

PLGA/헤스페리딘 함량별 필름에서 염증 완화 효과: *In vitro*, *In vivo* 결과

송정은 · 심초록 · 이유정 · 고현아 · 윤 현 · 이동원 · 강길선[†]

전북대학교 BIN 융합공학과, 고분자나노공학과

(2012년 10월 22일 접수, 2013년 1월 5일 수정, 2013년 1월 6일 채택)

Effect of Inflammatory Responses to PLGA Films Incorporated Hesperidin: *In vitro* and *In vivo* Results

Jeong Eun Song, Cho Rok Shim, Yujung Lee, Hyun Ah Ko, Hyeon Yoon, Dongwon Lee, and Gilson Khang[†]

Dept. of BIN Fusion Tech, and Dept. of Polymer Nano Sci. & Tech., Chonbuk National University,
567 Baekje-daero, Deokjin, Jeonju 561-756, Korea

(Received October 22, 2012; Revised January 5, 2013; Accepted January 6, 2013)

초록: 헤스페리딘은 혈관 순환계 보호 효과, 항암 효과, 항산화 효과, 항염증 효과 등의 작용이 있다고 알려져 있다. 본 연구에서는 헤스페리딘을 함유한 poly(lactic-co-glycolic acid)(PLGA) 필름을 조직공학 적 세포담체로 이용하고 생체 내/외의 실험을 통하여 헤스페리딘과 염증 반응의 상관관계를 알아보고자 하였다. 세포담체에서의 세포의 증식과 부착을 확인하고자 PLGA/헤스페리딘 필름에 세포(RAW 264.7, NIH/3T3)를 파종하여 1, 3일 후에 MTT와 SEM을 통하여 분석하였다. 또한 항산화 효과와 염증 완화 효과를 알아보고자 ELISA, RT-PCR, FACS 등을 평가한 결과 PLGA 필름보다는 헤스페리딘이 첨가된 PLGA 필름에서 염증 반응이 감소하는 것을 확인하였다. *In vivo* 실험에서도 헤스페리딘이 PLGA에 의해 유도된 염증세포와 섬유피막 축적을 감소시켜 헤스페리딘의 항염증 효과를 볼 수 있었다. 이 실험 결과 PLGA 필름보다는 PLGA/헤스페리딘 필름에서 염증 반응이 감소함을 확인하였다.

Abstract: Hesperidin (Hes) has known to having some functions like protection of blood circulatory system, anti-tumor effect, antioxidant effect and anti-inflammatory effect. The goal of this study is to demonstrate the relationship between Hes and inflammatory through *in vitro* and *in vivo* studies using poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) film including Hes as a tissue engineered scaffold. To confirm the proliferation of cells on fabricated scaffold, cells (RAW 264.7 and NIH/3T3) were seeded on PLGA/Hes film then analyzed with MTT and SEM at 1 and 3 days after seeding. The results from ELISA, RT-PCR, and FACS for anti-oxident and anti-inflammatory effect showed that inflammatory response of PLGA/Hes film decreased more than that of PLGA film. Also, *in vivo* result confirmed that inflammatory response by implanted PLGA/Hes film decreased more comparing with PLGA film. This is because of anti-inflammatory effect of Hes reducing induced inflammatory cell and accumulation of fibrous capsule. The results showed that PLGA/Hes film's capacity on reducing inflammatory is better than PLGA film because of Hes.

Keywords: poly(lactic-co-glycolic acid), hesperidin, inflammatory response.

서 론

생체조직공학은 생체내 흡수율과 세포 친화력이 우수한 고분자로 제작된 지지체를 생체내에 이식하여 손상된 조직을 복원하거나 그 기능을 유지시키고 지지체를 생체내에서 안전하게 분해/흡수되도록 조절하는 것을 목적으로 하는 학문이다. 조직공학에 사용되는 지지체는 생체적합성 재료로서 세

포의 부착과 성장을 유도하고 손상된 조직을 복원하는 기간 동안 지지체가 그 형태를 유지하여 세포가 조직을 잘 복원할 수 있도록 제작되어야 한다.^{1,3}

생체조직공학용 담체에 사용되는 고분자는 천연고분자와 합성고분자로 구분할 수 있다. 천연고분자는 콜라겐, 히알루론산, 알지네이트, 젤라틴, 아미노산, 소장 점막하조직, 키토산 등이 속한다.⁴ 이러한 천연고분자는 생분해성, 세포와 조직 사이의 상호작용, 생체적합성이 우수하며 염증반응이 적다는 장점을 가진다.⁵ 그러나 기계적 물성이 약하여 충전제 형태로 사용될 수 밖에 없다는 단점을 가지고 있어 다른 물

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: gskhang@jbnu.ac.kr

질과 함께 사용해야 한다.⁶

합성고분자는 주로 소수성의 특성을 나타내며 생분해성 특징을 갖는 고분자로서 polyesters, poly(lactic acid)(PLA), poly(glycolic acid)(PGA), poly(lactic-co-glycolic acid)(PLGA), poly(ϵ -caprolactone)(PCL) 등이 조직공학용 재료로 사용되고 있다.⁷ 락타이드와 글리콜라이드의 공중합체인 PLGA는 미국 식품의약국(FDA)의 승인을 받은 합성고분자로 조직공학적 지지체로 사용되고 있지만⁸ 가수분해 과정 중 생성되는 산 분해물이 조직 주변의 pH를 감소시켜 염증을 유발할 수 있다.⁹⁻¹¹

염증 반응은 생체나 조직에 물리적 충격이나 화학물질, 세균감염 등과 같은 자극이 가해져서 발생한 손상부위를 정상 상태로 복구 및 재생하는 기전으로써 염증이 일어나면 혈관활성물질이 유리되어 혈관확장, 혈관세포막 투과성 증가, 부종 등이 유발되며^{12,13} 염증반응을 일으키는 세포에 외부자극을 가하면 인터루킨-1(β IL-1 β), IL-6 및 종양 괴사인자(tumor necrosis factor-alpha, TNF- α) 등의 전염증성 사이토카인의 발현이 유도되고 염증관련 인자들이 생성된다. 이러한 염증은 많은 질환에서 조직 손상의 원인으로 작용되며 문제를 해결하고자 염증 반응에 관여하는 물질을 찾아 제거하려는 많은 노력이 있어 왔으며 염증 물질에 항염증 효과와 항산화 효과가 있는 식물추출물을 통한 연구가 많이 이루어지고 있다.

