

비타민 C를 함유한 락타이드 글리콜라이드 공중합체 지지체에서의 항염증, 항산화 효과

장나금 · 이선의 · 차세롬 · 김창현 · 송정은 · 권순용* · 강길선†

전북대학교 BIN융합공학과, 고분자나노공학과, 고분자융합소재연구소

*가톨릭대학교 의과대학 여의도성모병원 정형외과

(2015년 8월 18일 접수, 2015년 9월 22일 수정, 2015년 9월 22일 채택)

Inflammatory Response and Antioxidation on Vitamin C Impregnated Poly(lactide-co-glycolide) Scaffold

Na Keum Jang, Seon Eui Lee, Se Rom Cha, Chang Hyun Kim, Jeong Eun Song,
Soon Yong Kwon*, and Gilson Khang†

Dept. of BIN Fusion Tech & Dept. of Polymer Nano Sci. Tech., Chonbuk National University,
567 Baekje-daero, Jeonju 54898, Korea

*Dept. of Orthopedic Surgery, Yeouido St. Mary's Hospital, Catholic University of Korea,
62 Yeouido-dong, Yeongdeungpo-gu, Seoul 07345, Korea

(Received August 18, 2015; Revised September 22, 2015; Accepted September 22, 2015)

초록: Poly(lactide-co-glycolide) (PLGA)는 대표적인 생분해성, 생체적합성을 가진 고분자로 조직공학 및 약물전달체로 널리 적용되고 있다. 그러나 이식 후에 PLGA는 에스테르결합으로 인해 가수분해가 일어나 분해산물의 영향으로 pH가 낮아져 조직에 염증반응을 유발한다. 비타민 C는 보통 식품, 약품에서 사용되고 있고, 강력한 항산화와 항염증 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 그래서 조직공학 전달체로서의 PLGA와 비타민 C를 연구하였다. 본 연구에서는, 비타민 C가 포함된 PLGA 지지체를 제작하여 비타민 C의 생체 외 염증반응을 평가하였다. 지지체는 PLGA 무게당 3, 5, 10 wt%의 비타민 C를 첨가하여 캐스팅/염 추출법으로 3차원 비타민 C/PLGA 지지체로 제작하였다. 지지체의 물리적 특성은 압축강도와 SEM을 통해 조사하였다. 세포의 부착과 증식률은 MTT와 SEM 분석을 통해 실험하였다. 또한 RT-PCR과 FACS를 통해 항염증, 항산화 효과를 확인하였다. 결과는 공통적으로 5 wt% 비타민 C/PLGA 지지체가 항산화, 항염증 효과, 세포의 증식률의 면에서 다른 지지체보다 우수한 것으로 나타났다. 따라서 항염증 효과를 기초로하여, 5 wt% 비타민 C/PLGA 지지체는 미래의 조직공학에 쓰일 생체재료로 적용될 수 있을 것으로 사료된다.

Abstract: Typical biodegradable polymer poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) has been widely applied to tissue engineering scaffolds and drug delivery systems. However, after the implantation, the ester bond of PLGA gets hydrolyzed and the resulting degradation products decrease the pH in the surrounding tissue causing local inflammatory reaction. Vitamin C is commonly used in food, pharmaceutical products and is known to exert potent antioxidant and anti-inflammatory activities. Thus, vitamin C is used with PLGA as carrier in tissue engineering. In this study, vitamin C incorporated PLGA scaffolds were fabricated and further the effects of vitamin C were evaluated on the inflammatory responses *in vitro*. The three-dimensional PLGA scaffolds were fabricated by adding of 3, 5, and 10 wt% vitamin C via a casting extraction method. Then the samples were examined; the mechanical properties of compressive strength and SEM. The cell attachment and proliferation were also studied the MTT, SEM, anti-inflammatory and antioxidant effects by RT-PCR and FACS. Results showed that 5 wt% vitamin C/PLGA scaffold was better than other scaffolds in terms of anti-inflammatory, antioxidant, cell attachment and proliferation. Based on the low level of inflammatory responses, the 5 wt% vitamin C/PLGA scaffold can be envisioned as a promising candidate for future biomedical applications.

Keywords: PLGA, vitamin C, scaffold, inflammation, ROS.

†To whom correspondence should be addressed.

