

연골 재생에 대한 실크 단백질의 가능성

조유영* · 권해용 · 이광길 · 이희삼 · 전정우
농촌진흥청 국립농업과학원 잠사양봉소재과

The Possibility of Silk Protein to the Chondrogenesis

You-Young Jo*, HaeYong Kweon, Kwang-Gill Lee, Heui-Sam Lee and Jeong-Woo Chon

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

ABSTRACT

A number of researcher have studied biomaterials for cartilage regeneration and are now proceeding. Silk protein was attempted for use as biomedical materials by many researchers because it is natural polymer with biocompatibility and excellent mechanical strength. In this study, we want to know a possibility of silk protein on the cartilage regeneration. We isolated chondrocytes from nasal cartilage and confirmed optimal culture condition of the cells. To observe the effects of silk fibroin on chondrogenesis, we added silk fibroin solutions to the culture medium of chondrocyte and detected gene expression levels related chondrogenesis such as *col2*, *col10*. The chondrocytes showed optimal growth when they were cultured in DMEM medium supplemented with 10% FBS 100 μ M ascorbic acid. The levels of *col2* gene expression were increased in non-autoclaved silk fibroin, but decreased in autoclaved one. Also the gene expression levels of *col10* were increased in silk fibroin, particularly at 3D culture. Based on the results of this study, we had seen the possibility of silk fibroin for cartilage regeneration. In future studies, we should know more clearly the relationship between cartilage regeneration and the silk protein.

Key words : Silk protein, Chondrocyte, Cartilage

서 론

연골은 뼈와 함께 몸을 지지하고 있는 조직의 한 종류로 기질과 세포로 구성된다. 연골조직은 다른 결합조직과는 달리 당단백질, 연결조직섬유 및 매트릭스 등의 기질에 의해 유연성을 갖는다(Lee et al. 2006). 연골은 다른 지지조직과 마찬가지로 골수로부터 유래하며(Coelho et al. 1991), 생체 내에서 조직의 형태적 변화 없이 생체에 가해지는 기계적 하중을 견디게 하기 위한 중요한 조직으로 태어나기 전후 모두에서 장골의 발달과 성장에 필수적인 역할을 담당한다(Stirpe et al. 1989, Long et al. 1995, Reddi 1995). 일반적으로 연골이라고 부르는 것은 관절연골로서 약 75~80%의 물과 기질로 구성되는데, 기질 성분의 50~70%가 제2형 콜라겐 그리고 약 15~30%의 프로테오글리칸으로 구성되어있으며, 단지 1~2%의 세포를 포함하고 있다(Demoor et al. 1988). 생체 내에서 중요한 역할을 담당하지만 연골에는 혈관, 림프관 및 신경의 분포

가 없고, 단단한 세포의 기질로 둘러 쌓여있기 때문에 한번 손상 받거나 퇴화되면 재생되기 어려운 특징이 있다(Mankin 1982).

실크는 누에로부터 얻어지는 물질로 세리신(25%)과 피브로인(75%) 두 단백질로 구성된 천연고분자 물질이다(Lucas et al. 1957). 최근 실크를 다양한 생체재료를 만들 기 위한 소재로서 이용하려는 노력이 진행되고 있다(Moy et al. 1991, Sofia et al. 2001, Lv et al. 2004, Kim et al. 2005). 본 연구실에서도 실크 브로인을 이용하여 인공고막을 개발하여 실크의 생체재료로서의 우수성을 보고한 바 있다(Kim et al. 2010).

본 연구에서는 실크의 연골재생 효과에 대한 가능성을 알아보기 위하여, 연골세포를 분리하고, 최적배양조건을 확립한 후 실크 피브로인을 연골 세포 배양시 첨가하여 연골분화 마커인자인 제2형 콜라겐과 제10형 콜라겐 유전자의 발현량을 조사하였다.