지금까지 밝혀진 식물성분을 살펴보면, 페놀화합물을 비롯하여 플라보노이드, 알칼로이드 등과 같은 천연항산화제에 대해 연구되었다.¹⁴ 본 연구에서 사용된 식물재료는 헤스페리딘(Hes)으로서 유자의 주요 활성성분이며 담황색 또는 노란색을 띠는 색소화합물이며^{14,15} 주로 항산화 기능, 지질 과산화물 생성에 의한 세포, 조직, 기관의 손상억제, 노화 방지, 항암 효과 등의 다양한 기능을 가지는 것으로 알려져 있다.^{16,17}

이러한 사실을 바탕으로 본 연구에서는 생분해성 합성고분자인 PLGA에 항염증 효과를 나타내는 헤스페리딘을 함량별로 혼합하여 필름을 제조하고 이를 이용하여 생체 내·외에서 PLGA에 의해서 유도된 염증 반응에 대한 헤스페리딘의 효과를 알아보고자 한다.

실 험

시약 및 재료. PLGA(락타이드/글라이콜라이드 몰비 75/25, Resomer[®] RG756, Boehringer Ingelheim Chem. Co. Ltd., Germany)는 평균분자량이 90000 g/mole인 것을 사용하였다. Hesperidin(Hes)은 Sigma-Aldrich(USA)사에서 구입하였으며, methylene chloride(MC, Tedia Co. Inc., USA) 및 이외의 모든 화학약품과 유기용매는 HPLC(high performance liquid chromatography) 등급을 사용하였다.

헤스페리딘을 함유한 PLGA 하이브리드 필름 제조. 헤스페리딘을 함유한 PLGA 하이브리드 필름은 300 mg의 PLGA를 5 mL의 MC에 용해한 후, PLGA 양의 0, 3, 5 및 10 wt%

가 되도록 헤스페리딘을 9, 15 및 30 mg 혼합 후,^{18,19} 이를 직경 30 mm인 디쉬에 부위, 용매증발법으로 상온 건조하였다. 잔류용매인 MC를 충분히 제거하기 위하여 최소 일주일 이상 진공오븐에서 건조시킨 후 70% 알코올에 멸균하여 실험에 사용하였다.

접촉각 측정. PLGA/Hes 필름의 습윤 특성을 측정하기 위하여 접촉각을 측정하였다. 각각의 필름에 10 μ L씩 증류수를 떨어뜨린 후, 필름 표면에서의 물방울의 각도를 contact angle goniometer(Tantec[™], CAM-PLUS Micro, US)를 이용하여 측정하였다.

헤스페리딘 방출량 측정. PLGA/Hes 3, 5 및 10%(직경 1 cm) 필름으로부터 헤스페리딘의 방출은 2 mL의 PBS 용액에 필름을 넣어 현탁하고 37 °C 인큐베이터에서 보관 후 1, 3 및 5일차를 관찰하였다. 각각의 시료를 100 μ L 채취하여 96-well 플레이트에 분주한 후 ELISA 리더(E-max, Molecular Device, USA)를 사용하여 310 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 배양. 실험에 사용된 쥐 단핵대식세포(mouse leukaemic monocyte macrophage cell line: RAW 264.7, KCLB40071)와 쥐 배아섬유아세포(NIH/3T3 mouse embryo fibroblast, KCLB21658)는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 제공받았다. RAW 264.7 세포는 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM, 저농도 글루코오스, Gibco)에 10% 우태아혈청(Gibco), 1% 항생제(100 units/mL 페니실린과 100 μ g/mL 스트렙토마이신)가 함유된 배양액으로 NIH/3T3는 RPMI 1640(roswell park memorial institute medium)에 10% 우태아혈청, 1% 항생제(antibiotics/antimycotics)가 함유된 배양액으로 현탁액을 만든 후 세포배양 플라스크에 분주하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

세포 증식률 측정. 세포증식 능력이나 세포생존 능력을 측정하기 위해 MTT(디메틸치아졸-2-일-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드, Sigma-Aldrich) 분석법을 시행하여 발색량을 정량 분석하였다. 제조된 PLGA 필름 및 PLGA/Hes 필름에 쥐 배아섬유아세포인 NIH/3T3를 1 \times 10⁵ 세포/필름 농도로 파종하여 상기의 배양액으로 정적 배양하였다. 배양 1, 3일차에 배양액 교체 후 MTT시약(5 mg/mL stock in PBS(phosphate buffered saline))을 100 μ L씩 넣고 4시간 동안 37 °C 인큐베이터에서 배양하였다. 그 후 보라색 결정이 생성되면 필름을 시험관에 옮겨 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma-Aldrich, USA) 용액을 1 mL씩 넣어 결정이 완전히 녹을 때까지 초음파 세척기로 1시간 동안 용해한 후 96-well 플레이트에 용해된 시료를 각각 100 μ L씩 분주하여 ELISA 리더(E-max, Molecular Device, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포부착 형태관찰. PLGA/Hes 필름에서 NIH/3T3의 부착 양상 및 변화된 형태를 확인하고자 SEM(scanning electron microscopy; S-2250N, Hitachi, Japan)으로 관찰하였다(각 지

지체당 n=2). 헤스페리딘을 첨가하지 않은 단독의 PLGA 필름과 헤스페리딘을 첨가한 PLGA/Hes 필름을 1.5 cm(가로, 세로 각각 1.5 cm)로 잘라 세포 배양용 24-well에 실리콘몰드로 고정시켰다. 여기에 NIH/3T3를 1×10^5 세포/필름의 농도로 파종하고 3일 동안 배양한 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척하였다. 이를 2.5%의 glutaldehyde(Sigma-Aldrich)로 24 시간 동안 상온에서 고정한 후 에탄올 구배용액(50, 60, 70, 80, 90 및 100%)을 이용하여 각각 30분씩 탈수한 후 건조하였다. 시료관찰이 용이하도록 시편을 잘라 시료관에 고정시킨 후, 아르곤가스 하에서 플라즈마 스퍼터(Emscope SC500K, London, UK)를 이용하여 백금코팅 후 각각의 시료를 1000 배의 배율로 촬영하였다.

mRNA 발현도 확인. PLGA 필름과 PLGA/Hes 필름에 대한 염증 사이토카인의 mRNA 발현여부를 측정하기 위해 역전사 중합효소반응(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)을 수행하였다. 세포 파종 후 1, 5일차에 회수된 필름에 1 mL의 Trizol(InvitrogenTM, Life Technologies Co., Groningen, Netherlands)을 첨가한 다음 1.5 mL 튜브에 넣어 0.2 mL의 chloroform(Sigma-Aldrich)을 첨가하고 4°C, 12000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 mRNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 Oligo(dT)12-18 프라이머(InvitrogenTM), 5×완충용액(first strand buffer, InvitrogenTM), dNTP(dGTP, dATP, dTTP, dCTP, Gibco), RNA 분해효소 억제제(RNase inhibitor, InvitrogenTM), 역전사트랜스크립타제(SuperscriptTM RNase H reverse transcriptase, InvitrogenTM), DNase/RNase free water(Gibco)를 첨가하여 중합효소반응기(authorized thermal cycler, TP600, Takara Bio Inc., Japan)를 통하여 cDNA로 역전사하였다. 제작된 cDNA를 기반으로 GAPDH, IL-1 β 및 IL-6 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 후 증폭된 DNA를 1.5%(w/v) 아가로스겔에 전기영동을 한 후, 상대적 발현을 SYBR 녹색형광(SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain, Cambrex, UK)에 의해 시각화하였으며 300 nm 자외선 조사기로 이미지를 획득하여 GAPDH, IL-1 β 및 IL-6의 mRNA 밴드의 발현 정도를 확인하였다.