E-mail: gskhang@jbnu.ac.kr

©2016 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

서 론

조직공학이란 생체에서 완전히 흡수되고 세포와 친화력이 있는 적절한 지지체에 조직 세포를 체외 배양하여 실제의 장기와 유사한 구조와 기능을 갖는 인공 조직을 형성시키고 생체 조직에 이식함으로써 연구가 시도되고 있는 새로운 의료 과학 기술 분야이다.¹⁻³ 조직공학에 사용되는 지지체는 생체적 합성 재료로서 세포의 부착과 성장을 유도하고, 손상된 조직을 복원하는 기간 동안 지지체가 그 형태를 유지하여 세포가 조직을 잘 복원할 수 있도록 제작되어야 한다.^{4,7} 조직공학 적용을 위한 이상적인 지지체는 세포의 기능과 증식을 지속시켜주고 세포의 부착을 충분히 도와주어야 하며 세포로부터 방출되는 산소와 영양분을 확산 및 촉진시켜줄 수 있는 다공 구조를 가져야 한다.^{8,9} 또한 생체 내에서 세포가 잘 정착할 수 있게 도와주고, 세포의 고유 표현형의 유지는 물론 ECM을 분비함으로써 조직재생을 촉진시켜야 한다. 이와 더불어 체내에 이식된 후에도 일정기간이 지나면 안전하게 흡수되고 분해하는 생체적합성을 가져야 한다. 그래서 지지체는 생체적합성, 생분해성, 흡수성, 전달 신호, 적당한 물리적 특성 및 쉽게 고안된 모양을 가지고 있어야 한다.¹⁰⁻¹² 조직공학담체로 사용되는 고분자는 천연고분자와 합성고분자로 분류할 수 있다. 천연 고분자는 알지네이트, 히아루론 산, 젤라틴, 검, 콜라겐, 소장 점막하조직, 키토산 등이 여기에 속한다. 이러한 천연 고분자는 생분해성이 우수하며, 생체적합성과 낮은 염증 반응을 갖는 장점이 있다.^{13,14} 그러나 천연 고분자 단독으로 사용되었을 경우 기계적 물성이 약하여 충전제 형태로 사용될 수밖에 없는 한계점을 가지고 있다.¹⁵

합성고분자는 주로 poly(lactic acid)(PLA), poly(glycolic acid)(PGA), poly(lactide-co-glycolide)(PLGA), polycyanoacrylate(PCA), polyurethane(PU) 등 생분해성 고분자로서 조직공학 분야에 쓰이고 있다.¹⁶

그 중 PLGA는 우수한 물리적 특성, 생체 적합성 및 생분해성으로 조직공학적 지지체뿐만 아니라 약물전달 시스템의 디바이스로도 응용되고 있다. PLGA는 다양한 형태의 지지체로 활용되고 있으며, 가수분해되어 젖산 및 글리콜 산으로 분해되는 것으로 알려져 있다. 또한 PLGA는 락타이드와 글리콜라이드 비율을 통하여 분해속도를 조절할 수 있다. 그러나 분해산물인 산성 물질로 인해 주변조직에 염증반응이 생겨 PLGA 표면과 이물거대세포간의 조직반응연속체가 일어남으로써 pH가 더 낮아진다고 알려져 있다.¹⁷⁻¹⁹ 따라서 인공 장기를 이식할 때 주변조직의 손상에 따른 면역반응을 유도하며 조직과 이식 표면의 염증 세포 침윤에 의해 급성 염증 반응으로 다양한 생물학적 물질과 항염증성 약물을 이용하여 PLGA의 염증 반응을 줄이는 연구를 하고 있다.²⁰⁻²⁷

비타민 C는 식품, 화장품, 제약 산업 등에 다양하게 사용되고 있다. 비타민 C는 세포 외액으로 차있는 세포 밖에서

가장 중요한 항산화제로 일중 항산소나 과산화물 음이온을 불활성하며 중성용액에서 히드록실 라디칼 스캐빈저로도 작용한다. 비타민 C는 다양한 산화 스트레스에 대해 최초의 항산화 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 비타민 C는 기질로부터 생성물을 전환하는데 있어 그 촉매 역할을 하는 효소로서 직접적인 역할을 하지는 않지만 효소들이 활성화 될 수 있도록 미네랄 이온들을 조절한다.^{28,29} 그리고 세포 및 조직 형성 기능이 있어 상처 치유를 돕는 콜라겐 합성과 각종 신경전달물질의 합성에 관여하며, 여러 가지 효소반응의 보조 효소로 기능한다. 또한 철분 흡수 촉진 기능이 있어 소장에서 철분을 환원형으로 전환시킴으로써 헤모글로빈과 결합돼 있지 않은 식물성 철분의 흡수를 촉진한다. 그외 면역 시스템 촉진 기능이 있어 이를 통해 암이나 심장 질환을 예방한다.^{30,31} 최근에는 비타민 C의 낮은 항산화 농도는 인체 전체의 염증 완화에 도움이 된다고 밝혀졌다.^{32,33}