*Corresponding author. E-mail: yyjo@korea.kr

재료 및 방법

1. 연골세포 분리 및 배양조건 확립

코뼈연골로부터 연골세포를 분리하기 위하여 HBSS 용액에서 연골조직을 수술용 칼로 잘게 자른 다음 콜라겐 분해효소 A를 처리하여 소화시키고 40 μm 주사기 필터를 이용하여 단일세포 현탁액을 만들어 연골세포를 분리하였다(Gordana et al. 2006). 연골세포는 여러 passage에 걸쳐 배양하고 그 형태를 관찰하였다.

분리한 연골세포의 최적 배양조건을 확립하기 위하여 세포배양접시(2차원배양)에서 연골세포의 최적 배양조건을 확립하기 위하여 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's Medium; Gibco BRL, Carlsbad, CA), DMEM/F12(DMEM/Ham's F-12 Nutrients mixture; Gibco BRL), RPMI(Gibco BRL)배지에서 10% FBS(fetal bovine serum; Gibco BRL)와 ascorbic acid(Sigma, St. Louis, MO) 0~200 μM의 농도로 첨가하여 10일 동안 연골세포의 성장과 증식정도를 관찰하였다. 연골세포의 분화를 유도하기 위한 3차원 배양법을 확립하기 위하여 2차원 배양에서 세포수를 증가시킨 다음 16,000~25,000 cells/ml 정도의 세포들을 원심분리를 이용하여 pellet을 만들었다. 연골 조직으로 분화하기 위한 분화유도물질을 첨가한 분화배지를 2~3일 간격으로 교체해주며 3차원 배양을 실시하였다.

2. 연골세포적용 실크 단백질 제조

누에고치로부터 세리신을 제거하고 피브로인만을 얻기 위하여 누에고치에 마그네슘 비누를 넣고 끓여 정련하였다. 실크피브로인 수용액을 얻기 위하여, 정련하여 실크 세리신이 제거된 정련수를 염화칼슘-에탄올 수용액(염화칼슘 : 에탄올 : 물 = 1 : 2 : 8 몰비율)으로 80°C에서 용해시키고 부직포와 탈지면을 이용하여 거른 뒤 염을 제거하기 위하여 셀룰로오스 투석막(MWCO = 12,000~14,000)으로 3일동안 증류수에 투석하여 실크 피브로인 수용액을 제조하였다.

3. 실크단백질이 연골세포에 미치는 영향 분석

제조된 실크 피브로인용액을 이용하여 3차원 연골세포

배양 시 100 μg의 농도로 첨가하여 연골의 마커인자인 제2형 콜라겐 유전자의 발현량을 PCR을 이용하여 실크 단백질이 연골 세포에 미치는 영향을 분석하였다. 시험을 위한 실크 용액은 멸균한 것(autoclaved silk)과 멸균하지 않은 것(non-autoclaved silk)을 시료로 사용하였다. 또한 연골세포 배양시 실크를 첨가하여 또다른 연골 마커인자인 제10형 콜라겐 유전자의 발현량을 PCR을 이용하여 분석하였다. 유전자의 발현수준을 분석하기 위하여 배양한 세포로부터 전체 RNA를 Trizol(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 제조사에서 제공한 방법에 따라 분리하였다. cDNA 합성과 PCR은 amfiRivert 1-step RT-PCR kit (GenDEPOT, USA)를 사용하여 수행하였다. PCR을 위한 프라이머는 다음과 같다. 제2형 콜라겐(sense, 5'-TGGTCTTGGTG GAACTTTGC TGC-3'; antisense, 5'-AGGTTCA CCAGTTCACCAGGATT-3'), 제10형 콜라겐(sense, 5'-TACCACGTGCATGTGAAAGGGACT-3'; antisense, 5'-TGA AGCCTGATCCAGGTAGCCTTT-3'), GAPDH (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase; sense, 5'-AGCCGCATCTCTTTTGCCTGTC-3'; antisense, 5'-TCATATTTGGCAGGTTTCT-3'). PCR반응은 PCR기기(PCR thermal cycler, Takara, Japan)를 이용하여 94°C에서 4분 predenaturation 후, 94°C에서 60초 동안 denaturation, 50°C에서 60초 동안 annealing, 72°C에서 60 초 동안 extension 반응을 35 cycle 반복 실시하였고, 마지막으로 72°C에서 10분 동안 최종 extension하였다. PCR반응으로 생성된 산물은 1% 아가로스겔을 이용하여 전기영동하고 UV하에서 관찰하였다. 얻어진 이미지는 Image J program을 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 연골세포 분리 및 배양조건 확립