PLGA/Hes 필름에서 활성산소 측정. 세포에서 생성된 세포 내 활성산소(reactive oxygen species, ROS)를 dichlorofluorescein(DCF)를 이용하여 유세포 분석을 통하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 PLGA/Hes 필름에 파종 후 3일 후에 측정하였다. 양성대조군은 필름에 파종한 세포에 lipopolysaccharide (LPS, Sigma-Aldrich)를 첨가하였으며 음성대조군은 세포배양 접시에 세포를 배양하였다. Dichlorodihydro-fluorescein diacetate(DCFH-DA, Sigma-Aldrich)는 ROS를 측정하기 위하여 세포 파종 후 배양액에 20 μ M, 40분 처리한 후 FACS (fluorescence activated cell sorter, Benton-Dickson, US)를 이용하여 측정하였다.

염증 사이토카인 정량화. PLGA 필름에 헤스페리딘 첨가

에 따른 염증의 정도와 세포배양 후 분비되는 염증 매개 사이토카인인 TNF- α 의 농도를 측정하여 비교분석하기 위해 효소면역검사(TNF- α ELISA set (BD optELATM))를 시행하였다. RAW 264.7 세포를 1×10^5 세포/필름의 농도로 파종하고 상기의 배양액으로 정적 배양하였다(각 지지체당 n=2). 음성대조군으로 배양액에 RAW 264.7 세포만을 배양하였으며, 양성대조군으로 배양액에 RAW 264.7 세포와 염증 유발 물질인 LPS를 첨가하여 배양하였다. 배양 1, 5일 후 배양액만을 취하여 원심분리(10000 rpm, 15분)하여 얻은 상층액을 -80°C 조건에서 동결하였다. 모든 시료를 회수 후 96-well 플레이트에서 ELISA plate reader를 이용하여 450 nm 파장으로 측정하였다.

조직 염색 분석. 조직학적 평가를 위하여 5주령 암컷인 Wistar rat(100~150 g, 중앙실험동물, Korea)을 모델로 하였으며, 70% 에탄올로 멸균한 후 PBS로 세척한 헤스페리딘 함량별 필름(6×6 mm)을 면역기관인 림프절이 주로 모여 있는 거드랑이 부위의 피하에 이식하였다. 이식한 필름을 7일과 28일차에 회수하여 10% 포르말린(Sigma-Aldrich) 용액에 고정하였다. 그 후 필름을 측면으로 세워 파라핀 블록으로 제작하여 박절기(microtome, Thermo, USA)를 이용하여 5 μ m의 두께로 잘라 슬라이드에 고정하였다. 조직 절편을 탈파라핀 과정을 거친 후 필름을 이식한 부위의 염증세포의 침윤을 확인하기 위해 H&E 염색(Hematoxylin and Eosin staining)을 시행하였다. ED-1(mouse anti-rat CD68 monoclonal antibody, abcam[®])은 avidin-biotin peroxidase complex(ABC) 방법으로 확인하였으며, 유리슬라이드 표면에 조직과 함께 건조되어 있는 파라핀을 60°C 건조기에서 녹인 후 자일렌으로 5분간 3회의 탈파라핀 과정을 거치고 100, 95, 90, 80 및 70% 에탄올에서 각각 5분씩 처리하여 함수하였다. 항원 복구를 위해 0.01 N HCl 5 mL에 펩신 15 mg을 녹여 20분간 전처리하였다. 조직 내 과산화효소의 작용을 억제하기 위하여 3% 과산화수소에 10분간 처리한 후, 조직 내의 항원과 비특이적 단백질결합을 억제하기 위해 15분간 blocking agent(ultra tech HRP kit protein blocking agent, Beckman coulter, France)를 처리하였다. 일차 항체인 ED-1을 antibody diluent를 이용하여 1:90으로 희석하여 1시간 30분 동안 부착시킨 후 PBS로 세척하였다. Biotin이 부착된 이차항체(biotinylated secondary antibody)에 30분간 반응시킨 다음 PBS로 세척 후 이차항체에 부착되어 있는 biotin과 결합할 수 있는 streptavidin peroxidase reagent를 30분간 처리하였다. 발색은 chromogen substrate (ultra tech AEC kit AEC substrate : ultra tech AEC kit AEC chromogen, 1:50, France)를 이용하여 5분간 반응시킨 후 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하여 수용성 봉입제로 봉입하였다.

통계. 각 실험의 통계학적 분석은 student's t-test를 시행하여 *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 것으로 하였다.

결과 및 토론

PLGA/Hes 필름 특성 평가. 헤스페리딘은 물에 잘 녹지 않는 플라보노이드계 색소 중의 플라바논 배당체로 용매증발법을 이용하여 PLGA 및 헤스페리딘을 함유한 PLGA 필름을 제조하였으며 제조된 필름과 모식도를 Figure 1에 나타내었다. 제조된 헤스페리딘이 첨가된 PLGA/Hes 3, 5 및 10% 필름에서 헤스페리딘의 방출량을 확인하기 위하여 각각의 필름을 37°C에서 PBS용액(pH 7.4)의 환경에서 측정할 것을 Figure 2를 통해 나타내었다. 헤스페리딘 함량에 따른 방출량의 차이는 나타났지만 시간이 지남에 따라 모든 실험군에서 헤스페리딘이 연속적으로 방출되었으며 방출량이 증가하는 현상을 확인하였다. Figure 3은 PLGA 필름과 헤스페리딘의 함량에 따른 필름표면의 습윤 특성을 확인하기 위하여 접촉각을 측정하였다. 측정 10분 후 결과에서는 실험군 모두 비슷한 접촉각 크기를 보였으나 헤스페리딘이 첨가된 필름에서는 PLGA 필름보다 낮은 접촉각을 보였으며 헤스페리딘 5와 10% 첨가된 실험군이 PLGA 실험군과 비교하였을 때 30분을 기점으로 눈에 띄게 접촉각이 낮아졌음을 확인하였다. 또한 40분이 되었을 때 헤스페리딘이 10% 포함된 필름의 접촉각(18°)이 PLGA 필름의 접촉각(41.3°)과 비교하여 약 50%

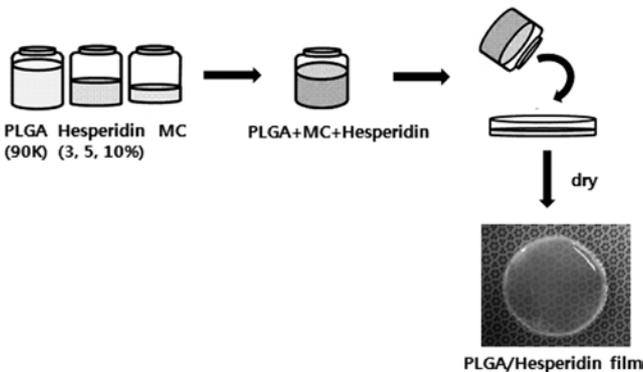


Figure 1. Schematic diagram of the fabrication of PLGA/Hes films by solvent evaporation method.

