

작잠 실크 피브로인에 의한 *in vitro* 상처 회복 효과 및 에탄올 처리에 따른 작잠 실크 피브로인 스폰지의 구조 전이

이광길¹ · 조유영¹ · 여주홍¹ · 이희삼¹ · 김기영¹ · 김현복¹ · 김안숙² · 김성곤² · 권해용^{1*}
¹농촌진흥청 국립농업과학원 잠사양봉소재과, ²강릉원주대학교 치과대학

Conformational transition of regenerated *Antheraea pernyi* silk fibroin sponge treated with aqueous ethanol solution and *in vitro* wound healing effect of wild silk fibroin solution

Kwang-Gill Lee¹, You-Young Jo¹, Joo-Hong Yeo¹, Heui-Sam Lee¹, Kee-Young Kim¹, Hyun-bok Kim¹,
An-Sook Kim², Seong-Gon Kim² and HaeYong Kweon^{1*}

¹Sericultural & Apicultural Materials Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-853, Korea

²Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Gangneung Wonju National University

(Received March 31, 2014, Accepted May 19, 2014)

ABSTRACT

Regenerated *Antheraea pernyi* silk sponge was prepared using calcium nitrate 4 hydrate melt and examined the conformational changes treated with aqueous ethanol solution. The conformation of silk sponges was changed from random coil structure to β -sheet and α -helix conformation with low ethanol concentration (50 ~ 70%). On the other hand, that of silk sponges with 80% ethanol treatment showed β -sheet (700 cm⁻¹), α -helix (625 cm⁻¹), and random coil (660 cm⁻¹) specific peaks. Wound healing effect *in vitro* was observed by cytoslective wound healing kit. Therefore, regenerated *Antheraea pernyi* silk sponges might be used as promising wound dressing materials.

Key words : *Antheraea pernyi*, Regenerated silk sponges, Conformation, Wound healing

서 론

대표적인 야잠의 한 종류인 작잠(*Antheraea pernyi*)은 섬유로 사용될 수 있는 우수한 누에고치를 짓는 것으로 알려져 있다. 세포배양(Luan et al. 2006), 조직공학용 지지체(Zhao et al. 2011) 등 생체에 적용하기에 적합한 특성을 가지고 있는 것으로 밝혀지고 있는 작잠 실크단백질은 새로운 생체재료로서의 응용 가능성에 주목을 받고 있다.

작잠 실크피브로인은 포유동물의 세포 인식 부위로 알려진 arg-gly-asp tripeptide sequence를 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Ruoslahti and Pierschbacher 1986, Minoura et al. 1995). 생체조직공학용 scaffold로서 작잠 실크피브

로인의 응용 가능성에 대한 높은 기대에도 불구하고 작잠 견피브로인을 이용한 소재 개발 연구 보고는 그다지 많지 않다. 그 이유는, 작잠 견피브로인의 구조가 화학적으로 안정되어 있기 때문에(Kweon et al. 1998) 일반적으로 가잠 견피브로인의 용해에 사용되는 염이나 각종 유기용제에 용해되지 않는 특성이 있다. 현재까지 작잠 견피브로인에 대한 대부분의 연구는 작잠의 후부 견사선에서 추출한 피브로인을 소재로 한 기초적인 연구에 머물고 있다(Tsukada 1986).

최근의 연구에 의하면, Tsukada et al.(1994)는 LiSCN에 작잠견사를 녹여 얻은 재생 작잠 견피브로인 필름과 후부 견사선에서 추출한 작잠피브로인 필름의 conformation, 동점탄성, 분자량 등을 분석한 결과 재생 작잠 실크피브

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

로인의 분자량이 후부견사선 피브로인의 분자량보다 작았으나 구조 및 열 특성 등에는 큰 차이가 없다고 하였다. Kweon and Park(2001)은 질산칼슘($\text{Ca}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)에 작잠견사를 녹여 제조한 재생 작잠 실크피브로인 필름의 구조특성이 견사선에서 추출한 작잠 실크피브로인과 유사함을 보고하였다. 또한 염화아연과 질산아연을 사용한 작잠견사의 용해조건을 구명하고 제조한 재생 작잠 실크피브로인 분말은 β -sheet 구조임을 밝혔다(Kweon et al. 2002, Kweon et al. 2003).