연골세포는 분리와 배양은 상피세포와 달리 매우 복잡한 과정을 거친다. 코뼈로부터 연골 세포를 분리하고 세포배양접시에서 여러 세대에 걸쳐 배양하고 그 형태를 관찰하였다(Fig. 1). 연골세포의 성장속도는 상피세포와 달리 2배 이상 늦은 성장을 보였다. 즉 1×10^5 cell/plate로 세포 배양시, 배양접시에 세포가 가득찰 때까지 걸리는

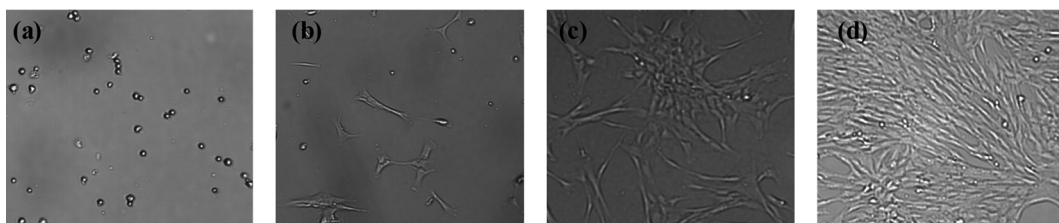


Fig. 1. Chondrocyte growing and morphology. (a) culture day1; (b) culture day4; (c) culture day7; (d) culture day10.

