

카테킨이 함유된 창상피복제용 하이드로젤의 개발

김 진 · 조은비 · 이기영^{*,†}

전남대학교 신화학소재공학과, *전남대학교 응용화학공학과 & 촉매연구소
(2013년 1월 29일 접수, 2013년 3월 15일 수정, 2013년 3월 15일 채택)

Development of Hydrogel Containing Catechin for Wound Dressing

Jin Kim, Eun Bi Cho, and Ki-Young Lee^{*,†}

Department of Advanced Chemicals and Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

*Faculty of Applied Chemical Engineering & The Research Institute for Catalysis,
Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

(Received January 29, 2013; Revised March 15, 2013; Accepted March 15, 2013)

초록: Catechin(CTEC)은 천연항산화제로 알려져 있고 항염증에 효과적이며 피부 창상치료제로 응용되고 있다. 이 연구는 β -cyclodextrin(β -CD)으로 나노입자화한 CTEC을 poly(vinyl alcohol)(PVA)/pectin(PT) 조성의 하이드로젤에 첨가하였다. 피부상처의 재생피화를 위해 CTEC과 β -CD를 분자복합(molecular complex) 방법에 의해 나노입자 제조를 수행하였다. 하이드로젤에 첨가된 CTEC 나노입자는 250 ± 17.5 nm이며, 입자 내 CTEC의 담지 효율은 처음첨가량의 74%가 담지되었음을 확인하였다. CTEC는 하이드로젤 필름으로부터 pH7.4와 pH5.5 버퍼에서 72시간 동안 각각 $86.51 \pm 3.14\%$ 와 $35.95 \pm 2.14\%$ 의 방출을 보였다. 창상치료 실험에서 CTEC 나노입자가 적재된 PVA/PT 조성의 하이드로젤은 CTEC이 함유된 도포형 젤보다 빠른 치유력을 관찰할 수 있었다.

Abstract: Catechin (CTEC) is well-known as a very powerful antioxidant, containing the effects of anti-inflammation and skin wound healing. In this study, CTEC/ β -cyclodextrin (β -CD) nanoparticles were incorporated into poly(vinyl alcohol) (PVA)/pectin (PT) hydrogel. The composite was designed for the induction of re-epithelialization in skin wound. CTEC/ β -CD nanoparticles were prepared by a molecular complex method. The size of the CTEC nanoparticles formed in the hydrogel was in the range of 250 ± 17.5 nm. The incorporation efficiency of CTEC in the nanoparticles was 74%. The cumulative amounts of CTEC released from the hydrogel containing CTEC nanoparticles in the buffers of pH7.4 and 5.5 were $86.51 \pm 3.14\%$ and $35.95 \pm 2.14\%$ of total CTEC loaded in the hydrogel within 72 h, respectively. Also, in the wound healing test, the CTEC nanoparticles-loaded PVA/PT hydrogel showed faster healing of the wound made in rat dorsum than the CTEC gel.

Keywords: catechin, herbal medicine, transdermal delivery, re-epithelialization.

서 론

항산화능을 가진 catechin(CTEC)은 지질 산화(lipid oxidation)를 억제시키는 기능을 가지고 있으며, 항염증과 항균에 효과적인 것으로 알려져 있다. CTEC의 주성분인 플라보노이드는 의약품과 기능성 식품에 활용하기 위해 제형화 등의 다양한 제형화 공정을 필요로 한다. 특히, 물에 불용성이며 온도, 빛, pH의 조건에 제약을 받고 과량 섭취 시 체내 pH, 효소 반응 및 다른 영양분의 흡수 억제뿐 아니라 저장 기간 동안 빛과 산소에 영향을 많이 받는다. 이 같은 특성들은 기능성 식품

과 의약품으로 활용하기 위해 캡슐화 및 코팅기술을 필요로 한다. 또한 나노입자화 같은 약물 전달 시스템 활용은 그들의 장점을 보호해주고, 서방출을 유도하며, 다른 생리활성 화합물의 양상을 증가시켜 준다. CTEC은 창상 치료에 효과적이며 흉터 형성에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다.^{1,2} 창상의 치유과정은 일반적으로 염증단계, 증식단계 및 성숙단계의 3단계로 구분할 수 있으며 창상의 치유 단계는 확실한 구분 없이 중첩되면서 연속적으로 진행되는 특징을 갖는다.³ 창상은 화농, 삼출물, 괴사성 조직 형성 및 세균에 의해 pH 지수가 달라지게 되며 이에 따라 창상의 회복 거동이 영향을 받게 된다. 이상적인 드레싱 재료로 창상부위를 외부 환경에 노출되는 것을 차단하여 감염을 예방하고 초기 삼출물을 적절히 흡수하여 염증반응을 억제할 수 있어야 한다. CTEC은

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

항균성 및 항염증성이 뛰어난 천연물질로 합성 약물에 비해 저자극이며 무독성이므로 창상치료제로 활용이 가능하다. 시중에 판매되고 있는 창상피복제용 하이드로젤의 대부분은 poly(vinyl alcohol)로 구성되어 있으며 alginate, chitosan이 혼용되어 의료용 소재로 활용되고 있다. 본 연구에서는 수용성이며 무독성인 PVA와 다가양이온으로 용액상에서 산성환경을 조성하는 pectin(PT)을 혼용하여 이온자극에 의해 젤이 형성되는 점을 이용하여⁴ CTEC 나노입자를 첨가한 창상치료용 하이드로젤을 개발하고 드래싱 재료로서의 가능성을 알아보고자 하였다. Martinez 등은⁵ PVA와 PT 함유 하이드로젤에 fluoroquinolone계 항생제인 enrofloxacin을 첨가하여 방출 실험한 연구가 보고된 바가 있다. 본 연구에서는 PVA와 PT를 혼합하여 창상에 활용할 수 있는 최적의 비율을 선별하고 PVA와 PT 하이드로젤에 CTEC 나노입자를 적용시켜 창상보호 및 치료를 위한 창상피복제 재료로 활용가능성을 관찰하였다.

실 험

시약. 본 실험에 사용한 poly(vinyl alcohol)(PVA, M_w 70000 ~100000), pectin citrus peel(PT, galacturonic acid 74.0%), β -cyclodextrin(β -CD)은 Sigma Aldrich Co., Ltd(St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다. Catechin(CTEC)은 (주)향원스파이스에서 제공받아 사용하였다. 그 밖의 시약은 정제과정 없이 사용되었으며 증류수는 3차 증류수를 사용하였다.