본 연구에서는 작잠 실크피브로인을 이용한 기초적인 연구를 기반으로 작잠 실크피브로인을 이용한 응용 소재 개발을 위하여 재생 작잠 실크피브로인 스펀지를 제조하고, 작잠 실크피브로인의 구조 전이에 미치는 에탄올의 효과를 살펴보았다. 또한 재생 작잠 실크피브로인의 *in vitro* 상처회복 효과에 대하여 살펴보았다.

재료 및 방법

1. 재료

작잠 누에고치는 수원 소재 농촌진흥청 국립농업과학원에서 사육한 작잠(*Antheraea pernyi*) 누에고치를 수확하여 사용하였다. 누에고치의 정련은 알칼리 정련법에 의하여 수행하였다(Shin et al. 2012). 간단하게 기술하면, 정련 욕비 1 : 50 의 조건에서 Na_2CO_3 2.5 g/l 용액으로 95 ~ 100°C 에서 30분간 처리한 후 40°C의 물로 세척하는 과정을 3 회 반복 수행하였다. 실험에 사용한 작잠 누에고치의 연감율은 15.9%였다.

2. 작잠 누에고치의 용해 및 재생 작잠 실크피브로인 제조

정련한 작잠 누에고치는 Kweon and Park(2001)의 방법에 따라 질산칼슘 용융액을 사용하여 용해하였다. 간단하게 기술하면, 작잠 누에고치 3 g을 $\text{Ca}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 172 g의 용융액에 넣어 3시간 동안 정해진 온도에서 용해하였다. 용해된 작잠 실크단백질로부터 질산칼슘을 제거하기 위하여 3일간 투석한 후 염도와 이온전도도를 측정하여 탈염이 완료되었음을 확인하였다. 작잠 실크단백질의 용해도 측정은 용해 처리 전 작잠 누에고치의 무게(W_1)와 처리 후 작잠 누에고치의 무게(W_2)를 측정하여 다음 식에 의하여 작잠 누에고치의 용해도를 계산하였다.

$$\text{용해도}(\%) = \frac{\text{처리전 작잠누에고치의무게} - \text{처리후 작잠누에고치의무게}}{\text{처리전 작잠누에고치의무게}} \times 100$$

작잠 실크피브로인 용액으로부터 용해에 사용한 염을 제

거하기 위하여 투석한 후 침전물과 상등액을 분리하였다. 작잠 실크피브로인의 상등액은 동결건조하였다. 동결건조하여 얻은 작잠 실크 스펀지는 에탄올 처리는 농도를 50, 70, 80, 100%(v/v) 수용액에 일정 시간동안 침지 후 건조하여 보관하였다.

3. 적외선 분광분석

작잠 피브로인 침전물과 상등액 동결건조물의 구조를 확인하기 위하여 적외선분광분석기(FT-IR spectrometer spectrum 100, Perkin Elmer, USA)를 이용하여 KBr법에 의하여 적외선 분광분석을 행하였다.

4. *in vitro* 상처회복효과 실험

작잠 실크 피브로인에 의한 상처회복 효과를 관찰하기 위하여 CytoSelect 24-well Wound Healing Assay(CBA-120, Cell Biolabs Inc., USA)를 활용하였다. 젊은 여성(28세)으로부터 분리한 구강 피부 조직에서 분리한 잇몸섬유아세포(gingival fibroblast primary cell)를 분리하여 DMEM 배지(Gibco BRL, USA)를 이용하여 100 U/ml penicillin, 100 ug/ml streptomycin을 포함한 배지에서 37°C, 5% CO_2 환경조건으로 배양한 6번째로 계대배양한 세포를 사용하였다. *In vitro* 상처 회복 효과를 측정하기 위하여 작잠 실크피브로인을 1 ~ 100 μL 농도별로 첨가하여 24시간 동안 배양한 후 DAPI 염색을 하여 형광현미경으로 세포의 이동을 촬영하여 매뉴얼에 따라 상처회복율과 세포이동 속도를 계산하였다.

