일반적으로 가수분해에 의해 용해된 저(低)분자량 피브로인은 흡수가 용이하므로 식이소재나 화장품 소재로 이용되고 있다.

본 연구에서는 중성염인 염화칼슘을 이용하여 실크 피브로인 수용액을 제조하였다. 중성염을 이용하여 실크 피브로인을 용해할 경우 고(高)분자량을 갖는 피브로인을 얻을 수 있으므로 의료용 인체적용 소재를 제작에 적합할 것으로 생각되었다. 실크 피브로인 단백질은 L쇄(light-chain fibroin, 25 kDa)와 H쇄(heavy-chain fibroin, 350 kDa)의 두 서브유닛이 약 1:1의 비율 (mass ratio)로 구성되어있다 [Zhou 등, 2000]. 본 연구에서 제조한 실크 피브로인 수용액의 전기영동 결과(Fig. 1) 용해된 실크 피브로인의 전기영동 패턴은 염의 작용에 의한 H쇄의 절단으로 인해 생성된 10~300 kDa의 넓은 범위의 분자량 분포를 보여주었으며, L쇄는 염에 의해 거의 절단되지 않고 25 kDa에 해당하는 L쇄의 밴드를 관찰 할 수 있었다.

본 연구에서 제작된 실크 피브로인의 농도는 3.7%였으며, 다양한 농도로(0.01, 0.1, 1.0, 2.0, 3.0%) 희석하고 세포배양 접시



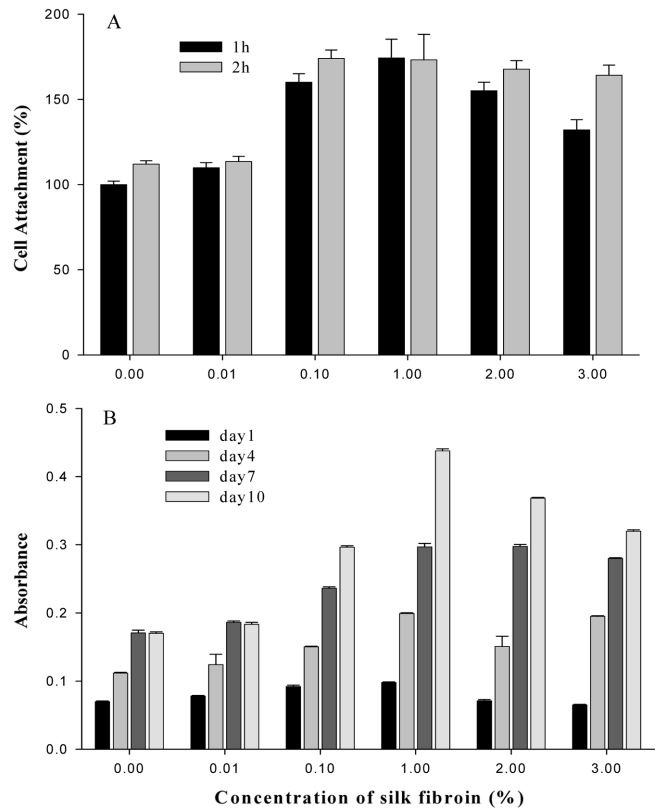
**Fig. 1. SDS-PAGE analysis of silk fibroin solution.** M, Marker; silk fibroin, Silk fibroin solution



**Fig. 2. Thickness of silk fibroin films.** Silk fibroin films were produced using 0.01~3% silk fibroin solutions and the thickness of each film was measured.

내에 캐스팅하는 방법으로 다양한 농도의 실크 생체막을 제작하였다. 제작된 각 실크 생체막의 두께는 대조군인 세포배양접시의 두께를 0 μm로 간주하고 세포배양접시 위에 생성된 실크 생체막의 두께를 측정하였을 때, 약 4~60 μm였다(Fig. 2). 제작된 실크 생체막을 주사전자현미경으로 관찰한 결과 모두 매끄럽고 평평한 표면을 가졌으며, 시차열분석 결과 270~300°C 온도범위에서 실크 구조에 특징적인 열분해 흡열피크를 나타냈다. 적외선 분광광도 측정값 역시, 모든 실크 생체막에서 β-구조(1265와 1630 cm<sup>-1</sup>)와 랜덤코일 구조(1235와 1535 cm<sup>-1</sup>)와 같은 전형적인 실크의 피크를 보여줬다.