따라서 비타민 C는 전-염증성 사이토카인인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 등의 발현을 억제하는 효과가 있을 것으로 사료된다. 그러나 현재 조직공학적인 측면에서의 비타민 C의 항산화, 항염증 효과를 확인한 연구가 시행되지 않았다. 본 연구에서는 조직공학적으로 안정적인 기계적 강도를 가지고 있으나 생체 내로 유입 시 분해산물로 인한 염증을 야기시키는 PLGA와 비타민 C를 혼합한 조직 공학적 하이브리드 지지체를 제조하여 생체 외 환경에서 PLGA에서 유도된 염증반응에 대한 비타민 C의 효과를 알아보고자 한다.

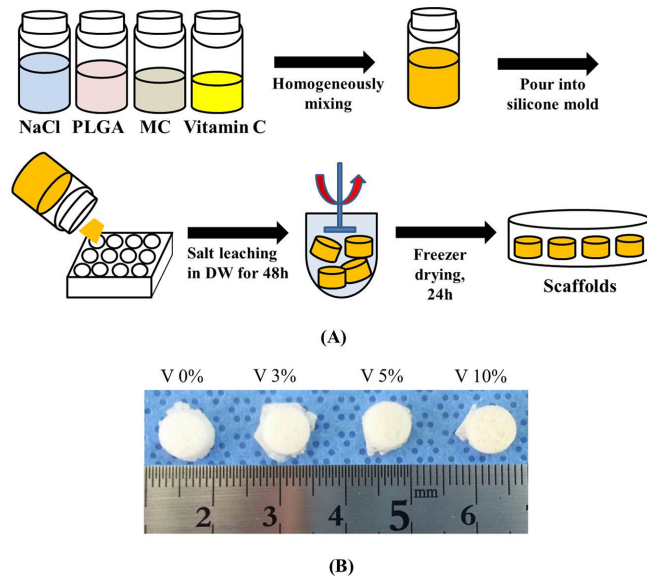
실 험

시약 및 재료. PLGA(락타이드/글리콜라이드 몰비 75/25, Resomer[®] RG 756, Boehringer Ingelheim Chem. Co. Ltd., Germany)는 평균분자량이 90000 g/mol인 것을 사용하였다. 또한 염화나트륨(NaCl, Orient Chem. Co., Korea)은 다공 생분물질로 사용하였고, 입자의 크기는 250~355 μ m로 사용하였다. 비타민 C 파우더와 세포배양에 필요한 시약은 Sigma-Aldrich(USA)에서 구입하여 사용하였다. 메틸렌클로라이드(methylene chloride, MC, Tedia Co. Inc., USA) 및 이외의 모든 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다.

비타민 C를 함유한 PLGA 다공성 지지체 제조. 비타민 C/PLGA 다공성 지지체는 용매 캐스팅/염 추출법을 이용하여 제조하였다. 1 g의 PLGA를 4 mL의 MC에 용해한 후, PLGA 양의 3, 5 및 10 wt%가 되도록 0.03, 0.05, 및 0.1 g의 비타민 C를 첨가하였다. 그 후, 다공형성 물질인 NaCl은 PLGA의 9 배가 되도록 9 g을 첨가하고, 직경 7 mm 및 높이 3 mm의 실리콘 몰드에 넣고 프레스(MH-50Y, CAP 50 tons, Japan)를 이용하여 상온에서 60 kgf/cm²의 압력으로 24시간 동안 가압하였다. 염의 추출은 3차 증류수를 6시간마다 교체하여, 48 시간 동안 용출하였고, 5 mTorr, -80 °C 조건에서 24시간 동

Table 1. Preparation of Scaffolds with Different Vitamin C Contents in PLGA

	V 0%	V 3%	V 5%	V 10%
PLGA	1 g	1 g	1 g	1 g
Vitamin C	0 g	0.03 g	0.05 g	0.1 g
NaCl	9 g	9 g	9 g	9 g

**Figure 1. (A)** Fabrication process of vitamin C/PLGA scaffolds by solvent casting/salt leaching method; **(B)** photograph of vitamin C/PLGA scaffolds.