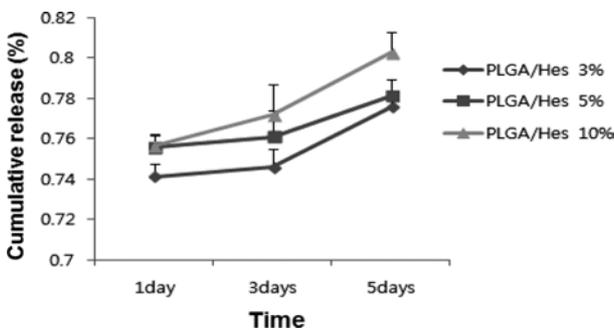


Figure 2. Release behaviors of hesperidin from the PLGA/Hes 3, 5 and 10% films (n=3).

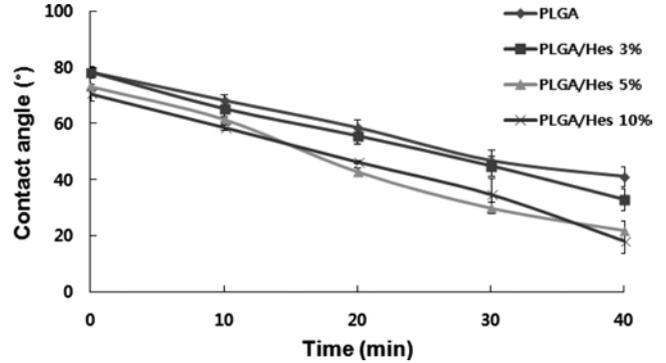


Figure 3. Water contact angle of PLGA film and PLGA/Hes 3, 5 and 10% films (n=3) angles.

감소됨을 확인할 수 있었다. 따라서 PLGA와 비교하였을 때 비교적 수분흡수율이 좋은 헤스페리딘 필름에서 세포의 부착 및 증식에 긍정적인 영향을 주는 것으로 사료된다. 앞선 연구에서 적외선 분광기 분석법(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)을 통하여 제조된 PLGA 필름과, 헤스페리딘이 함유된 PLGA 필름, 헤스페리딘 분말을 이용하여 화학적 성분을 분석하였다.²⁰ PLGA 필름에서는 카르보닐기, 에스터기가 나타남을 확인하였고 헤스페리딘 분말에서 방향족 그룹과 -OH 페놀릭, methoxylic이 나타났다. PLGA/Hes 필름에서 PLGA 필름에서만 볼 수 있는 카르보닐기는 물론 헤스페리딘 분말에서 확인되는 방향족 그룹과 -OH 페놀릭, methoxylic 피크 세기가 나타남을 확인하였는데 이를 통하여 PLGA에 헤스페리딘이 고루 분포되었다는 것을 알 수 있었으며, 따라서 재료의 화학적 특성이 변하지 않고 유지되는 것을 알 수 있었다.²⁰

세포 증식을 측정. PLGA 필름과 헤스페리딘이 첨가된 PLGA 필름에 따른 세포의 증식 정도를 확인하고자 MTT 분석을 실시하여 Figure 4에 나타내었다. 각각의 실험군에 따른 세포 증식을 평가하기 위해 필름에 NIH/3T3 세포를 파종하

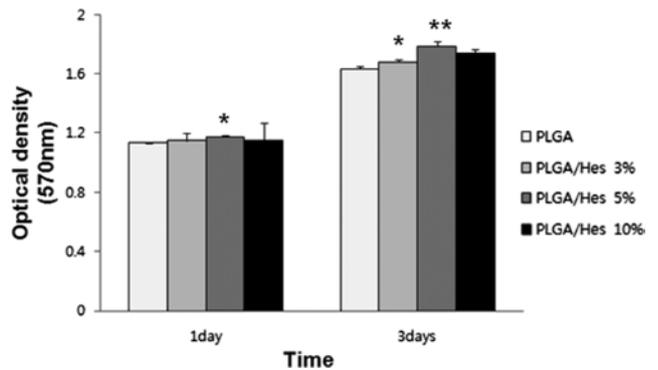


Figure 4. Cell proliferation of NIH/3T3 on PLGA and PLGA/Hes 3, 5 and 10% films on 1 and 3 days after cell culturing (* $p < 0.5$, ** $p < 0.01$).

여 1, 3일 후의 흡광도를 측정하였다. 1일 후 측정 결과에서는 초기 부착률을 확인하였으며 모든 실험군에서의 부착률이 비슷하게 측정되었다. 3일 후 측정 결과에서 1일차 결과와 비교하여 모든 실험군에서 세포의 증식률이 증가하였음을 확인할 수 있었으며 특히 PLGA/Hes 5% 필름에서 가장 높은 세포의 증식률을 보였다. 이 결과에 따라 PLGA 필름보다는 PLGA/Hes 필름이 수분친화력이 우수한 것으로 판단되며 세포의 성장률 증식에 우수한 것으로 사료된다.

세포 부착도/SEM 분석. PLGA 필름과 헤스페리딘의 함량에 따른 PLGA/Hes 필름 표면에서 NIH/3T3의 초기부착도와 증식 정도를 육안으로 관찰하기 위하여 SEM 분석을 수행하였으며 그 결과를 Figure 5에 나타내었다. 세포 파종 1일차에 모든 실험군에서 세포가 부착되었고 PLGA 필름에서보다는

PLGA/Hes 필름에서 초기 부착도가 더 높았다. 세포 파종 3일차에 PLGA 필름표면은 세포가 구형으로 부착됨을 보였고, 헤스페리딘이 첨가된 PLGA 필름표면에서는 섬유아세포의 전형적인 세포의 형태로 세포가 긴 방추형으로 성장함을 확인하였다.²¹ 특히 PLGA/Hes 5% 필름표면에 세포가 전체적으로 많이 퍼져있으며 증식이 활발한 것으로 나타났다.