CTEC-나노입자의 제조. Molecular host-guest 시스템을 이용하여⁶ 나노입자화를 진행하였다. β -CD는 1134.99 g/mol, CTEC은 290.26 g/mol 분자량을 각각 사용하였다. β -CD 40 mg과 증류수 10 mL를 50 °C에서 30분 동안 교반하였다. CTEC 10 mg을 에탄올 10 mL에 용해시키고 5분 동안 초음파로 분해하고 원심분리를 통해 완벽하게 용해시켰다. CTEC 용액을 200 rpm으로 교반 중인 β -CD용액에 적하시켰다. 혼합된 β -CD/CTEC 용액을 20 °C에서 4시간 동안 냉각시킨 후 혼합된 용액은 상온에서 24시간 동안 50 rpm으로 β -CD 구조 안에 CTEC의 분자가 혼합될 수 있도록 교반시켜 준다. 24시간이 지난 후, 혼합된 용액은 질소퍼지 후 동결시켜 24시간 동안 동결 건조하여 나노 입자화된 분말을 얻었다.

PVA/PT 하이드로젤의 제조. PVA/PT 하이드로젤을 얻기 위해 냉동과 해동(freezing-thawing)을 3번 반복하여 제조하였다. PVA과 PT를 4:6, 5:5, 6:4 wt% 비율로 100 mL 증류수에 넣고 호모게나이저(Basic T25; IKA Co., Wilmington, NC, USA) (12500 rpm)로 10분간 혼합시킨 후, 고압멸균기(AC-13, Lap Camp Co., Ltd, Korea) (121 °C, 90분)를 이용하여 용해시켰다. PVA/PT 혼합용액을 기포 제거를 위해 메스실린더에 넣어 상층에 존재하는 소량의 기포를 pipette을 이용하여 제거하였다. 기포가 빠진 PVA/PT 용액에 CTEC 나노입자 1 g 첨가하고 200 rpm에서 3시간 교반시킨 후 petri dish에

20 g씩 넣고 -80 °C에서 4시간 방치하고, 상온에서 8시간 동안 해동시키는 과정을 총 3회 진행하여 하이드로젤을 형성시켰다.

CTEC-PVA/PT 하이드로젤의 FTIR 분석. 하이드로젤에 CTEC 나노입자의 함유 전, 후의 화학 구조의 변화를 살펴보기 위하여 적외선분광광도계(FTIR spectroscopy, Shimadzu-IR Prestige-21, Japan)를 이용하여 분석하였다. 구 KBr pellet을 만들어 시편을 제조하였으며, 시료와 KBr을 무게비 1:100으로 잘 혼합하여 pellet을 제조하고 60 °C에서 12시간 동안 감압 건조를 이용하여 수분을 제거한 후 4000~500 cm^{-1} 영역에서 측정하였다.

CTEC-나노입자 방출실험. CTEC 하이드로젤로부터 CTEC의 방출 패턴을 살펴보기 위해 하이드로젤(5 g)을 50 mL의 pH 7.4와 5.5 용액에 각각 담근 후 shaking incubator(VS-8480SF, Vision Scientific Co., Daejeon, Korea)에 넣고 80 rpm으로 37 °C에서 *in vitro* 방출실험을 수행하였다. 일정한 시간 간격으로 상등액을 1 mL을 취하여 UV/VIS spectrophotometer(shimadzu-160A, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)를 이용하여 340 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였고, 채취한 양만큼 pH용액을 첨가하여 동일한 조건을 유지하며 방출실험을 계속하였다. CTEC을 농도별로 측정하여 검량선을 구하고 누적 방출량 식에 대입하여 방출된 CTEC의 함량을 정량화하였다.

$$\text{누적방출량(Cumulative release, \%)} = \frac{N_0}{N} \times 100$$

(N : 약물 담지량, N_0 : 시간에 따라 방출된 약물의 양)

하이드로젤의 물성분석. 제조된 하이드로젤의 젤강도를 측정하여 기계적 물성을 예측하였다. CTEC 나노입자의 첨가에 따른 하이드로젤의 물성의 변화를 관찰하였다. 젤의 압축강도는 만능물성시험기(Compac-100, Sun Scientific Co., Ltd, Tokyo, Japan)를 이용하여 상온에서 평가하였다. 하이드로젤의 시편 두께는 3 ± 0.5 mm, 지름은 10 mm로 준비하였고 압축강도 측정 시 크로스 헤드(cross head) 속도는 120 mm/min, 시편이 50% 이상 변형이 이루어 질 때의 값을 측정하였다.

팽윤도는 함수율로 나타낼 수 있다. 제조된 하이드로젤을 물에 24시간 침지한 후 꺼내어 젤 표면에 물을 닦은 후 무게를 잰다. 무게의 변화가 없을 때까지 팽윤시킨 젤의 무게가 팽윤된 젤의 무게(W_s)이다. 팽윤된 젤의 무게(W_s)와 건조된 젤의 무게(W_d)로부터 팽윤도를 계산하였다.

$$\text{팽윤도(Swelling ratio, \%)} = (W_s/W_d) \times 100$$

형태관찰. 하이드로젤 내부에 존재하는 CTEC 나노입자의 모폴로지는 주사전자현미경(SEM, S-4100, Hitachi, Japan)을 통하여 관찰하였으며, 시료 내 수분을 제거하기 위하여 동결 건조기에서 건조한 후 이를 gold coating하여 측정하였다.

세포독성. 하이드로젤 필름의 세포 독성을 측정하기 위해 ISO 10993 근거하여 멸균된 하이드로젤 필름을 세포배양액(DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco)에 넣어 37 °C에서 24시간 이상 배양하여 용출액을 제조하였다. 96 well tissue culture plate에 1×10^5 cells/mL로 각 well 당 100 μ L씩 분주하여, 24시간 동안 배양한 RAW 264.7에 대조군으로 세포에 배지만 처리하였고 실험군에는 하이드로젤 용출액(100 μ L)을 처리하였다. 24시간 후 약물이 포함되어 있는 배지에 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액을 처리하여 37 °C에서 4시간 동안 반응시킨 후 570 nm에서 ELISA reader(ELX808, Biotek Instruments, Vermont, USA)을 이용하여 측정하였다.