연골 재생에 대한 실크 단백질의 가능성

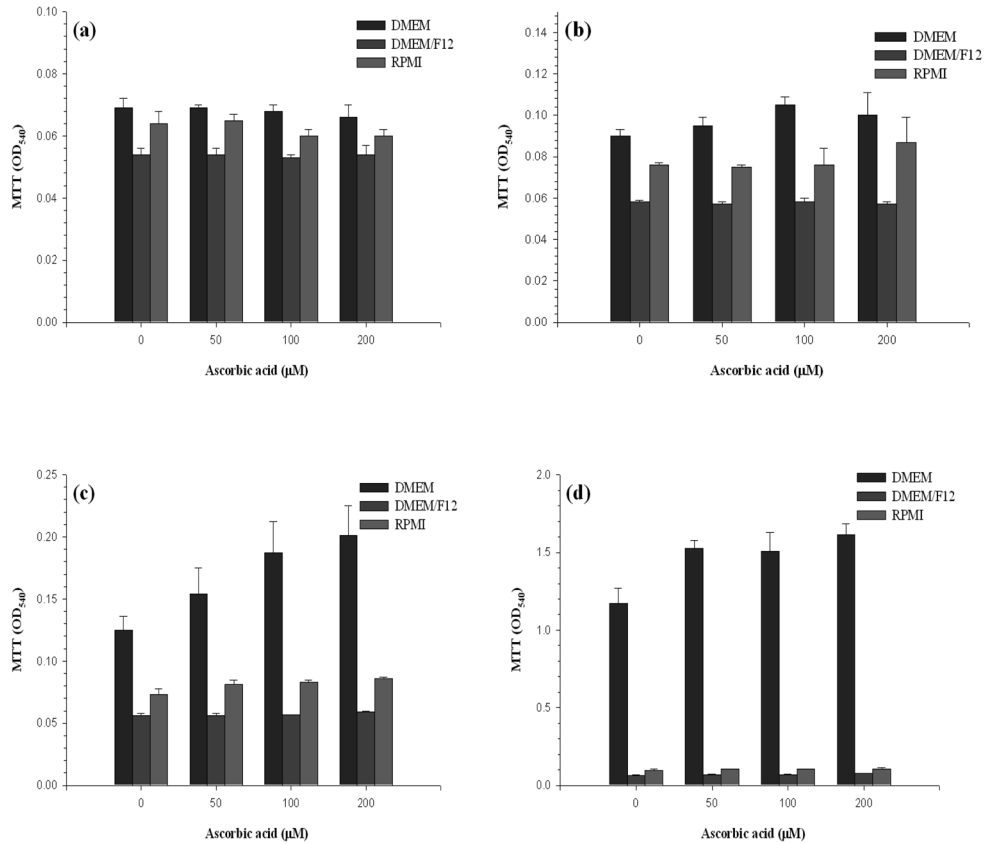


Fig. 2. Optimal culture conditions were tested at different media. (a) culture day1; (b) culture day4; (c) culture day7; (d) culture day10.

기간이 상피세포는 3~4일 걸리는데 비해 연골세포는 10일 가까이 소요됐다(data not shown). 형태적인 변화는 4일째되어 세포가 부착되어 뻗어나가기 시작하였으며 7일째 군집을 형성하는 것을 확인할 수 있었다.

연골세포의 최적배양조건을 확립하기 위하여 10% FBS가 함유된 DMEM, DMEM/F12, RPMI 등의 3종류의 배지를 이용하여 ascorbic acid의 농도를 달리하여 10일 동안 연골세포를 배양하고 증식 정도를 관찰하였다. 그 결과 DMEM배지에서 10% FBS와 200 μM의 ascorbic acid가 첨가된 조건에서 가장 잘 증식하였으나 ascorbic acid의 농도가 100 μM나 200 μM 사이의 유의차가 없었으므로, 100 μM ascorbic acid와 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 최적 배양조건으로 선정하였다(Fig. 2). 이 조건에서 10일 동안 연골세포 배양 시 15배 이상 증식되었으나, 다른 조건의 배지에서는 10일 배양 시 0.5배 수준으로 증식되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 연골은 다른 조직과는 달리 세포가 차지하는 비중보다는 기질이 차지하는 비중이 아주 높아 2차원 배양시에는 연골로서의 기능을 거의 수행하지 않는다. 따라서 연골세포의 3차원 배양법을 확립하기 위해 2차원배양에서 세포수를 증가시킨 다

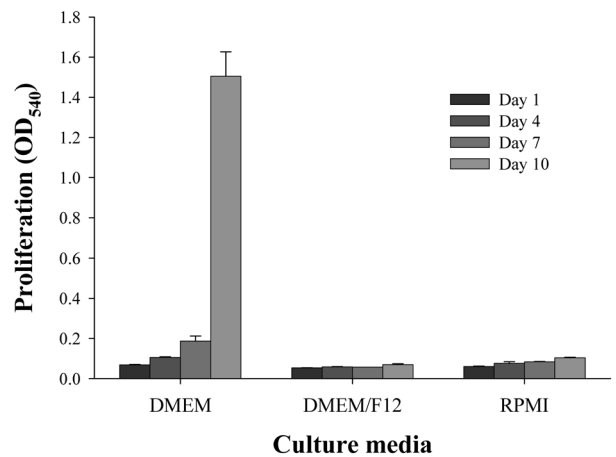


Fig. 3. Proliferation of chondrocytes.

음 16,000~25,000 cells/ml 정도의 세포들을 원심분리를 이용하여 pellet을 만들었다.

여기에 연골 조직으로 분화하기 위한 분화유도물질을 첨가한 분화배지를 2~3일 간격으로 교체해주며 3차원 배양 방법을 확립하였다.

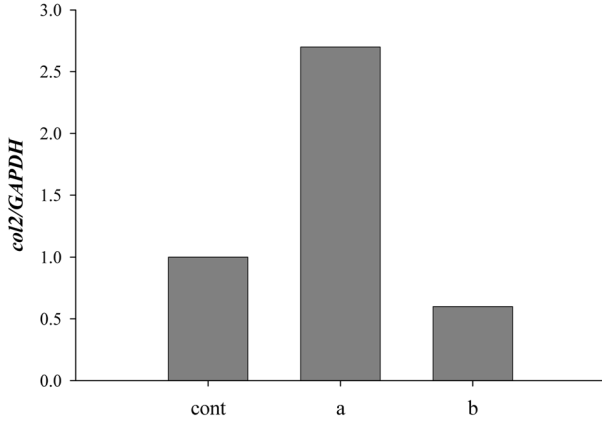


Fig. 4. Effect of silk fibroin on the chondrogenesis. Effect on the expression of *col2*, gene related chondrogenesis, of silk fibroin. (a) non-autoclaved silk fibroin; (b) autoclaved silk fibroin.