**실크 피브로인의 세포생장에 대한 영향.** 인체의 외부는 대부분 생체막(피부, 각막, 고막 등)으로 구성되어 있으며, 이 생체막은 외부 환경에 대한 경계일 뿐만 아니라 위치에 따라 다양한 역할을 수행한다. 우리는 실크 생체막을 다양한 용도의 의료용 생체막으로 이용하기 위하여, 실크 생체막을 제작하고 세포 배양을 통해 실크 생체막의 생체적합성과 세포 생장에 미치는 영향을 시험하였다. 세포부착과 세포증식 같은 세포 생장에



**Fig. 3. Silk fibroin promotes cell attachment and proliferation.** The ability of cell adhesion (A) and cell proliferation (B) is observed on the various silk fibroin films.

대한 특성은 의료용 소재개발 시 고려해야 할 매우 중요한 요인중의 하나이다. 특히 인체내부에 직접 이식되는 소재의 경우에는 반드시 세포 생장에 대한 시험이 수행되어야 한다. 실크 생체막에 대한 세포부착능력을 시험한 결과, 대조군인 세포 배양접시에서보다 실크 생체막에서 세포를 배양했을 때, 시험된 모든 농도의 실크 생체막에서 세포 부착능력이 증가하였다. 특히 1% 실크 생체막에서 세포 부착율이 최대 80%까지 증가하였다(Fig. 3A). 세포 증식 속도 역시 실크 생체막에서 배양 시 배양 속도가 더 빨랐으며, 1% 실크 생체막에서 배양한 세포의 경우 가장 빠른 속도로 증식하였다(Fig. 3B). 실크 생체막에서 배양된 세포의 형태는 섬유세포의 특징인 방추형 모양을 유지하였으며 1% 실크 생체막에서 세포 밀도가 가장 높았다(Fig. 4).

실크 생체막에서 세포배양 후 fibronectin, TGFβ-1, collagen 타입 I, collagen 타입 III 등의 세포성장 및 부착에 관련된 유전자의 발현 수준의 변화를 관찰하였다(Fig. 5). Fibronectin은 세포 외 기질(extracellular matrix)과의 다양한 세포상호작용에 관여하며 세포부착, 이동, 성장, 분화 등의 중요한 역할을 담당한다[Hynes 1990; Lyon 등, 2000]. 뿐만 아니라, fibronectin은 상처치유와 배아발달과정에서도 매우 중요하며[Pankov과 Yamada, 2002], 헤파린, 콜라겐, 피브린과 같은 생물학적으로 매우 중요한 다양한 물질과 결합한다. 본 연구에서 fibronectin의 발현량은 실크 생체막이 없는 세포배양배지에서 배양한 대조군과 비교했을 때, 0.1과 1% 실크 생체막에서 시간이 경과

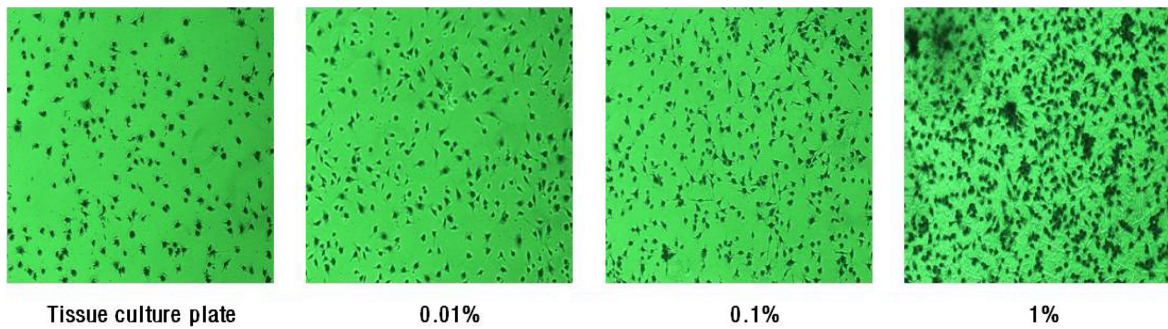


Fig. 4. Cell morphology of cultured cells on the various silk fibroin films.