안 동결건조하였다. 잔류용매인 MC를 제거하기 위해서 최소 1주일 이상 25 °C 진공오븐에서 건조시킨 후 실험에 사용하였으며, 이들의 제조 모식도는 Figure 1에 나타내었다. 비타민 C가 첨가되어 있지 않은 PLGA 지지체는 V 0%로, 비타민 C가 3 wt% 첨가된 PLGA 지지체는 V 3%로, 비타민 C가 5 wt% 첨가된 PLGA 지지체는 V 5%로, 비타민 C가 10 wt% 첨가된 PLGA 지지체는 V 10%로 나타내었다(Table 1).

비타민 C/PLGA 다공성 지지체 표면 관찰. 제조한 다공성 지지체를 표면 및 내부의 다공 형태를 관찰하기 위하여 주사전자현미경(SEM; S-2250N, Hitachi, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. 각각의 지지체의 단면을 반으로 절단 후 플라즈마 스퍼터(Emscope SC500K, London, UK)를 이용하여 200 Å의 두께로 백금코팅하여 100배의 배율로 PLGA와 비타민 C의 분산정도와 다공 형태를 확인하고자 하였다.

압축강도 측정. 직경 7 mm, 두께 3 mm의 비타민 C/PLGA 지지체를 각각 샘플 3개씩 준비하였다. 만능물성측정기(FTC, Sterling, Virginia, USA)를 이용하여 기계적 강도를 측정하였으며 이 때 만능물성측정기의 설정 값의 측정거리는 1.5 mm, 시험 속도 1 mm/min, 압축력 0.5 N으로 동일하게 적용하였다.

세포 배양. 쥐 배아섬유아세포(NIH/3T3 mouse embryo fibroblast, KCLB21658)와 쥐 단핵대식세포(mouse leukaemic monocyte macrophage cell line: RAW 264.7, KCLB40071)는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 제공받았다. NIH/3T3는 Roswell Park Memorial Institute Medium(RPMI 1640, Gibco)에 10% 우태아혈청, 1% 항생제(antibiotics/antimycotics)가 함유된 배양액과 RAW 264.7 세포는 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, 고농도 글루코오스, Gibco)에 10% 우태아혈청, 1% 항생제(antibiotics/antimycotics)가 함유된 배양액을 제조한 후 세포배양 플라스크에 분주하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 배양액은 매일 교체해주었다.

세포 증식을 측정. 세포 독성과 세포 증식능력을 발색 측정으로 정량하기 위해 MTT(3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 분석법을 시행하였다. NIH/3T3를 1×10⁵ 세포/지지체의 농도로 파종하고 상기의 배양액으로 정적 배양하였다(각 지지체당 n=6). 배양 1, 2, 3일째에 MTT 용액(5 mg/mL stock in PBS)을 100 µL씩 넣고 4시간 동안 37 °C 인큐베이터에서 배양하였다. 그 후 보라색 결정이 생성되면 지지체를 시험관에 옮겨 디메틸설폭사이드(DMSO, Sigma)용액을 1 mL씩 넣어 결정이 완전히 녹을 때까지 초음파 세척기로 1시간 동안 용해한 후 96웰 플레이트에 시료를 각각 100 µL씩 분주하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포부착 모폴로지. 비타민 C/PLGA 지지체에서 NIH/3T3의 부착양상 및 변화된 모폴로지를 확인하고자 주사전자현미경(SEM; S-2250N, Hitachi, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다(각 지지체당 n=2). PLGA와 농도별 비타민 C/PLGA 지지체를 24웰에 넣었다. 여기에 NIH/3T3를 1×10⁵ 세포/지지체 농도로 파종하고 3일 동안 배양한 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척하였다. 이를 2.5%의 글루타알데하이드(Sigma)로 24시간 동안 상온에서 고정한 후 에탄올 구배용액(50, 60, 70, 80, 90 및 100%)을 이용하여 각각 30분씩 탈수한 후 건조하였다. 시료관찰이 용이하도록 시편을 잘라 시료폴더에 고정시킨 후, 아르곤가스 하에서 플라즈마 스퍼터(Emscope SC500K, London, UK)를 이용하여 백금코팅한 후 각각의 시료를 1000 배로 촬영하였다.