2. 실크단백질이 연골세포에 미치는 영향 분석

실크 단백질 중 피브로인만을 얻기위하여 세리신을 제거하기위한 정련을 실시하였다. 정련된 실크정련수를 염화칼슘-에탄올 수용액을 이용하여 용해시켜 실크 피브로인 단백질을 제조하였다. 제조된 실크 피브로인의 농도는 약 1% 정도였으며, 연골세포의 2차원 배양과 3차원 배양 시 모두 첨가하여 연골세포 특이적인 제2형 콜라겐과 제10형 콜라겐의 유전자 발현량을 조사하였다. 제2형 콜라겐의 발현량을 조사하기위하여 실크 용액은 멸균한 것 (autoclaved silk)과 멸균하지 않은 것(non-autoclaved silk)을 시료로 사용하여 3차원 배양하고 14일 후 세포를 회수하여 RNA를 얻었다. cDNA를 합성하고 GAPDH와 제2형 콜라겐의 PCR을 수행하여 GAPDH의 발현량에 상대적 제2형 콜라겐의 발현량을 계산하였다. 그 결과 대조군에 비해 2.8배 정도 제2형 콜라겐의 발현을 증가시켰으나, 멸균 후 연골세포에 첨가한 실크는 활성을 보이지 않았다(Fig. 4). 멸균된 실크의 물리적 변화를 확인하기위하여 DSC와 FT-IR을 측정하였으나 특징적인 구조적 변화는 관찰되지 않았다(data not shown). 그러나 연골세포 특이적인 제2형 콜라겐의 발현에 영향을 미치는 실크 단백질의 어떤 특별한 활성 인자가 멸균을 통해서 활성을 잃어버렸을 것이라 예상되어진다. 또한 제10형 콜라겐의 영향을 2차원 배양과 3차원 배양을 통하여 조사하였다. 제2형 콜라겐과 마찬가지로 PCR을 통하여 분석하였으며, 그 결과 2차원 배양에서는 대조군에 비하여 약 1.2배, 3차원 배양에서는 1.8배정도 그 발현량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 제2형 콜라겐은 관절연골의 기질의 50~70%를 차지하고 있으며(Demoor et al. 1988), 제10형 콜라겐 역시 연골의 중요한 구성분 중의 하나이다. 따라서

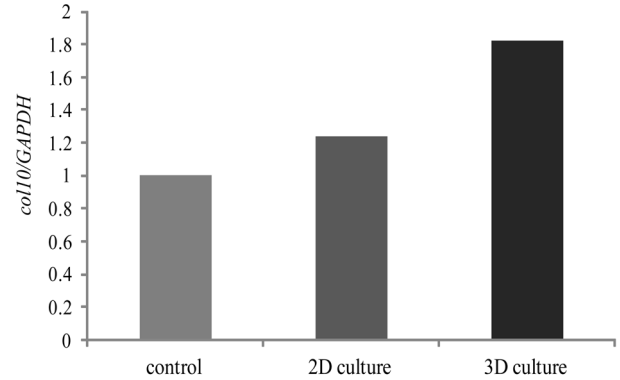


Fig. 5. The *col10* expression levels increased by silk fibroin.

본 연구에서 실크 피브로인 단백질이 제2형 콜라겐과 제10형 콜라겐의 발현량을 증가시킬 수 있다는 것은 실크 단백질이 연골재생에 효과적인 소재로서의 이용 가능성을 제시해 준다. 향후 연골재생과 관련된 실크 단백질의 효과를 좀 더 체계적으로 연구하고자 한다.