결과 및 고찰

1. 작잠 실크피브로인의 용해

누에고치를 구성하고 있는 피브로인은 결정성이 높은 섬유상 단백질로서 분자간 소수성 결합력이 매우 높아 일반적인 물이나 유기 용매에 용해되지 않는 특징이 있다. 특히 작잠 누에고치는 젠티식산(gentisic acid)과 실크단백질이 결합되어 있어(Tao et al. 1993) 단백질의 고차 구조를 파괴하여 단백질 분자간 결합력을 약화시키는 물질로 사용되는 차오트로픽염은 실크 단백질의 용해제로 검토되고 있다(Tsukada et al. 1994, Kweon and Park 2001, Kweon et al. 2002, Kweon et al. 2003). 작잠 피브로인은

Table 1. Solubility of *Antheraea pernyi* cocoon in calcium nitrate 4 hydrate melt

Sample	Ap-1	Ap-2	Ap-3
Temperature (°C)	90	100	120
Solubility (%)	91	99	100

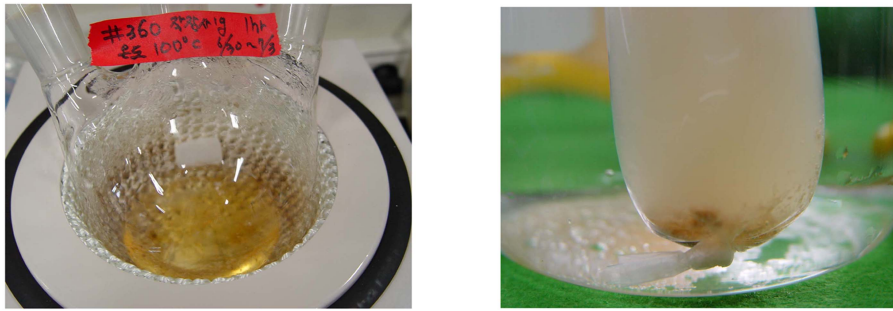


Fig. 1. Photographs of dissolution and dialysis process for *Antheraea pernyi* silk fibroin.

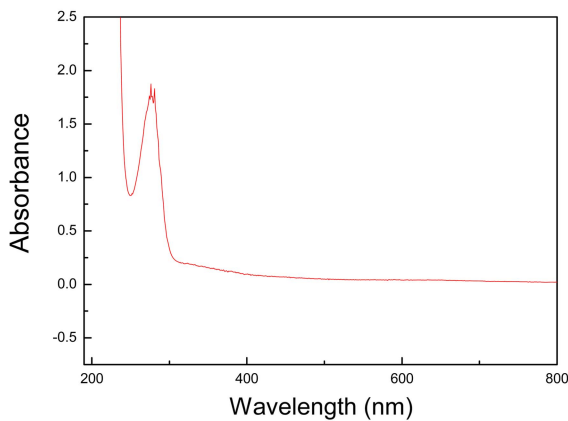


Fig. 2. Typical ultraviolet spectrum of regenerated *Antheraea pernyi* silk fibroin.

알라닌이 많은 화학적 특성을 가지고 있으며(Kweon and Park 1994) 가잠 피브로인에 비하여 화학적으로 매우 안정적인 것으로 보고되어 있다(Kweon et al. 1998). 질산칼슘·4수화물 용액의 온도에 따른 용해도를 측정하여 표 1에 나타내었다. 작잠 누에고치는 용해온도 90°C에서는 90%의 용해도를 나타내었으나 100°C 이상에서는 99% 이상 용해되는 것으로 관찰되었다. 작잠 피브로인의 용해는 질산수화물로부터 방출된 질산에 의한 가수분해 가능성도 있다고 생각된다(Małecka et al. 2003, Lee et al. 2013).

작잠 실크피브로인 질산칼슘 용액으로부터 작잠 실크피브로인 분자간의 결합력을 약화시키는 데 사용된 질산칼슘을 제거하기 위하여 투석을 실시하였다. 작잠 실크피브로인은 투석을 하는 동안 침전이 발생하였다(그림 1). 작잠 실크피브로인의 침전은 피브로인 분자간격을 벌리는 데 사용된 질산칼슘이 빠져나가면서 발생한 것으로 생각된다.

2. 작잠 실크피브로인 용액의 자외선분광곡선

일반적으로 단백질은 근자외선(250 ~ 280 nm) 영역에서 강한 흡수대를 나타내는 것으로 알려져 있다. 자외선 영역의 단백질의 흡수는 방향족 아미노산인 tryptophan, tyrosine, phenylalanine 등의 $\pi \rightarrow \pi^*$ 전자 전이에 의하여

나타난다. 작잠 실크피브로인의 자외선 분광곡선을 그림 2에 나타내었다. 자외선 분광 분석 결과 280 nm 부근에서 최대 흡수 피크를 보였다. 이 흡수대는 작잠 실크피브로인에 포함되어 있는 tyrosine 잔기와 tryptophan 잔기 등에 기인된 것으로 판단된다.