창상실험. 실험대상 SD rats을 마취 전 24시간 동안 절식 시켰고, 물은 공급하였다. 모든 실험군에서 창상유발 한 시간 전에, 줄레틸50과 림폰을 (1:2)비율로 혼합하여 30 μ L 사용하여 근육 주사로 마취시킨 후, 전기제모기로 백서의 등 부위를 제거하였다. 등 부위에 10% povidine-iodine과 70% ethanol을 각각 도포하여 소독한 뒤, 등 부위에 소독된 수술용 가위를 이용하여 직경 2 cm×2 cm의 크기로 진피층을 포함한 전층 결손 창상을 유발하였다. 총 세 그룹으로 나뉘어 실험을 진행하였다. CTEC이 첨가되지 않은 도포형 젤 군, CTEC이 첨가된 도포형 젤 군 그리고 CTEC 나노입자가 첨가된 하이드로젤을 처리한 그룹으로 나뉘어 창상 치유 효과를 측정하였다. 도포형 젤 제형의 구성은 Table 1에 나타났다. 각각의 처리군은 5마리씩 실험에 사용하였다. 이후 각 처리군의 동일한 환경을 제공하고자 멸균된 거즈(Tegaderm; 3M Health Care, USA)를 덮고, 그 위에 탄력밴드(Coban; 3M Health Care, USA)로 움직임에 지장이 없도록 감아주었다. 동물실험은 전남대학교 용봉캠퍼스 동물실험 윤리 위원회에 적합함을 승인받고(CNU IACUC -YB-2012-36) 실험하였다.

육안적 상처 변화의 관찰. 상처치료의 진행 과정을 관찰하기 위해 창상 유발 시작 점부터 5일 간격으로 digital camera(CAMEDIAM, Olympus Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 각 군별로 일정 거리에서 촬영하여 상처의 변화를 육안적으로 관찰하였다. 또한 객관적인 지표로 나타내기 위하여 digital

calliper(Mitutoyo Co., Kawasaki, Japan)로 창상의 면적을 측정하였다. 창상 치유율은 창상부의 면적변화를 선행연구에서^{7,8} 제시한 방법으로 계산하였다.

$$\text{창상 치유율(\%)} = \frac{W_o - U_i}{W_o} \times 100$$

$$\text{기간별 치료 점유율(\%)} = \frac{U_b - U_i}{W_o} \times 100$$

W_o : 창상 유발 직후 창상부 면적

U_i : 측정일 창상부 면적

U_b : 이전 측정일 창상부 면적

조직학적 검사. 창상유발 후 20일 경과한 후 실험동물은 보건복지부고시 제88-9호의 실험동물 관리 지침서 등에 관한 기준에 명시된 항정신성 약의 과잉투여에 의한 방법에 따라 ethyl ether를 이용하여 조직 검사용 실험동물을 안락사시켰다. 원형 창상 전체가 포함된 조직을 채취하고, 10% 중성 formalin 용액에 24시간 고정한 후, 창상 중앙을 통과하는 절편을 취하여 탈수시킨 후 파라핀 블록에 포매하였다. 조직을 조직절편기를 이용하여 절단한 다음 polylysin으로 코팅된 slide에 붙여 파라핀 제거 및 함수과정을 거친 후 Hematoxylin-Eosin 염색과 Masson's trichrome 염색을 실시하였다.

통계처리. 모든 실험 결과는 평균값과 표준편차로 표시하였다. 대조군과 실험군 사이의 통계학적 유의성 검정은 student's t-test로 비교하였으며 p 가 0.05 이하인 것과 0.01 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

결과 및 토론

CTEC 생리활성 함량 분석. 페놀 및 플라보노이드의 항염 작용과 창상작용의 실험에 의하면 플라보노이드는 급·만성 염증 억제작용이 강함과 동시에 육아종 형성 및 창상장력을 강하게 억제하며 이러한 억제작용과 항염작용이 거의 비례되어 플라보노이드가 항염작용이 강하면 강할수록 염증세포 침윤을 억제시킴과 동시에 섬유아세포와 콜라겐(collagen) 합성 등의 상관성을 가지고 있어 창상 실험에 매우 중요한 요소이다.⁹⁻¹¹

실험에 사용된 CTEC의 phytochemical 정성 분석은 페놀 및 플라보노이드, DPPH를 이용한 자유라디칼 소거능에 대한 함량을 계산하였다(Table 2). Gallic acid, tannic acid를 기준으로 총 페놀의 함량은 111 ± 0.023 , 148.7 ± 0.03 mg/g의 함량을 가졌으며, quercetin를 기준으로 한 플라보노이드의 함량은 75 ± 0.017 mg/g이 나타났다. 실험에 사용한 CTEC은 식용이 가능한 분말로 시료 2 g/kg의 농도로 경구 투여 시 안전했으며 그 밖의 독성이 나타나지 않았다.

CTEC의 pH분석. CTEC의 창상치유제로 사용하기 위해 외부의 환경에 의한 영향을 줄이고 고유의 약산성의 성질로

Table 1. Compositions of Gel Formulations

(Total volume : 100 mL)

Ingredients	Formulations
CTEC(% , w/w)	1
Carbopol934(% , w/w)	2
Propylene glycol	2 mL
Ethanol	5 mL
Triethanolamin	q.s to neutralize the gel base
Water	q.s

*q.s: Quantum satis, quantum sufficit.

Table 2. Antioxidant Activity, Polyphenol and Flavonoid Contents of the Catechin

Sample	DPPH radical inhibition IC ₅₀ (mg/mL)	Contents (mg/g)		
		Polyphenol		Flavonoid
		Gallic acid	Tannic acid	Quercetin
Catechin	30.54	111±0.023	148.7±0.03	75 ± 0.017

All values are mean ±SD of triplicate determinations.

Table 3. pH Measurement of CTEC Solution

	Purified solvent	CTEC	CTEC capsule
Distilled water	6.573±0.06	3.883±0.06	4.143±0.017
Ethanol	6.937±0.07	5.060±0.005	5.915±0.036
PBS buffer	7.2±0.008	7.107±0.008	7.245±0.013

All values are mean±SD of triplicate determinations.