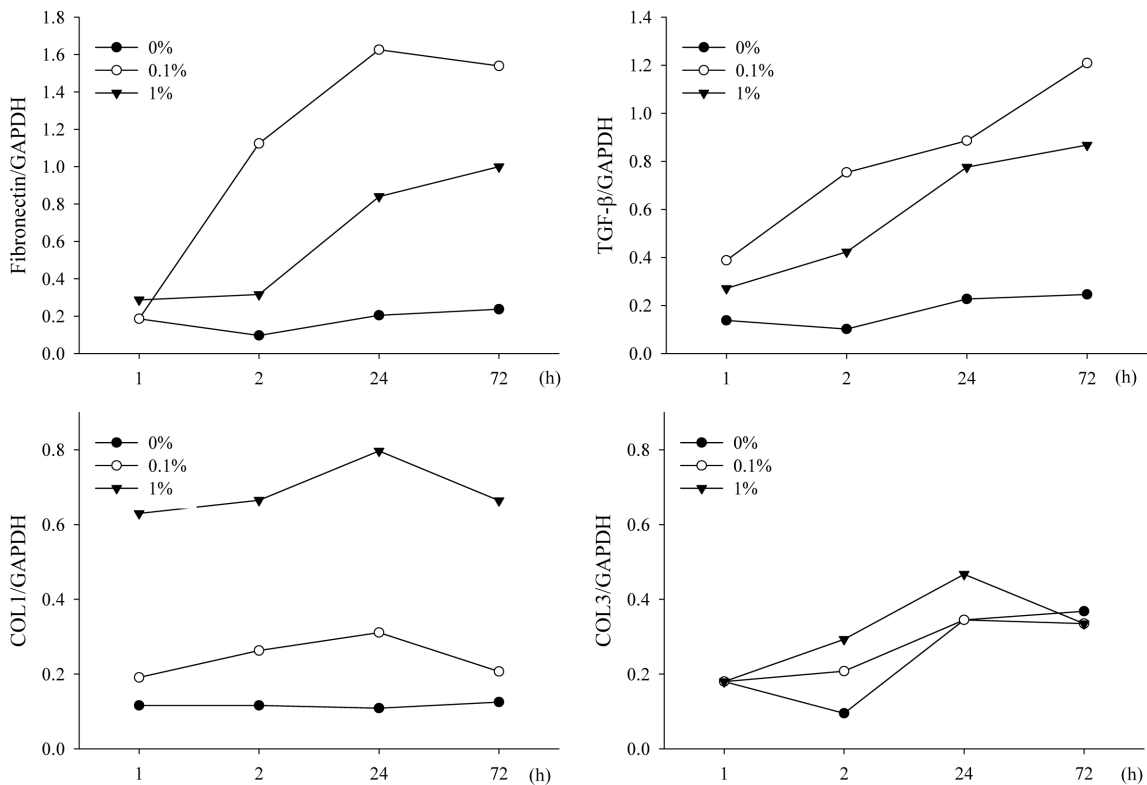


Fig. 5. Silk fibroin increased expression level of genes associated with cell growth. It showed relative expression levels based on the GAPDH expression level. ●, 0% silk fibroin film; ○, 0.1% silk fibroin film; ▼, 1% silk fibroin film

될 수록 매우 증가했으며, 특히, 24시간 동안 0.1% 실크 생체막에서 배양한 세포에서 대조군에 비해 8배 이상 발현량이 증가했다. 또한 세포증식과 관련된 인자인 TGFβ-1의 발현 역시 fibronectin과 비슷한 경향으로 실크 생체막에서 배양 시 시간이 갈수록 발현량이 증가하는 경향을 나타냈다.