PLGA/Hes 필름의 항산화 및 항염증 효과. O₂와 H₂O₂를 포함하는 활성산소(ROS)는 생체내에서 지속적으로 생성되지만 적절하게 제어되지 않으면 축적되어 단백질, 지질, 핵산 등에 손상을 야기한다.^{22,23} 이에 헤스페리딘에 대한 항산화 효과를 알아보기 위하여 제조된 PLGA/Hes 필름에서 RAW 264.7 세포를 배양하여 ROS 측정을 하였다. 활성화된 RAW 264.7 세포의 ROS를 측정하기 위하여 DCFH-DA를 이용해

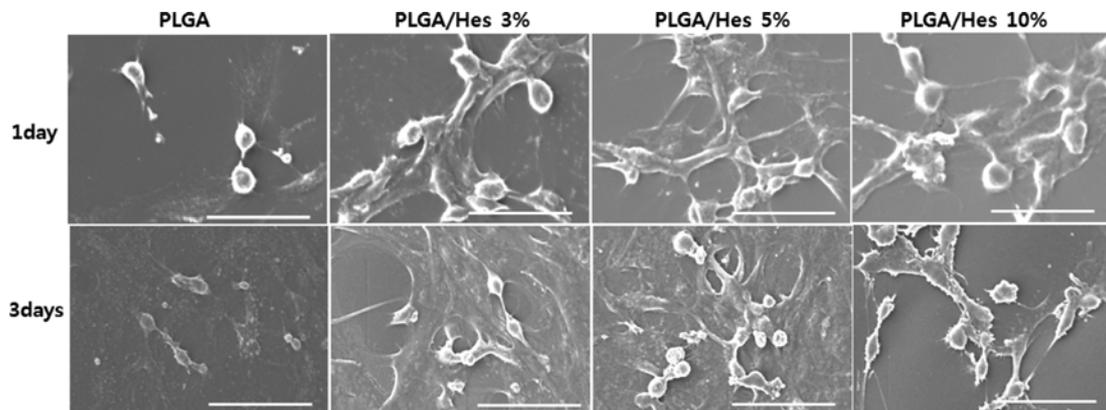


Figure 5. SEM microphotographs of NIH/3T3 cell morphology on PLGA/Hes films after 1 and 3 days (magnification with $\times 1000$, scale bar = 50 μm).

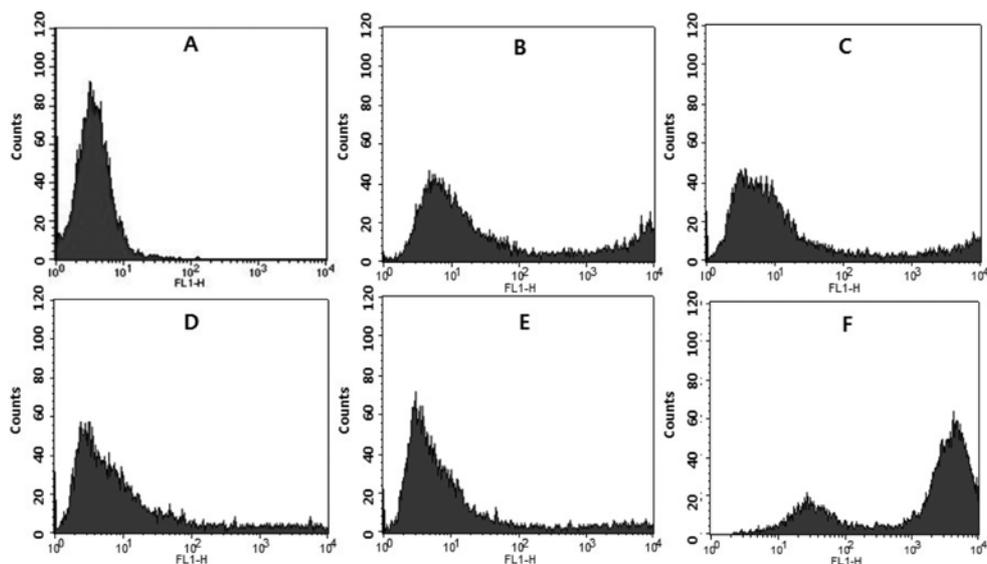


Figure 6. Antioxidant activity of PLGA/Hes films. The flow cytometry analysis shows the effects of PLGA/Hes films on the generation of ROS (A: TCP; B: cell cultured PLGA film; C: cell cultured PLGA/Hes 3% film; D: cell cultured PLGA/Hes 5% film; E: cell cultured PLGA/Hes 10% film; F: TCP+LPS).

유세포 분석기로 측정하여 세포내 활성산소를 정량화 하였다. Figure 6은 헤스페리딘의 항산화 효과를 알아보기 위해 나타낸 것으로 음성 대조군으로 배양액에 RAW 264.7 세포만 배양하고, 양성 대조군으로 배양액에 RAW 264.7 세포와 LPS를 첨가하여 배양하였다. 또한 같은 조건하에서 PLGA, PLGA/Hes 3, 5 및 10% 필름에서도 RAW 264.7 세포를 배양하여 DCFH-DA을 처리하였다.²⁴ 세포내 ROS 생성은 유세포 분석기에서 DCF 형광 세기에 의해 결정되는데 음성대조군에서 가장 약한 DCF 형광세기를 나타내었고 양성대조군에서는 LPS에 의해 세포가 활성화되어 ROS를 생성하고 이것이 강한 DCF 형광으로 나타났음을 볼 수 있다. 음성대조군과 양성대조군 사이에 나타내어진 PLGA 필름과 PLGA에 대한 헤스페리딘 함량별 필름을 분석하여 볼 때 PLGA 필름과 PLGA/Hes 3% 필름에서의 피크보다는 PLGA/Hes 5, 10% 필름의 피크가 음성 대조군에 가까운 피크방향으로 이동한 것으로 보아 헤스페리딘의 항산화 효과로 인하여 ROS가 감소되었다고 볼 수 있다.¹⁴ 이를 통하여 합성고분자의 세포사멸(apoptosis)의 주요원인으로 작용하는 ROS의 소거 효과가 헤스페리딘이 작용한다고 나타나지만 PLGA/Hes 3% 일 때 보다는 PLGA/Hes 5, 10% 필름에서의 ROS 소거 작용이 더 좋게 나타난 것으로 보아 PLGA에 따른 헤스페리딘의 적정농도에서 효과적으로 항산화 작용을 하는지 확인할 수 있었다.