하이드로젤에 첨가시, 하이드로젤의 해리를 막기 위한 나노입자화를 진행하였다. CTEC은 용매에 따라 pH 값의 영향을 많이 받는 것으로 관찰되었다(Table 3). 일반적으로 피부의 pH 지수는 4~6 정도의 약산성으로 유지되는데, 각질층과 피부 내층으로부터 나오는 아미노산, 지방산 및 락트산은 피부를 약산성으로 유지시켜 주며 외부 물질에 대해 보호장벽 역할을 한다.¹² 그러나 창상의 경우 화농, 삼출물, 괴사성 조직

및 세균에 의해 pH 지수가 달라지게 되며, 이에 따라 창상의 회복 거동이 영향을 받게 된다. 증류수로 용해한 CTEC의 약산성 특성은 에탄올로 용해 시 일반적 피부 pH로 변화되는 것을 관찰하였고, 에탄올에 용해시켜 CTEC을 나노입자화하여 드레싱용 하이드로젤에 적용하였다.

CTEC-나노입자 형태. 실험에 사용된 CTEC의 SEM 사진으로 Figure 1(a)는 1~100 µm의 불균일한 크기의 구형 형태를 관찰할 수 있었다. Figure 1(b)는 1%의 CTEC을 에탄올에 용해시켜 건조시킨 후 관찰한 결과 100~200 nm 크기로 균일하게 분산되어 있는 것을 확인할 수 있었다. CTEC의 pH 조절과 외부환경에 의한 플라보노이드의 성분을 보호하고 드레싱용 하이드로젤에 첨가하고자 나노입자화하여 동결 건조 후 얻은 분말의 이미지이다. 얇은 필름막과 같은 불균일한 형태를 관찰할 수 있었다(Figure 1(c)). Figure 1(d)는 동결건조 후 얻은 분말을 증류수에 분산시켜 관찰한 결과 200 nm 정도의

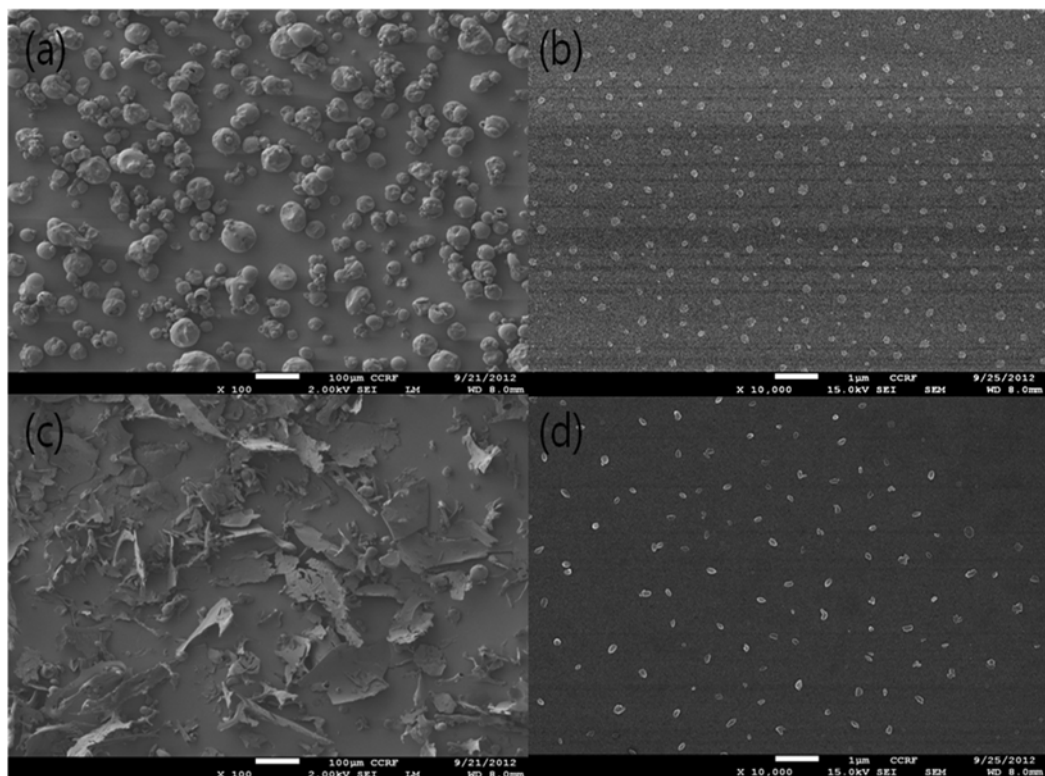


Figure 1. SEM Morphology of (a) CTEC; (b) CTEC solution; (c) CTEC loaded nanoparticles after freeze drying; (d) CTEC nanoparticles solution.

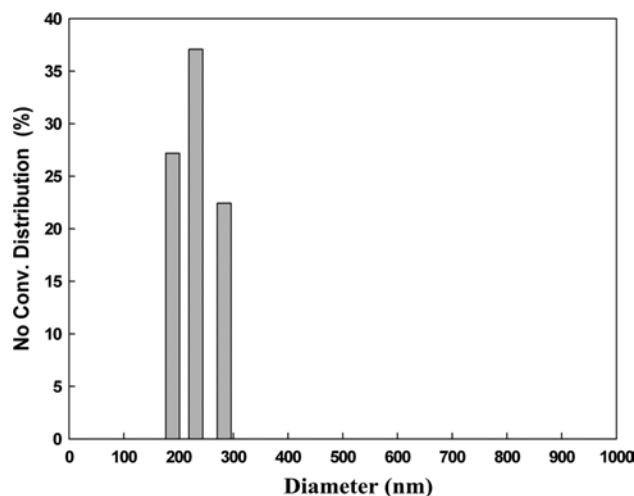


Figure 2. Particle size distribution of CTEC nanoparticles.

크기로 균일하게 분산된 입자를 관찰할 수 있었다. 나노입자 내 CTEC의 담지 효율은 처음 첨가량의 74%가 담지되었음을 관찰하였다. CTEC-나노입자의 입자분포는 250 ± 17.5 nm로 단분산 형태의 일정한 크기를 갖는 입도분포를 보여주었다(Figure 2).