콜라겐은 세포 외 기질의 주된 성분 중 하나로 동물의 결합 조직을 구성하고 있으며, 세포와 세포 사이에서 지지대 역할을 하기도하며 현재까지 28 종류의 콜라겐이 확인되었다.

콜라겐 타입 I은 대부분의 조직에 존재하며 인체에서 가장 풍부한 단백질이고, 콜라겐 타입 III은 콜라겐 타입 중 2번째로 많은 콜라겐으로 뼈 형성을 제외하고는 콜라겐 타입 I과 관련되어있다[Jensen과 Host, 1997]. 따라서 세포생장이 활발해짐에 따라 콜라겐 타입 I과 III의 발현량이 증가될 것으로 예상했으며, TGFβ-1이 콜라겐 타입 I과 III의 발현량을 증가시킨다는 연

구가 보고 된 바 있다[Kenyon 등, 2003]. 본 연구에서 실크 생체막에서 세포 배양 후, 콜라겐 타입 I과 III의 발현량을 분석한 결과 대조군에 비하여 실크 생체막에서 그 발현량이 증가했지만 fibronectin과 TGF-β1과는 달리 0.1% 실크 생체막 보다 1% 실크 생체막에서 그 발현량이 높았다. 하지만 실크 농도에 대한 콜라겐 타입 I과 III, 그리고 fibronectin과 TGFβ-1 사이의 발현량 차이에 대한 명확한 해답을 얻을 수 없었다. 비록 모든 농도에서 대조군에 비하여 세포부착과 성장에 효과적이었지만 1% 이상의 농도에서는 농도가 높아질 수록 세포성장이나 부착 효율이 감소했다. 이는 높은 농도의 실크를 이용하여 제작된 생체막의 경우, 생체막이 딱딱해지고 유연성을 잃게 되며, 또한 접촉각 시험결과 높은 농도의 실크 생체막은 친수성 성질이 점점 약해지고 소수성 성질을 띄게 되므로, 세포가 성장 효율이 낮은 농도에 비해 떨어졌을 것으로 생각된다. 또한 2% 실크 피

브로인 생체막에서의 세포부착과 세포생장이 0.1% 생체막과 비슷한 촉진 효과를 관찰할 수 있었지만 같은 효과를 내는데 있어 적은 양의 실크 피브로인을 사용할 수 있다면 향후 실크 피브로인을 이용한 의료용 소재의 산업화에 도움이 될 것으로 여겨진다.

본 연구에서 세포 부착률 및 세포 증식률 측정과 세포성장 관련 유전자의 발현량 분석을 통해 실크 생체막이 세포 성장 촉진에 좋은 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 실크 피브로인을 이용하여 다양한 용도의 생체막을 제작하고 의료용 소재로서 사용하는 것은 결손되거나 손상된 생체막을 대체할 수 있을 뿐만 아니라, 치료과정 동안 세포의 성장을 촉진하여 빠른 치유효과를 기대할 수 있을 것이라 본다.

## 초 록

실크 피브로인은 누에로부터 생산되는 천연단백질로서 생분해성과 생체적합성을 가지고 있어 생체재료로 사용하기에 적합한 물질이다. 본 연구에서는 이러한 실크 피브로인이 세포 성장에 미치는 영향을 확인하기 위해서, 다양한 농도의 실크 피브로인 용액을 만들고 이를 이용하여 실크 피브로인 필름을 제작하였다. 제작된 실크 필름에서 세포를 배양한 후 세포부착과 증식 능력, 형태등을 관찰하였으며, 세포 부착과 성장관련 유전자의 발현을 분석하였다. 그 결과 0.1과 1% 실크 피브로인 필름에서 배양한 세포가 세포 부착능력이 가장 우수했으며, 특히 1% 필름에서 자란 세포의 경우 다른 농도의 필름에서 보다 그 생장이 매우 좋았다. 또한 세포 성장과 관련된 유전자의 발현 수준은 0.1과 1% 실크 피브로인 필름에서 증가됨을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 실크를 이용하여 다양한 용도의 의료용 소재로 사용하는데 있어 기존의 다른 생체막을 대체할 수 있을 뿐 아니라, 실크 생체막의 사용으로 결손된 부위에 대한 빠른 치유효과 또한 기대할 수 있을 것이라 생각된다.