mRNA 발현도 확인. 비타민 C/PLGA 지지체에 대한 염증 사이토카인의 mRNA 발현여부를 알아보기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 세포 파종 후 1, 2, 3일째에 회수된 지지체에 1 mL의 Trizol(Invitrogen™ life technologies Co., Groningen, Netherlands)을 첨가하여 5분 동안 인큐베이션 한 다음 1.5 mL의 EP 튜브에 넣어 0.2 mL의 클로로포름(Sigma)을 첨가하고 4 °C, 12000 g에서 15분 동안 원심분리 하여 mRNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 Oligo(dT)12-18 프라이머(Invitrogen™, 5×first strand buffer(Invitrogen™), dNTP(dGTP, dATP, dTTP, dCTP, Gibco), RNase inhibitor(Invitrogen™, Superscript™ RNase H 역전사트랜스크립테이스(Invitrogen™), DNase/

RNase free water(Gibco)를 첨가하여 authorized thermal cycler(TP600, Takara Bio Inc., Japan)를 통하여 cDNA로 역전사하였다.²⁰⁻²³ 역전사시킨 cDNA를 GAPDH, COX-2, TNF- α , IL-1 β , IL-6 PCR을 수행하였다. PCR후 증폭된 DNA를 1.5%(w/v) 아가로스겔에 전기영동을 한 후, 상대적 발현을 SYBR 녹색형광(SYBRTM Green I Nucleic Acid Gel Stain, Cambrex, U.K)에 의해 시각화하였으며 300 nm 자외선 조사기로 사진촬영을 하여 GAPDH, COX-2, TNF- α , IL-6, IL-1 β 및 mRNA 밴드의 발현정도를 확인하였다.

FACS. 활성산소(reactive oxygen species, ROS)를 측정하기 위하여 형광물질 DCF(dichlorofluorescein)를 이용하여 측정하였다. 비타민 C/PLGA 지지체에 RAW 264.7을 1×10^6 세포/지지체의 농도로 파종하고 3일 동안 배양하였다. 양성대조군으로 지지체에 파종한 세포의 배양액에 염증 유발 물질인 LPS를 첨가하여 배양하였고 음성대조군은 세포를 세포배양접시에 배양하였다. DCF(dichlorofluorescein)는 세포 파종 후 배양액에 20 μ M을 첨가하고, 40분 동안 incubation시킨 다음, FACS(fluorescence activated cell sorter, Benton-Dickson, US)를 이용하여 측정하였다.

통계학적 분석. 각 실험의 통계학적 분석은 student's t-test를 시행하여 p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 것으로 하였으며(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$), 모든 실험은 3번 이상에 걸쳐 진행하였다($n=3$).

결과 및 토론

SEM(지지체 표면). 지지체 표면 관찰을 위하여 SEM분석을 하였다. PLGA 지지체의 표면은 매끄러운 것을 확인하였으며, 다공으로 사용한 NaCl의 크기에 맞게 다공이 잘 형성

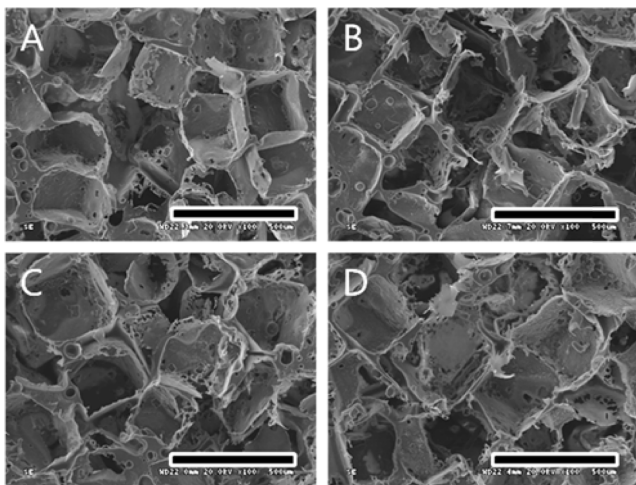


Figure 2. Observation of scaffolds by SEM (magnification with $\times 100$, scale bar=500 μ m, A: V 0% scaffolds, B: V 3% scaffolds, C: V 5% scaffolds, D: V 10% scaffolds).

됨을 알수 있었고, 비타민 C의 함량이 증가할수록 표면이 조금씩 거칠어지는 것을 확인할 수 있었다. 또한 지지체의 다공은 일정하게 형성된 것을 확인할 수 있었다(Figure 2).