CTEC-함유 하이드로젤의 표면. Figure 3은 PVA/PT 하이드로젤 필름의 대표적인 사진과 모폴로지를 SEM으로 관찰한 결과이다. Figure 3(a)의 경우 CTEC이 함유되지 않은 젤의 사진이며, CTEC이 함유된 Figure 3(b)의 경우 CTEC 고유색인 주황빛을 띠는 하이드로젤을 관찰할 수 있었다. 나노입자가 함유된 하이드로젤을 SEM으로 관찰한 결과 CTEC 나노입자가 표면에 분포되어 있는 것을 관찰할 수 있었다.

PVA/PT 하이브리드 젤의 제조. PVA/PT 고분자를 냉동-해동방법에¹³ 의해 젤을 제조하였으며 탄력성을 가진 투명한 젤을 제조하였다. Figure 4에 PVA/PT 젤과 CTEC-PVA/PT 젤 시편의 IR 스펙트럼을 나타내었다. 나노입자화된 CTEC의 특

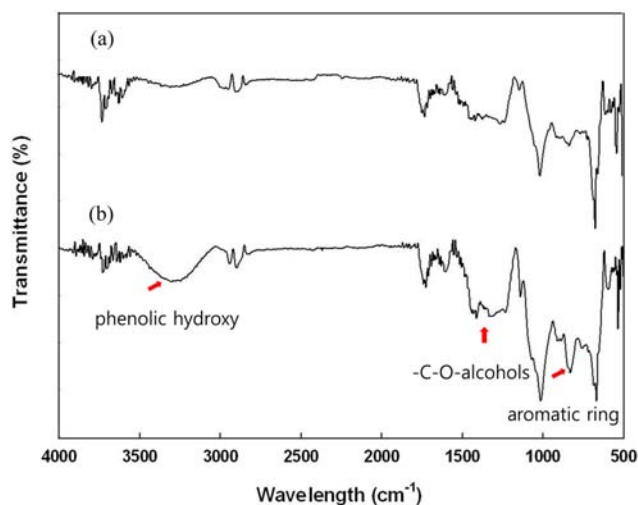


Figure 4. FTIR spectra of PVA/PT hydrogel (a); PVA/PT hydrogel containing CTEC nanoparticles (b).

성밴드가 서로 겹치게 되어 스펙트럼 상의 큰 차이를 관찰하기 어렵지만, 700와 1450 cm^{-1} 부근에서 $-\text{COOH}$ 의 카르보닐 흡수밴드가 미약하게 나타남을 확인 할 수 있었다. Chen 등의 연구에서¹⁴ CTEC의 함량이 증가됨에 따라 나타나는 고유 피크의 특성과 같은 경향을 관찰하였다.

CTEC-나노입자 방출실험. CTEC의 방출 특성을 Figure 5에 나타내었다. 정상 조직과 염증병소의 pH를 고려하여 방출 실험은 pH 7.4와 5.5. 조건에서 각각 수행하였다. CTEC는 하이드로젤 필름으로부터 pH 7.4와 5.5 버퍼에서 72시간 동안 각각 $86.51 \pm 3.14\%$ 와 $35.95 \pm 2.14\%$ 의 방출을 보였다($p > 0.05$). 산성의 성질을 가진 CTEC의 수소이온(H^+)은 산성 조건에서 안정하게 잘 결합한 상태로 존재하여 방출량이 적었으며, 염기성 조건에서는 CTEC의 수소이온(H^+)과 수산화 이온($-\text{OH}$)이 결합하면서 나노입자 내의 CTEC 방출이 증가되는 것을 관찰할 수 있었다.

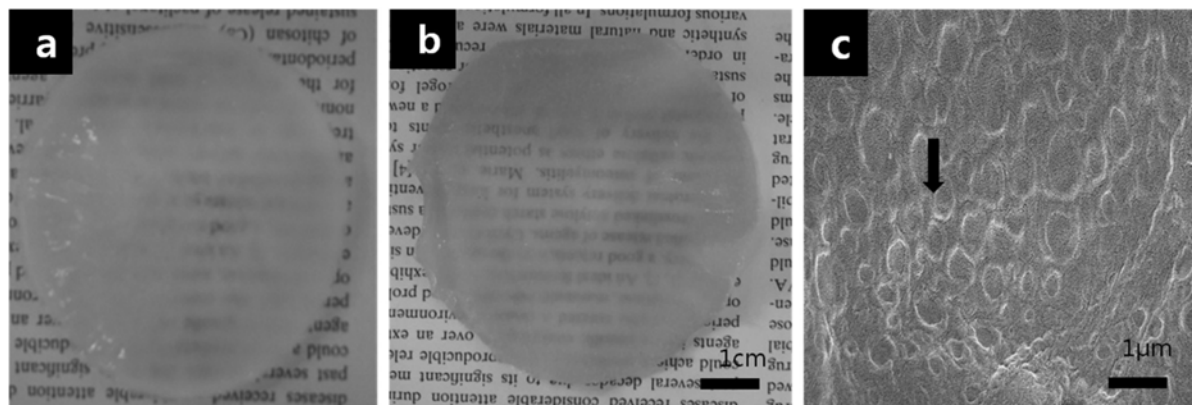


Figure 3. Digital photoimages of PVA/PT hydrogels (a); PVA/PT hydrogel containing CTEC nanoparticles (b); SEM image of PVA/PT hydrogel containing CTEC nanoparticles (c) (applied voltage=2.0 kV, $\times 10000$).

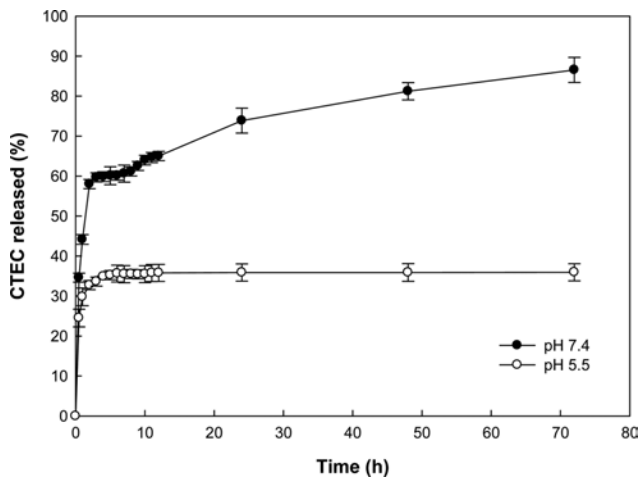


Figure 5. CTEC release properties from the hydrogel containing CTEC nanoparticles in pH 5.5 or 7.4 buffers.