**Key words:** 세포부착능력, 세포성장관련 유전자 발현, 세포 증식능, 실크 피브로인

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21사업(No. PJ007171042011) 및 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(No. PJ906973032011)의 지원에 의해 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

Fraser RD, MacRae TP, and Stewart FH (1966) Poly-L-alanyl-glycyl-L-analylglycyl-L-seryl-glycine: a model for the crystalline regions of

silk fibroin. *J Mol Biol* **19**, 580-582.

Horan RL, Antle K, Collette AL, Wang YZ, Huang J, Moreau JE, Volloch V, Kaplan DL, and Altman GH (2005) *In vitro* degradation of silk fibroin. *Biomaterials* **26**, 3385-3393.

Hynes RO (1990) In *Fibronectins*. Springer-Verlag, New York, NY.

Jensen LT and Host NB (1997) Collagen: Scaffold for repair or execution. *Cardiovascular Research* **33**, 535-539.

Kenyon NJ, Ward RW, McGrew G, and Last JA (2003) TGF- $\beta$ 1 causes airway fibrosis and increased collagen I and III mRNA in mice. *Thorax* **58**, 772-777.

Kim UJ, Park J, Kim HJ, Wada M, and Kaplan DL (2005) Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. *Biomaterials* **26**, 2775-2785.

Kweon HY, Ha HC, Um IC, and Park YH (2001) Physical properties of silk fibroin/chitosan blend films. *J Appl Polym Sci* **80**, 928-934.

Lammler UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lucas F, Shaw JTB, and Smith SG (1957) The amino acid sequence in a fraction of the fibroin of *Bombyx mori*. *Biochem J* **66**, 468-479.

Lv Q, Cao C, Zhang Y, Man X, and Zhu H (2004) The preparation of insoluble fibroin films induced by degummed fibroin or fibroin microspheres. *J Mater Sci Mater Med* **15**, 1193-1197.

Lyon M, Rushton G, Askari JA, Humphries MJ, and Gallagher JT (2000) Elucidation of the Structural Features of Heparan Sulfate, Important for Interaction with the Hep-2 Domain of Fibronectin. *J Biol Chem* **275**, 4599-4606.

Minoura N, Tsukada M, and Nagura M (1990) Fine structure and oxygen permeability of silk fibroin membrane treated with methanol. *Polymer* **31**, 265-269.

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-63.

Moy RL, Lee A, and Zalka A (1991) Commonly used suture materials in skin surgery. *Am Fam Physician* **44**, 2123-2128.

Pankov R and Yamada KM (2002) Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* **115**, 3861-3863.

Santin M, Motta A, Freddi G, and Cannas M (1999) *In vitro* evaluation of the inflammatory potential of the silk fibroin. *J Biomed Mater Res* **46**, 382-389.

Sofia S, McCarthy MB, Gronowicz G, and Kaplan DL (2001) Functionalized silk-based biomaterials for bone formation. *J Biomed Mater Res* **54**, 139-148.

Sun M, Zhou P, Pan LF, Liu S, and Yang HX (2009) Enhanced cell affinity of the silk fibroin-modified PHBHHx material. *J Mater Sci Mater Med* **20**, 1743-1751.

Yeo JH, Lee KG, Kim HC, Oh HYL, Kim AJ, and Kim SY (2000) The effects of Pva/chitosan/fibroin (PCF)-blended spongy sheets on wound healing in rats. *Biol Pharm Bull* **10**, 1220-1223.

Zhou CZ, Confalonieri F, Medina N, Zivanovic Y, Esnault C, and Yang T (2000) Fine organization of *Bombyx mori* fibroin heavy chain gene. *Nucleic Acids Res* **28**, 2413-2419.