3. 작잠 실크피브로인의 적외선 분광 특성

적외선 분광 분석은 실크단백질의 2차 구조를 잘 반영하는 특성이 있어 구조 분석에 널리 활용되고 있다. 작잠 실크 스펀지의 적외선 분광 곡선을 그림 3에 나타내었다. 작잠 실크 용액의 투석 중에 발생한 침전물의 적외선 분광곡선(그림 3(a))은 1240, 965, 700 cm^{-1} 의 흡수대와 620 cm^{-1} 부근의 흡수대에서 강한 특성 피크가 관찰되었다. 반면에 투석 중 상등액을 동결건조한 스펀지(그림 3(b))는 660 cm^{-1} 에서 흡수대를 나타내었다. 저 농도의 알코올 수용액(50%, 70%)으로 처리한 시료(그림 3(c), (d))는 1240, 965, 700 cm^{-1} 의 흡수대와 620 cm^{-1} 부근의 흡수대에서 강한 특성 피크가 관찰되었다. 반면에 고농도의 알코올 수용액(80%)로 처리한 작잠 스펀지(그림 3(e))는 1240, 965, 700 cm^{-1} 의 흡수대와 620 cm^{-1} 부근의 흡수대뿐 아니라 660 cm^{-1} 에서 흡수대를 나타내었다.

작잠 피브로인의 적외선 분광 곡선에 나타나는 2차 구조상의 특성 피크는 β -sheet 구조의 특성을 나타내는 1240, 965, 700 cm^{-1} 의 흡수대, α -helix 구조 특성을 나타내는 1270, 895, 625 cm^{-1} 에서 흡수대, 그리고 660 cm^{-1} 에서 random coil 구조에 기인하는 흡수대를 나타낸다(Kweon et al, 2000). 따라서, 작잠 침전물을 β -sheet 구조(1240, 965, 700 cm^{-1})와 α -helix 구조(625 cm^{-1})의 특성을 나타내었다. 반면 상등액 스펀지 시료는 random coil(660 cm^{-1}) 구조를 나타내었다. 알코올 처리에 의하여 작잠 실크 스펀지의 구조 전이가 발생하여 저농도(50 ~ 70%) 알코올 처리군은 β -sheet 구조(1240, 965, 700 cm^{-1})와 α -helix 구조(625 cm^{-1})의 특성을 나타낸 반면, 고농도(80%) 에탄올 처리군은 β -sheet 구조(700 cm^{-1}), α -helix 구조(625 cm^{-1}), 그리고 random coil (660 cm^{-1}) 구조가 공존하는 것으로 나타났다.