하이드로젤의 강도. Figure 6은 PVA:PT(4:6, 5:5, 6:4)비율로 구성된 하이드로젤과 같은 비율에 1% CTEC 나노입자가 첨가된 하이드로젤의 젤강도를 측정된 값을 그래프화했다. CTEC이 함유되지 않은 하이드로젤은 PVA의 함량이 증가될수록 강도가 높아지는 것을 관찰할 수 있었다. CTEC 나노입자가 함유된 하이드로젤 또한 같은 양상을 보였지만, CTEC이 함유된 하이드로젤은 PVA와 PT의 이온자극에 의해 형성되는 젤에 CTEC의 용액상에서의 산성인 성질과 OH 그룹에 의해 하이드로젤이 형성시 수분함량이 증가되면서 하이드로젤 강도에 영향을 주는 것을 확인할 수 있었다.¹⁵

하이드로젤의 흡수도. CTEC 나노입자가 함유된 PVA:PT(4:6, 5:5, 6:4)비율의 하이드로젤의 흡수도를 확인하였다.

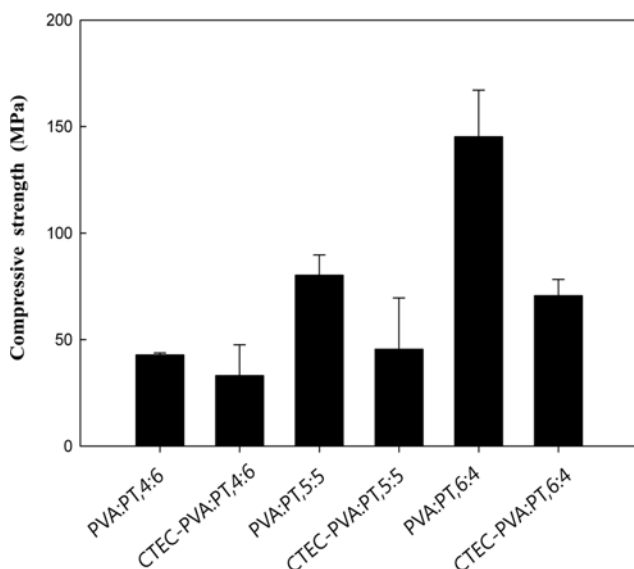


Figure 6. Compress strength of PVA/PT hydrogel and PVA/PT hydrogel containing CTEC nanoparticles.

Figure 7에서 PVA의 함량이 높을수록 수분율이 증가하는 경향을 보였으며, CTEC 나노입자를 첨가한 하이드로젤에서도 같은 양상을 관찰할 수 있었다. 특히 5:5비율로 구성된 하이드로젤은 CTEC 나노입자를 첨가하여도 팽윤도에 큰 변화를 관찰할 수 없었다. 창상에 사용되는 드레싱은 밀폐할 때 상처뿐만 아니라 주위 정상 피부까지도 밀폐하게 되므로 상처면에서의 과도한 삼출액과 정상 부위에서 발생하는 수분이 모이면 주위 정상 피부의 침연을 일으킬 수 있다.^{16,17} 따라서 드레싱의 팽윤성은 창상피복제 개발에 매우 중요한 요소이다.

하이드로젤의 세포독성. MTT assay를 이용하여 관찰한 CTEC 나노입자 함유 하이드로젤의 농도별 용출액의 세포독성 평가는 모든 농도에서 95% 이상으로 독성이 없는 것을 관찰하였다. 농도에 따라 Figure 8에 나타났다. 실험 결과 각 농도별로 처리한 후 세포가 95% 이상의 생존율을 보여 본

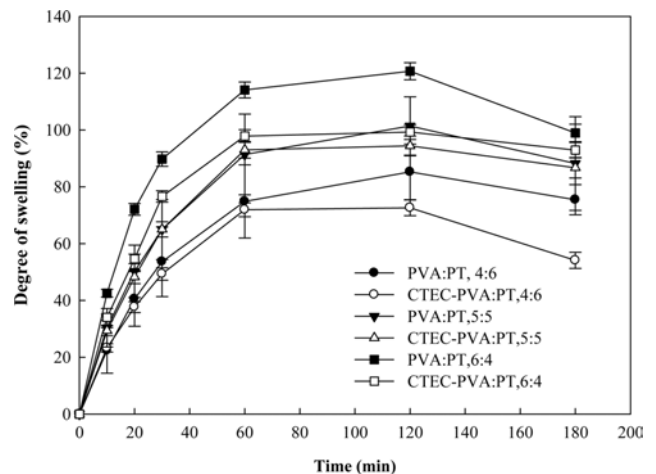


Figure 7. Swelling properties of PVA/PT hydrogel and PVA/PT hydrogel containing CTEC nanoparticles.

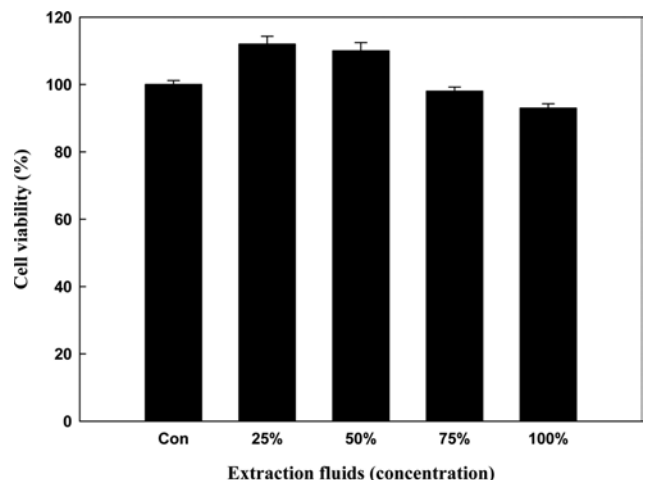


Figure 8. Cell viability of RAW 264.7 cells treated with the extracts of the hydrogel containing CTEC nanoparticles.

실험에 이용된 젤은 세포독성이 없는 생체 소재로 활용이 가능하며, 다양한 생체재료로의 응용도 예측할 수 있다.