RT-PCR. IL-1 β , IL-6 등은 염증성 사이토카인으로 서로 간에 상호작용이 있는 것으로 나타나며 염증 반응이 유발된 대식세포가 주요 생성세포이다. 면역 반응과 염증 반응을 유도하는 염증매개 사이토카인인 IL-1 β 는 다양한 림포카인을 분비시켜 세포증식 및 세포의 기질 축적을 자극시키고, IL-6는 숙주방어, 면역 반응의 기능을 한다.²⁵ PLGA 필름과 PLGA/Hes 필름에 대식세포를 배양하여 전염증성 사이토카인의 발현을 확인하고자 mRNA 관점에서 알아보았다. 1일차와 5일차를 RT-PCR을 통하여 GAPDH, IL-1 β 및 IL-6의 발현 밴드의 광도를 측정하여 하우스 키핑 유전자인 GAPDH로 표준화시켜 Figure 7에 나타내었다. 1일차와 5일차 모두 LPS로 활성화시킨 세포에서는 다량의 전염증성 사이토카인이 유도되어 높은 값을 나타내는 반면 PLGA 필름과 PLGA/Hes 필름에서는 낮은 값을 나타내었다. 또한 5일차에 두 그룹 모두 PLGA/Hes 필름에서 전염증 사이토카인의 발현양이 감소됨을 확인하였다. 이 결과로 염증에 관여하는 전염증성 사이토카인인 IL-1 β , IL-6이 시간이 지남에 따라 발현양이 감소함으로 보아 헤스페리딘이 항염증 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

염증 사이토카인 방출량 측정. TNF- α 는 염증과 면역 반응의 중요한 매개물질이며, 다양한 세포의 성장과 분화를 조절한다. 이러한 염증 물질은 세포에 독성을 일으키고, 혈전 생성을 촉진하고 lipogenic 대사를 억제하는 것으로 알려져 있다.²⁶

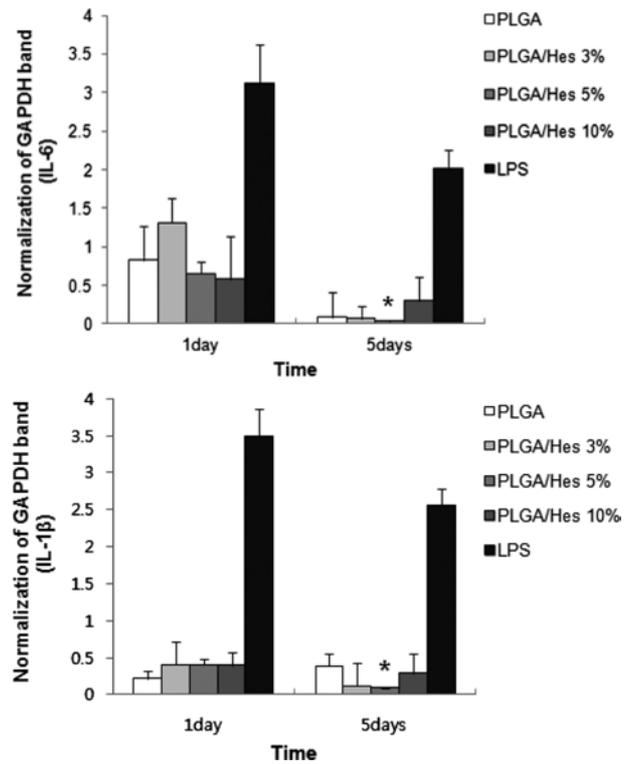


Figure 7. Gene expression of GAPDH, IL-6 and IL-1 β , as analyzed by RT-PCR on 1 and 5 days. Normalization of GAPDH expression by IL-6 and IL-1 β (* p <0.5).

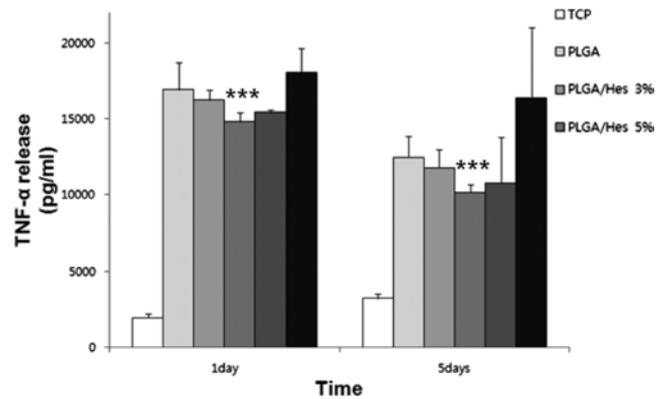


Figure 8. Effects of hesperidin on the production of TNF- α by RAW 264.7 cells cultured on PLGA film and PLGA/Hes 3, 5 and 10% films (** p <0.001).

이를 토대로 PLGA 필름에 헤스페리딘의 첨가에 따른 염증 완화의 여부와 세포배양 시 분비되는 염증 매개 사이토카인인 TNF- α 의 농도를 측정하여 분석하기 위해 효소면역검사를 시행하여 Figure 8에 나타내었다. LPS로 활성화된 대식세포에서는 TNF- α 를 정량한 결과 선천성 면역 및 세포성 면역에 영향을 미침으로써 TNF- α 의 발현량이 가장 높게 나옴을 확인할 수 있었고 TCP에 배양된 대식세포에서는 TNF- α 의

발현양이 가장 낮음을 확인할 수 있었다. PLGA 필름과 헤스페리딘 함량별 PLGA 필름은 TCP보다는 높은 TNF- α 의 발현양이 높음을 알 수 있지만 LPS 처리된 실험군보다는 낮은 수준을 보였다. 1 및 5일차를 측정한 결과 PLGA 필름보다는 PLGA/Hes 5% 필름에서 낮은 TNF- α 발현양을 나타내었다. 또한 1일차 보다는 5일차에 PLGA 필름보다 PLGA에 헤스페리딘을 첨가한 필름에서 더 적은 양의 TNF- α 가 방출되는 것으로 보아 헤스페리딘이 PLGA에 대하여 염증 반응을 줄이고 TNF- α 를 억제하는 항염증 효과가 있음을 확인하였다.