작잠 실크 피브로인에 의한 *in vitro* 상처 회복 효과 및 에탄올 처리에 따른 작잠 실크 피브로인 스폰지의 구조 전이

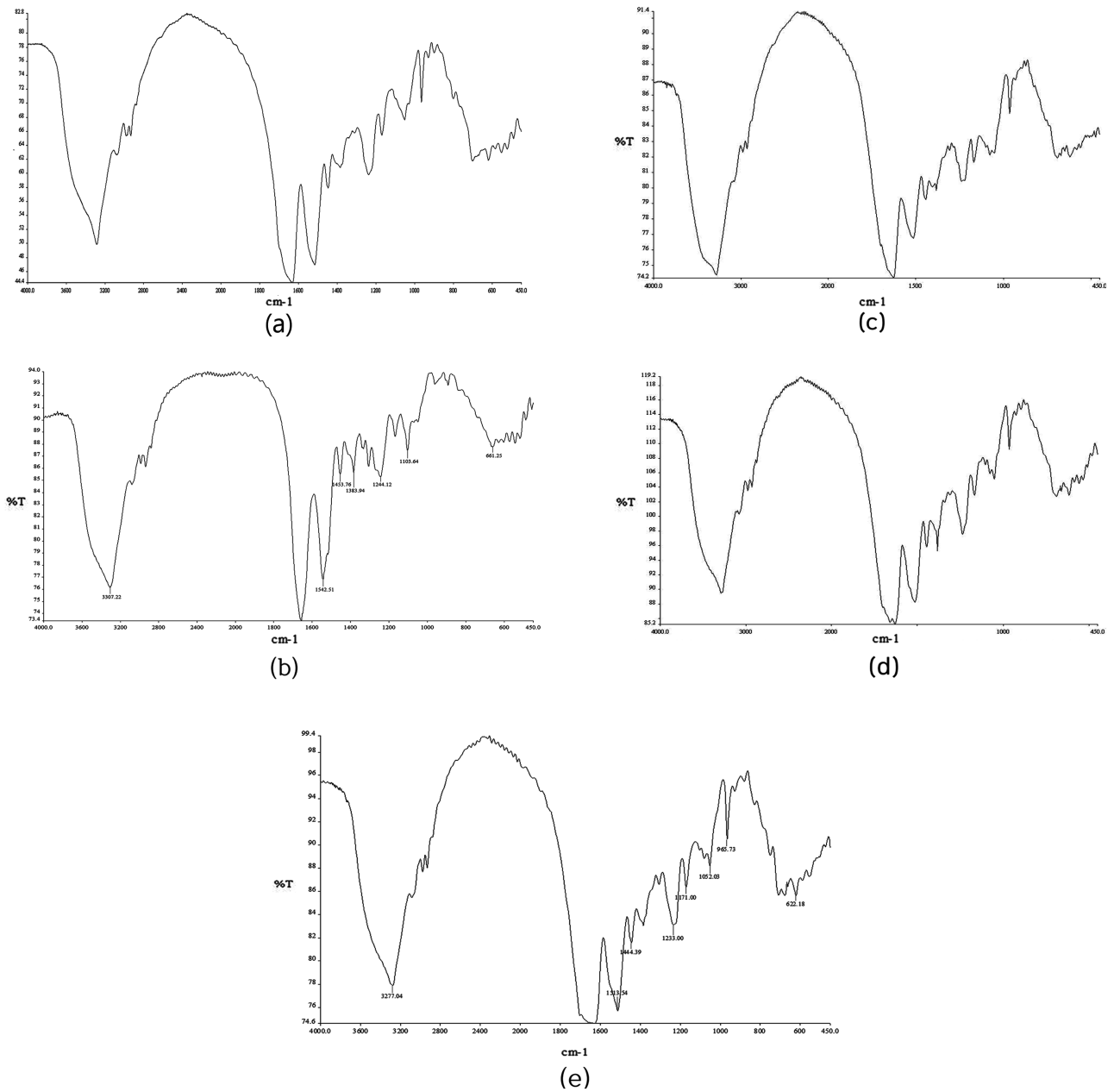


Fig. 3. FT-IR spectrum of regenerated *Antheraea pernyi* silk fibroin; (a) precipitated powder, (b) freeze-dried sponge, (c) freeze-dried sponge treated with 50% aqueous ethanol solution, (d) freeze-dried sponge treated with 70% aqueous ethanol solution, and (e) freeze-dried sponge treated with 80% aqueous ethanol solution.

적외선 분광분석법을 이용하여 메탄올 수용액의 농도에 따른 재생 작잠 필름의 구조 전이에 관하여 연구한 Kweon and Park(1999)과 Kweon et al.(2000)의 보고에 의하면, 메탄올 농도 40~80% 수용액 처리에 의하여 α -helix 구조의 특성 피크인 896 cm^{-1} 의 흡수대가 사라지고 β -sheet 구조의 특성 피크인 965 cm^{-1} 의 흡수대가 나타난다고 하였으나, 100% 메탄올 처리에 의해서는 이러한 구조 전이가 유발되지 않는다고 보고하였다. 에탄올 처리에 의한 재생

작잠 실크 필름의 구조전이에 대하여 보고한 Woo et al.(2000)에 의하면, 100% 에탄올은 구조 전이를 유발시키지 못하였으며 80% 에탄올에 의하여도 거의 구조전이가 발생하지 않는 것으로 보고하고 있다. 저농도(50~70%) 알코올 처리에 의하여 작잠 실크 단백질이 β -sheet 구조와 α -helix 구조의 특성을 나타낸 반면 고농도 에탄올 처리군에서는 β -sheet, α -helix 및 random coil 구조가 공존하는 것으로 나타난 이번 결과는 문헌에서 고찰한 결과