창상에 대한 육안적, 조직학적 평가. Figure 9는 창상유발 당일에서 창상유발 후 15일 경과시점까지 창상유발군(control, CTEC gel, CTET-hydrogel)에서 선택한 동일 개체의 창상부분을 5일 간격으로 촬영하여 상처면적 변화를 나타낸 것이다. Figure 9(a), (b), (c)는 SD rats 피부의 H&E 염색후 대조군과 실험군의 조직학적으로 관찰한 사진이다. Figure 9(a)는 창상유발 당일에서부터 창상유발 후 15일 경과시점까지 창상유발군의 대조군(control group)으로 상피층이 형성되지 않고 얇

고 불균일한 표면을 관찰할 수 있었다. Figure 9(b)는 CTEC이 함유된 도포형 젤을 처치한 그룹으로 상피층에 딱지가 형성되었으나, 진피층에 혈관 및 세포 형성을 관찰할 수 없었다. Figure 9(c)의 경우는 CTEC이 함유된 하이드로젤 처치군으로 일차적으로 scar에 습윤 상태가 유지되고 나노입자화된 CTEC의 방출로 대조군에 비해 섬유아세포의 증식 및 교원질의 형성을 관찰할 수 있고 특히, 모낭의 재생을 촉진시켜 창상부위의 재생 효과가 뛰어난 것을 관찰할 수 있었다. Figure 9(d), (e)는 창상 부분의 크기를 5일 간격으로 digital calliper로 측정하여 나타낸 결과 값이다. Figure 9의 육안적

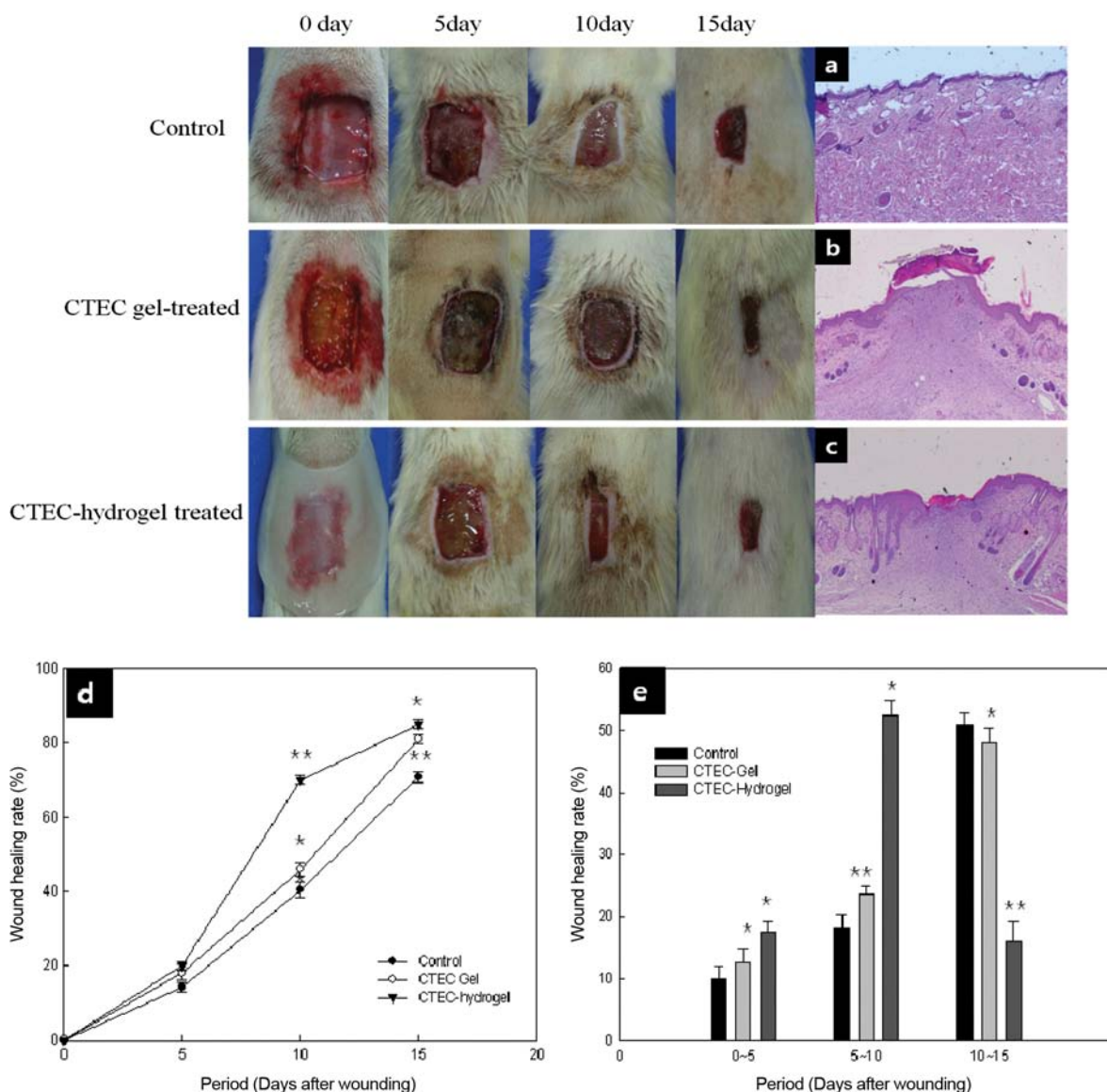


Figure 9. Representative photographs of wound spot at 0, 5, 10, and 15 days. Histopathological studies, the right photographs (a,b,c) were taken at 15 days after injury. (a) Control; (b) CTEC gel; (c) CTEC-PVA:PT, 5:5 hydrogel. Each wound on the indicated is the representative of five rats in each group. The data represent the mean±SD of five rats(n=5). (d) Wound healing rate (repaired wound size) in the experimental group and the control group. (e) Occupational rate of wound healing in the experimental group and the control group (* p <0.05, ** p <0.01).