적 요

최근 다양한 생체재료를 이용하여 연골재생과 관련한 많은 연구가 진행되고 있다. 실크단백질은 생체적합성이 뛰어나며, 우수한 기계적 강도를 가지고 있는 천연 고분자 물질로서 최근 생체재료로 사용하기위한 연구가 세계적으로 많이 이루어지고 있다. 본 연구는 실크단백질이 연골재생에 효과가 있는지를 확인하기위하여 수행되었다. 우리는 연골세포를 코뼈로부터 분리하고, 3종류의 배지(DMEM, DMEM/F12, RPMI)와 서로 다른 농도의 ascorbic acid를 사용하여 최적 배양조건을 확립하였다. 그 결과 우리가 분리한 연골세포는 10% FBS와 100 μM ascorbic acid가 함유된 DMEM배지에서 가장 잘 성장하였다. 연골에 대한 실크의 영향을 관찰하기위해서, 실크 피브로인 용액을 제작하고 이를 멸균한것과 멸균하지 않은 것으로 구분하여 연골세포 배양 시 첨가하여 연골분화에 대한 마커인자인 제2형 콜라겐의 발현량을 측정하였다. 멸균하지 않은 실크 피브로인 첨가시 제2형 콜라겐의 발현량이 2.7배 증가하였으나, 멸균된 실크 피브로인의 첨가는 제2형 콜라겐의 발현량을 오히려 감소시켰다. 또한 실크 피브로인은 제10형 콜라겐의 발현을 증가시키는 것을 확인하였다. 이 효과는 특히 연골세포를 3차원 배양할 때 더 컸다. 본 연구결과를 통하여 우리는 연골을 재생하는데 있어서 실크 단백질을 가능성을 보았으며, 향후 연구에서 연골재생과 실크의 관계를 좀 더 정밀하게 파악하고자 한다.

감사의 글

본 연구는 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업 (No. PJ906973032012)의 지원에 의해 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Coelho CND, Kosher RA (1991) A gradient of gap junctional communication along the anterior±posterior axis of the developing chick limb bud. *Dev Biol* **148**, 529~535.
- Demoor FM, Redini F, Boittin M (1988) Expression of decorin and biglycan by rabbit articular chondrocytes: Effects of cytokines and phenotypic modulation. *Biochem Biophys Acta* **1398**, 179~191.
- Gordana V. N. Freshney R. L (2006) Culture of cells for Tissue Engineering. a John wiley & Sons, Inc., publication pp 83~96.
- Kim J, Kim CH, Park CH, Seo JN, Kweon HY, Kang SW, Lee KG (2010) Comparison of methods for the repair of acute tympanic membrane perforations: Silk patch vs. pater patch. *Wound Repair and Regeneration* **18**, 132~138.
- 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.
- Lee JY, Lee JS, Son YS (2006) Morphological and histological characteristics for various types of cartilages. *Tissue Eng Regen Medi* **3**, 404~410.
- Long F, Linscnmayer TF (1995) Tissue-specific regulation of the type X collagen gene: Analyses by in vivo footprinting and transfection with a proximal promoter region. *I Bid Chenz* **270**, 31310~31314.
- 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, Zhu H (2004) The preparation of insoluble fibroin films induced by degummed fibroin or fibroin microspheres. *J Mater Sci Mater Med* **15**, 1193~1197.
- Mankin HJ (1982) The response of articular cartilage to mechanical injury. *J. Bone Joint Surg Am* **64**, 460~466.
- Moy RL, Lee A, Zalka A (1991) Commonly used suture materials in skin surgery. *Am Fam Physician* **44**, 2123~2128.
- Reddi AH (1995) Cartilage morphogenesis: Role of bone and cartilage morphogenetic proteins, homeobox genes and extracellular matrix. *Matrix* **14**, 599~606.
- Sofia S, McCarthy MB, Gronowicz G, Kaplan DL (2001) Functionalized silk-based biomaterials for bone formation. *J Biomed Mater Res* **54**, 139~148.
- Strirpe NS, Goetinck PF (1989) Gene regulation during cartilage differentiation: temporal and spatial expression of link protein and cartilage matrix protein in the developing limb. *Development* **107**, 23~33.