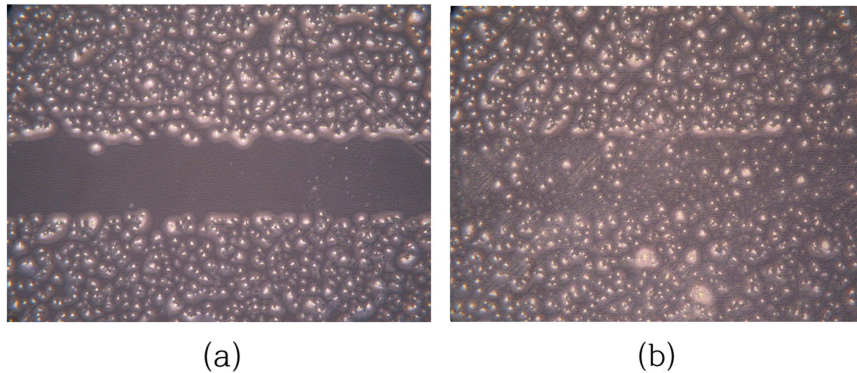


Fig. 4. Light microscope images of wound closure *in vitro* using confluent monolayer of gingival fibroblast primary cell; (a) Wound area immediately after wounding and (b) after 24 hr incubation, DMEM with 100 µl *Antheraea pernyi* silk fibroin.

Table 2. Wound healing effect of regenerated *Antheraea pernyi* silk fibroin

silk fibron (µl)	24 hr	48 hr	72 hr
1	5	10	10
10	10	50	75
100	20	50	100

와 일치하는 것으로 나타났다. 작잠 실크피브로인의 알코올에 의한 결정화 정도의 차이는 알코올의 침투 및 건조 과정에서 발생하는 구조전이와 관련이 있는 것으로 생각된다.

4. 작잠 실크피브로인에 의한 상처회복 효과

상처회복 효과를 확인하기 위하여 *in vitro*에서는 세포의 이동으로 그 결과를 검증할 수 있다(Ranzato et al. 2009). 그림 4(b)는 작잠 실크피브로인의 첨가량에 따른 세포 이동 및 증식 효과를 확인하기 위하여 28세 여성으로부터 분리한 잇몸섬유아세포(gingival fibroblast primary cell)를 상처회복시험용 장치(CytoSelect 24-well wound healing assay)에 24시간 배양한 후 작잠 실크피브로인을 첨가하여 24시간 더 배양한 결과를 나타낸 것이다. 작잠 실크피브로인의 첨가량이 증가함에 따라 세포의 이동 및 증식량이 많아졌다.(data not shown) 따라서, 작잠 실크피브로인의 농도에 따른 세포 이동 현상을 관찰하여 작잠 실크피브로인에 의한 상처회복을 나타내었다(표 2). 저농도(1 µl)의 작잠 실크피브로인보다는 고농도(100 µl)의 작잠 실크피브로인 처리에 따라 상처회복률이 높게 나타남을 확인할 수 있었다. 이는 작잠 실크피브로인의 농도와 세포 배양 시간이 증가함에 따라 세포가 빠르게 이동한 결과로 해석된다. 세포의 이동 속도를 작잠 실크피브로인의 처리 농도별로 계산한 결과 작잠 실크피브로인에 의한 세

포이동속도는 3.68 µm/hr(1 µl 처리군), 12.5 µm/hr(10 µl 처리군), 12.5 µm/hr(100 µl 처리군)로 나타났다.

적 요

작잠 누에고치를 정련한 후 질산칼슘4수화물의 용융액을 사용하여 재생 작잠 실크피브로인 스펀지를 제조하였다. 작잠 실크피브로인은 280 nm에서 tyrosine 잔기 등에 기인한 흡광대를 나타내었다. 작잠 실크피브로인 스펀지를 에탄올 농도별로 처리한 후 구조 전이를 관찰한 결과 80% 에탄올 처리시에는 β-sheet 구조(700 cm⁻¹), α-helix 구조(625 cm⁻¹), 그리고 random coil (660 cm⁻¹) 구조가 공존하는 것으로 나타났다. 또한 작잠 실크피브로인을 이용한 *in vitro* 상처회복실험 결과 실크피브로인의 첨가에 의하여 상처회복 효과가 인정되었다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(과제번호: 010006)의 지원에 의해 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