으로 관찰되듯이 창상유발 당일에는 모든 창상유발 군에서 염증과 삼출액이 분비되고, 급성 염증의 변화는 창상유발 후 10일에서 처치군에 따라 삼출액 분비와 부종의 감소가 관찰되었다. 특히 창상유발 5일 경과 후 CTEC이 함유되지 않은 젤을 도포한 control군과 CTEC이 함유된 젤 도포군은 미비한 차이를 보였으나 CTEC은 Folkman 등의 보고와¹⁸ 같이 상처재생 시 혈관형성 과정에 산소와 영양분을 필요로 하며 충족시 새로운 피부가 돌아난다는 연구 결과를 바탕으로 상처에 의한 염증세포를 억제하고 일산화질소를 조절하여 도움을 줄 것으로 판단하였다. Kapoor 등의 연구에서¹⁹ CTEC은 새로운 혈관을 형성하는데 효과적이며 특히 창상부위의 조직형성에 도움을 주는 것으로 보고하였다.

CTEC 나노입자가 함유된 하이드로젤을 처치한 군에서는 창상주위의 수분을 관찰할 수 있었다. 창상유발 10일 경과 후 삼출액 분비가 없어지고 창상 면적이 감소하면서 상처가 회복되기 시작했다. CTEC 함유 하이드로젤을 처치한 그룹은 다른 그룹에 비해 눈에 띄게 창상반경이 감소된 것을 관찰할 수 있었으며 창상 주변의 조직 또한 습윤 상태를 확인할 수 있었다. 15일 경과시 control 군에서 혈액 및 피딱이 형성되어 있는 것을 관찰하였고, CTEC 젤 처치 그룹에서도 피딱지가 형성되어 있었으며 매우 건조하고 마른 상태의 피부의 재생피 조직을 관찰할 수 있었다. 하지만, CTEC 나노입자가 함유된 하이드로젤을 처치한 그룹에서는 습윤 상태의 재생피화를 관찰할 수 있으며 조직 병리학적 관찰에서 또한 대조군에 비해 섬유아세포의 증식 및 교원질의 형성을 관찰할 수 있고 특히, 모낭의 재생을 촉진시켜 창상부위의 재생 효과가 뛰어난 것을 관찰할 수 있었다. Hwang 등의 연구에서와²⁰ 같이 하이드로젤 형태의 드레싱 제제의 습윤 상태는 창상 치유에 더 효과적인 것을 알 수 있었다.

결 론

본 연구는 항산화효과가 탁월하고 항염증에 효과적이며 혈관생성에 도움을 주는 CTEC을 함유시킨 창상피복제의 개발에 대한 연구이다. 실험에 사용된 CTEC의 생리활성을 관찰하기 위해 DPPH 자유 라디칼 소거능 및 플라보노이드, 페놀의 함량을 측정하고, PVA와 PT을 이용한 창상피복제용 하이드로젤에 첨가하기 위한 CTEC 나노입자화를 진행하였다. CTEC 나노입자가 함유된 PVA/PT 하이드로젤의 특성을 관찰하고, 외과적인 창상을 유도하여 SD rats에서의 CTEC 함유 하이드로젤의 효능을 관찰하였다. 하이드로젤의 습윤환경이 창상조직을 치유하는데 도움을 주며 CTEC 나노입자 또

한 재생피화에 효과적이며 창상치료제로 활용이 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글: 본 연구는 교육과학기술부와 한국연구재단의 지역혁신 인력양성사업에 의해 지원되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. M. Poor, R. Howard, I. Hall, and I. Appleton, *Am. J. Pathol.*, **165**, 299 (2004).
2. Y. Qin, H.W. Wang, T. Karuppanapandian, and W. Kim, *Chin. J. Traumatol.*, **13**, 91 (2010).
3. H. J. Lim, H. T. Kim, E. J. Oh, J. H. Chio, H. D. Ghim, D. G. Pyun, S. B. Lee, D. J. Chung, and H. Y. Chung, *Polymer(Korea)*, **34**, 363 (2010).
4. N. Z. Yao, C. Huang, and D. D. Jin, *Orthop. Surg.*, **1**, 231 (2009).
5. Y. N. Martinez, L. Piñuel, G. R. Castro, and J. D. Breccia, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **167**, 1421 (2012).
6. C. Yan, Z. Xiu, X. Li, and C. Hao, *J. Mol. Graph. Model.*, **26**, 420 (2007).
7. H. S. Lee, J. T. Cheong, H. J. Park, T. K. Shin, J. H. Kim, and J. M. Lee, *J. Vet. Clin.*, **22**, 43 (2005).
8. K. T. Hwang, O. K. Kweon, H. M. Woo, D. Y. Kim, and T. C. Nam, *J. Vet. Sci.*, **39**, 645 (1999).
9. M. Bao and Y. Lou, *J. Cardiovasc. Pharm.*, **48**, 834 (2006).
10. H. Kim, T. Kawazoe, and D. W. Han, *Wound Repair Regen.*, **16**, 714 (2008).
11. K. Gomathi, D. Gopinath, M. R. Ahmed, and R. Jayakumar, *Biomaterials*, **24**, 2767 (2003).
12. K. Chikkan and H. Takahashi, *Clin. Dermatol.*, **13**, 299 (1995).
13. C. M. Hassan and N. A. Peppas, *Adv. Polym. Sci.*, **153**, 37 (2000).
14. Y. C. Chen, S. H. Yu, G. J. Tsai, D. W. Tang, F. L. Mi, and Y. P. Peng, *J. Agric. Food. Chem.*, **58**, 6728 (2010).
15. S. Hwang and J. Lee, *Polymer(Korea)*, **35**, 332 (2011).
16. M. S. Lee, J. C. Yang, S. H. Kim, I. B. Song, M. S. Kim, G. S. Khang, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **30**, 259 (2006).
17. S. K. Han and S. J. Choi, "The Demand of Dressing", in *Advance in Wound Care*, H. J. Yoo, J. H. Kim, M. H. Park, K. K. Lee, J. H. Lee, Y. S. Yoo, S. K. Han, and G. Yushimize, Editors, Korea Medical Book Publisher Co., Seoul, p 167 (2003).
18. J. Folkman and Y. Shing, *J. Biol. Chem.*, **267**, 10931 (1992).
19. M. Kapoor, R. Howard, I. Hall, and I. Appleton, *Am. J. Pathol.*, **165**, 299 (2004).
20. M. R. Hwang, J. O. Kim, J. H. Lee, Y. I. Kim, J. H. Kim, S. W. Chang, S. G. Jin, J. A. Kim, S. S. Han, S. K. Ku, C. S. Yong, and H.G. Choi, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **11**, 1092 (2010).