조직학적 평가. *In vivo* 내에서 필름과 조직간의 상호작용 및 염증 반응을 확인하기 위해 필름을 쥐의 겨드랑이 부위의 피하에 이식하여 1주, 4주 관찰하였다. 적절한 필름은 염증세포 확인을 위해 H&E 염색과 대식세포의 발생 정도를 확인하기 위해 면역조직화학적 염색인 ED-1을 실시하였다. Figure 9는 1, 4주 후 H&E 염색 결과로써 PLGA 필름의 세포벽의 두께가 헤스페리딘을 첨가한 필름보다 더 두껍게 형성됨을

보였으며 염증성 세포가 많이 침윤되었음을 알 수 있었다. 4주 후 관찰결과에서도 PLGA 필름에서 가장 두꺼운 세포벽을 관찰할 수 있는 반면, 헤스페리딘이 첨가된 필름의 표면에서는 PLGA 필름과 비교하였을 때 얇은 세포벽을 확인하였다. PLGA/Hes 3% 필름에서는 PLGA와 비슷한 염증 범위를 나타낸 반면 PLGA/Hes 5% 필름에서 가장 적은 염증성 세포와 얇은 세포벽을 관찰하였다.²⁷ Figure 10은 손상된 조직에서 발생하는 대식세포를 확인하기 위하여 대식세포 마커 CD-68을 이용하여 면역조직화학적 염색을 실시한 결과이다. ED-1 염색을 통하여 대식세포, 형질세포 수의 증가와 함께 혈관형성을 기반으로 하는 염증을 각각의 실험군에 따라 확인하였다.²⁸ 관찰 1주 후 PLGA 필름과 조직 사이에는 대식세포가 인접해 있으며 급성 염증 반응을 통하여 가장 두꺼운 세포층을 확인하였다. 관찰 6주 후에서도 PLGA 필름의 표면에서는 여전히 두꺼운 세포층과 염증 세포를 형성하는 반면 헤스페리딘이 첨가된 PLGA 필름에서는 1주에서 나타났던

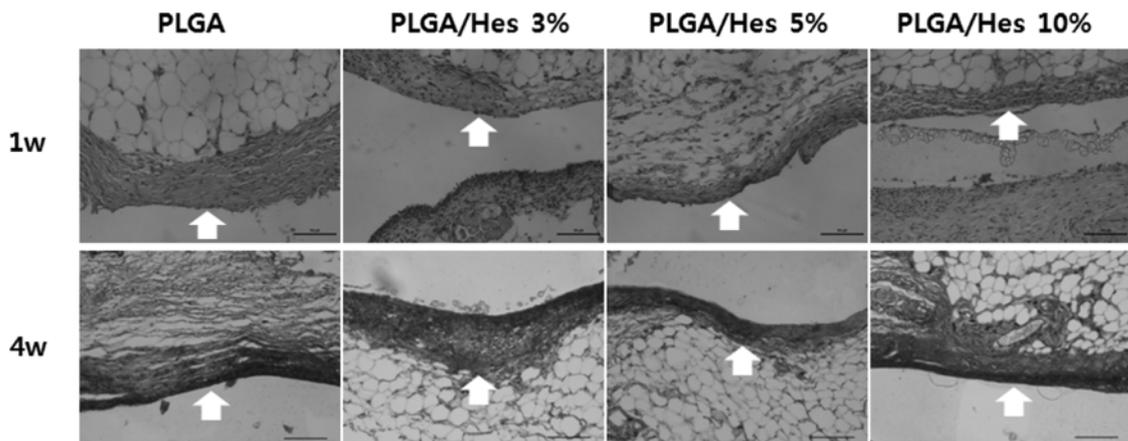


Figure 9. Hematoxylin & Eosin stained histological section of tissue at PLGA films and PLGA/Hes 3, 5 and 10% films after 1 and 4 weeks of implantation (magnification with $\times 200$, scale bar = 100 μm).

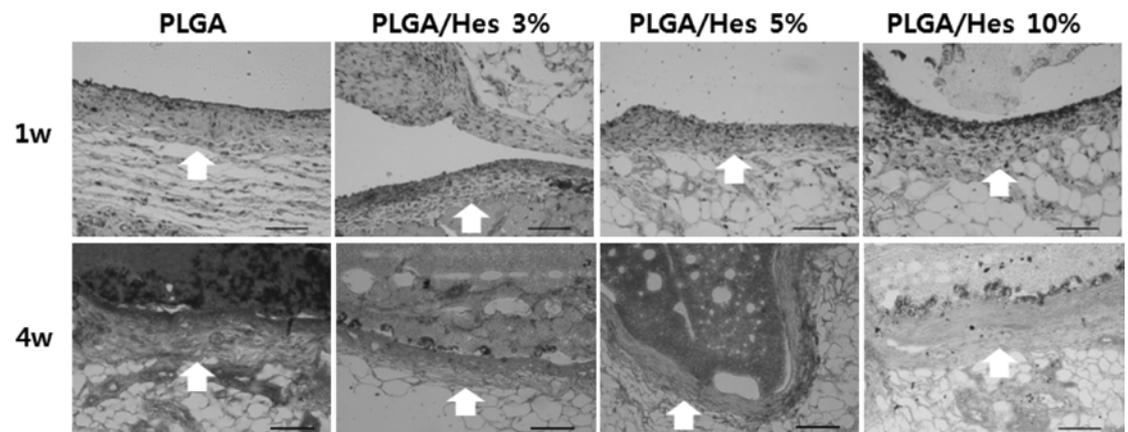


Figure 10. ED-1 immunohistological stained section of tissue at PLGA films and PLGA/Hes 3, 5 and 10% films after 1 and 4 weeks of implantation (magnification with $\times 200$, scale bar = 100 μm).

급성 염증 반응들이 4주 후에는 감소됨을 보였다. 특히 PLGA/Hes 5% 필름에서 매우 적은 염증 반응 및 세포를 축적하였고 세포층 또한 가장 얇게 형성됨을 확인하였다.²⁹

결 론

본 연구에서는 소수성의 특징을 가진 합성고분자 PLGA의 낮은 세포 부착도와 염증반응 유발의 문제점을 해결하기 위한 헤스페리딘의 효과를 확인하고자 PLGA 필름에 헤스페리딘을 첨가하여 헤스페리딘의 농도별로 필름을 제작하였다. 기존 연구 결과에 의하면 human hepatic 세포에 헤스페리딘을 농도별로 처리하였을 경우³⁰ 세포의 성장률이 농도에 비례하여 증가하는 결과를 보여주었으며 반대로 암세포인 MCF-7 세포에 헤스페리딘을 농도별로 첨가하였을 경우³¹ 세포 성장률을 저해하였으며 헤스페리딘의 농도에 의존하여 성장률이 감소함을 나타내었다.

본 실험에서 제조된 PLGA/Hes 필름은 헤스페리딘을 배지에 첨가하지 않고 필름제조 시 농도별로 제작하여 그 효과를 확인하고자 하였다. 본 연구에서 제조된 필름의 화학성분 분석 결과를 통해서 PLGA 필름에 헤스페리딘이 고루 분포되어 있음을 확인하였고²⁰ 수분흡수도 측정을 통해 소수성 표면을 가지는 PLGA에 헤스페리딘을 첨가하면 수분 친화도가 향상됨을 확인하였다. 또한 PBS 용액에 각각의 필름을 현탁하였을 때 시간이 지남에 따라 함량별로 헤스페리딘이 방출됨을 관찰하였다.