References

- Kweon HY, Park YH (1994) Structural characteristics and physical properties of wild silk fibers; *Antheraea pernyi* and *Antheraea yamamai*. Korean J Seric Sci **36**(2), 138~146.
- Kweon HY, Lee KG, Lee YW, Yeo JH, Um IC (1998) Hydrolysis behaviour of *Antheraea pernyi* silk fiber treated with HCl. Korean J Seric Sci **40**(2), 163~168.
- Kweon HY, Park YH (1999) Structural and conformational changes of regenerated *Antheraea pernyi* silk fibroin films treated with methanol solution. J Appl Polym Sci **73**, 2887~2894.

- Kweon HY, Um IC, Park YH (2000) Thermal behavior of regenerated *Antheraea pernyi* silk fibroin treated with aqueous methanol. *Polymer* **41**, 7361~7367.
- Kweon HY, Park YH (2001) Dissolution and characterization of regenerated *Antheraea pernyi* silk fibroin. *J Appl Polym Sci* **82**, 750~758.
- Kweon HY, Lee KG, Woo SO, Park YH (2002) Dissolution and characteristics of *Antheraea pernyi* silk fibroin regenerated from zinc chloride solution. *Korean J Seric Sci* **44**, 87~92.
- Kweon HY, Lee KG, Yeo JH, Park YH (2003) Dissolution and characteristics of *Antheraea pernyi* silk fiber and structure of regenerated fibroin from zinc nitrate solution. *Korean J Seric Sci* **45**(2), 121~125.
- Lee KG, Jo YY, Yeo JH, Lee HS, Kim KY, Park KY, Kweon HY (2013) Dissolution of *Antheraea pernyi* raw silk with calcium nitrate ethanol solution. *J Seric Entomol Sci* **51**(1), 15~19.
- Luan XY, Wang Y, Duan X, Duan QY, Li MZ, Lu SZ, Zhang HX, Zang XG (2006) Attachment and growth of human bone marrow derived mesenchymal stem cells on regenerated *Antheraea pernyi* silk fibroin films. *Biomed Mater* **1**(4), 181~187.
- Maecka B, Gajerski R, Maecki A, Wierzbicka M, Olszewski P (2003) Mass spectral studies on the mechanism of thermal decomposition of $Zn(NO_3)_2 \cdot nH_2O$. *Thermochim Acta* **404**, 125~132.
- Minoura N, Aiba SI, Higuchi M, Gotoh Y, Tsukada M, Imai Y (1995) Attachment and growth of fibroblast cells on silk fibroin. *Biochem Biophys Res Commun* **208**(2), 511~516.
- Ranzato E, Balbo V, Boccafosci F, Mazzucco I, Burlando B (2009) Scratch wound closure of C2C12 mouse myoblasts is enhanced by human platelet lysate. *Cell Biol International* **33**, 911~917.
- Ruoslahti E, Pierschbacher MD (1986) Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal. *Cell* **44**, 517~518.
- Shin BS, Joen JY, Kim JH (2012) Cocoon characteristics of *Antheraea pernyi* silkworm reared in Korean oak field. *Int J Ind Entomol* **25**(2), 205~208.
- Tao J, Jehan H, Jing W (1993) Studies on the chromogen of the tussah cocoon layer and its chromophoric mechanism. *Sci China Ser B-Chem* **36**(9), 1046~1051.
- Tsukada M (1986) Structural changes induced in tussah silk (*Antheraea pernyi*) fibroin films by immersion in methanol. *J Polym Sci Pt B-Polym Phys* **24**, 1227~1232.
- Tsukada M, Freddi G, Gotoh Y, Kasai N (1994) Physical and chemical properties of tussah silk fibroin films. *J Polym Sci Pt B-Polym Phys* **32**, 1407~1412.
- Woo SO, Kweon HY, Um IC, Park YH (2000) Structural characteristics of regenerated *Antheraea pernyi* silk fibroin treated with ethanol. *Korean J Seric Sci* **42**(2) 114~119.
- Zhao CX, Wu XF, Zhang QA, Yang SQ, Li MZ (2011) Enzymatic degradation of *Antheraea pernyi* silk fibroin 3D scaffolds and fibers. *Int J Biol Macromol* **48**(2), 249~255.