In vitro 환경에서 헤스페리딘 함량에 따른 세포의 생존율과 부착능력을 알아보기 위해 MTT 분석과 SEM 분석을 한 결과 MTT 결과에서는 헤스페리딘의 함량이 5%일 때 세포 증식률이 가장 높았다. SEM 분석결과 역시 헤스페리딘 함량이 5%일 때 세포의 부착, 성장률이 우수하였으며 MTT 분석과 동일한 결과를 얻었다. PLGA/Hes 필름에서의 세포와의 상호작용에 있어서 전염증 사이토카인의 발현을 확인하고자 RT-PCR을 실시한 결과 헤스페리딘이 첨가된 PLGA 필름에서 낮은 염증 인자의 발현을 확인하였으며 함량이 5%일 때 염증 사이토카인의 발현정도가 가장 많이 감소됨을 확인하였다. 또한 염증 사이토카인(TNF- α) 방출량을 측정하기 위해 ELISA 분석을 통해서 LPS군과 비교하였을 때 모든 실험군에서 낮은 염증 사이토카인이 방출되었으며 PLGA/Hes 5% 필름에서 가장 낮은 값의 방출량을 나타내었다. 헤스페리딘의 활성산소 생성억제 효과를 알아보기 위해 FACS를 통해 측정된 결과 헤스페리딘이 PLGA에 분포되어 세포내 활성산소의 생성을 억제시킴으로써 항산화 작용이 있음을 보여주었다.

In vivo 환경에서 조직과의 상호작용을 확인하고자 H&E염색과 ED-1을 이용한 염색을 실시한 결과 염증세포와 섬유피막의 감소가 헤스페리딘 함량이 5%인 필름에서 감소한 것으로 보아 항염증 효과를 나타남을 확인하였다. 이러한 결과는

PLGA에 대한 헤스페리딘이 함량이 5%인 필름에서 항산화 및 항염증 효과가 좋게 나타남으로 보아 5% 함량일 때 세포에 유익한 환경과 세포와의 상호관계가 우수하며 긍정적으로 작용하는 것으로 사료된다.

감사의 글: 본 연구는 세계수준의 연구중심대학(WCU R31-20029)과 근골격계바이오장기센터(A040003) 및 세포응용사업단(SC4110)의 연구지원에 의하여 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Y. K. Ko, S. H. Kim, H. J. Ha, M. S. Kim, C. W. Han, J. M. Rhee, Y. Son, H. B. Lee, and G. Khang, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **4**, 67 (2007).
2. G. Khang, M. S. Kim, and B. Y. Min, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **3**, 376 (2004).
3. G. Khang, M. S. Kim, and S. H. Cho, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 9 (2004).
4. S. J. Yoon, S. H. Kim, H. J. Ha, Y. K. Ko, J. W. So, M. S. Kim, Y. I. Yang, G. Khang, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Part A*, **14**, 539 (2008).
5. S. Munirah, S. H. Kim, J. S. Jeong, H. J. Ha, S. J. Yoon, J. M. Rhee, M. S. Kim, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **31**, 14 (2007).
6. Y. Song, J. Kwon, B. Kim, Y. Jeon, G. Khang, and D. Lee, *J. Biomed. Mater. Res.*, **98A**, 517 (2011).
7. S. H. Oh, S. G. Kang, and J. H. Lee, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **17**, 131, (2006).
8. J. M. Chan, L. Zhang, K. P. Yuet, G. Liao, J. W. Rhee, R. Langer, and O. C. Farokhzad, *Biomaterials*, **30**, 1627 (2009).
9. O. Bostman, *J. Bone Joint Surg. Am.*, **73**, 148 (1991).
10. M. S. Taylor, *J. Appl. Biomater.*, **5**, 151 (1994).
11. M. S. Kim, H. H. Ahn, Y. N. Shin, M. H. Cho, G. Khang, and H. B. Lee, *Biomaterials*, **28**, 5137 (2007).
12. Y. P. Jeon, L. M. Mohammad, C. H. Park, J. H. Hong, G. D. Lee, J. C. Song, and G. S. Kim, *J. Life Science*, **19**, 479 (2009).
13. D. A. Willoughby, *Ann. Rheum. Dis.*, **34**, 471 (1975).
14. E. J. Cho, L. Li, N. Yamabe, and H. Y. Kim, *CNU J. Agricultural Science*, **38**, 717 (2011).
15. E. Middleton, *Annal Aller.*, **61**, 523 (1988).
16. Y. Lee, L. R. Howard, and B. Villalon, *J. Food Sci.*, **60**, 473 (1995).
17. H. S. Marie, L. Joel, and C. Marin, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **130**, 73 (1995).
18. H. H. Hong, S. J. Kim, S. H. Kim, H. L. Kim, J. H. Park, D. Lee, and G. Khang, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **6**, 711 (2009).
19. O. A. R. Sulaiman, and T. Gordon, *Glia*, **32**, 234 (2000).
20. C. R. Shim, Y. J. Lee, H. A. Ko, M. J. Kim, J. W. Bae, L. H. Lee, J. E. Song, and G. Khang, *Int. J. Tissue Regen.*, **3**, 50 (2012).
21. G. E. Muschler, C. Nakamoto, and L. G. Griffith, *J. Bone Joint*

- Surg. Am.*, **86A**, 1541 (2004).
22. B. N. Amens, M. K. Shigenoga, and T. M. Hagen, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**, 7915 (1993).
23. D. Harman, *J. Gerontol.*, **2**, 298 (1956).
24. Y. Lee, J. Kwon, G. Khang, and D. Lee, *Tissue Eng. Part A*, **18**, 1967 (2012).
25. A. V. Delgado, A. T. McManus, and J. P. Chambers, *Neuropeptides*, **37**, 355 (2003).
26. B. B. Aggarwal, *Nat. Rev. Immunol.*, **3**, 745 (2003).
27. S. J. Kim, H. H. Hong, S. H. Kim, H. L. Kim, S. H. Kim, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **1**, 63 (2010).
28. L. Meinel, S. Hofmann, V. Karageorgiou, C. Kirker-Head, J. McCool, G. Gronowicz, L. Zichner, R. Langer, G. Vunjak-Novakovic, and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, **26**, 147 (2005).
29. J. C. Sy, G. Seshadri, S. C. Yang, M. Brown, T. Oh, S. Dikalov, N. Murthy, and M. E. Davis, *Nat. Mater.*, **7**, 863 (2008).
30. M. Chen, H. Gu, Y. Ye, B. Lin, L. Sun, W. Deng, J. Zhang, and J. Liu, *Food Chem. Toxicol.*, **48**, 2980 (2010).
31. N. Nandakumar, T. Rengarajan, L. Haribabu, S. Perumal, and M. P. Balasubramanian, *Biomedicine & Preventive Nutrition*, **1**, 207 (2011).