압축강도 측정. 비타민 C/PLGA 지지체의 압축강도를 측정하였으며 Figure 3에 나타내었다. 비타민 C를 첨가하지 않은 순수 PLGA 지지체 V 0%는 56 ± 4.1 N이었으며 V 3%는 48 ± 6.6 N, V 5 wt%는 45 ± 1.6 N, V 10 wt%는 43 ± 0.7 N의 값을 나타내었다. 비타민 C의 함량이 증가할수록 압축강도는 감소하게 되는데 이는 비타민 C는 친수성의 성질을 가지고 있으며 PLGA는 소수성의 성질을 가지고 있기 때문에 혼합시 낮은 계면결합으로 인해 물성이 저하되므로 비타민 C의 함량이 증가될수록 압축강도가 감소하게 되는 결과를 나타내었다고 사료된다.

MTT 분석. *In vitro* 상에서 PLGA 지지체와 비타민 C/PLGA 지지체에서 NIH/3T3 세포의 증식을 확인하여 위해 MTT 분석을 하였으며 Figure 4에 나타내었다. 각각의 지지

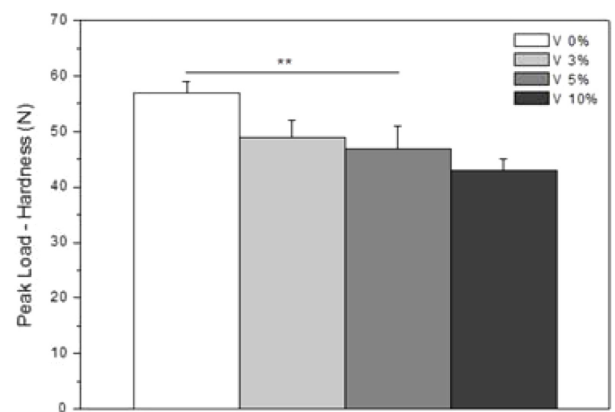


Figure 3. Compressive strength of vitamin C/PLGA scaffolds (** $p < 0.01$).

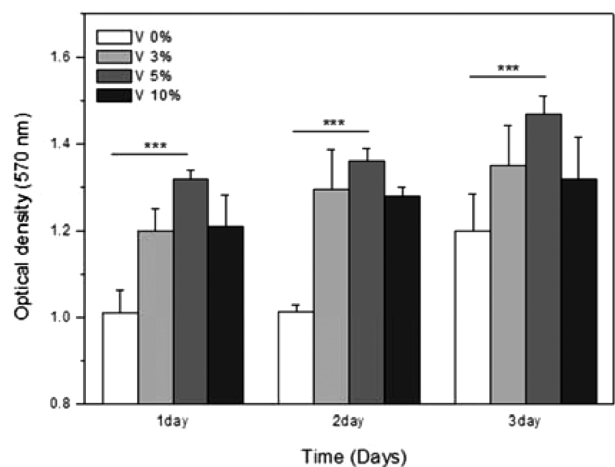


Figure 4. Cell viability of NIH/3T3 in vitamin C/PLGA scaffolds analyzed by MTT assay after 1, 2, and 3 day post-seeding *in vitro* (** $p < 0.001$).

체에 NIH/3T3 세포를 파종하고 1, 2, 3일 후에 측정하였다. 1일차 결과를 통하여 PLGA 지지체보다 비타민 C/PLGA 지지체에서 세포의 초기 부착률이 우수함을 알 수 있었다. 또한 V 0%는 2, 3일차 결과에서 증식을 확인하였지만 큰 변화가 없었다. 반면, 비타민 C/PLGA 지지체는 지속적으로 증식

하였음을 확인하였다. 특히 V 5% 지지체가 세포의 증식이 가장 좋은 것을 확인하였다. 이는 지지체 내에 적당량의 비타민 C가 첨가됨으로써 소수성의 성질을 가진 PLGA에 친수성인 환경을 제공하여, 세포와 세포간의 상호작용을 증진시킴으로써 세포의 부착과 증식에 좋은 영향을 제공했을 것이라고 사료된다.

세포부착양상. 비타민 C 첨가에 따른 PLGA 지지체에서 NIH/3T3 세포의 부착양상을 확인하기 위해 지지체에 파종 후 1, 2, 3일 후에 SEM으로 분석하였다(Figure 5). 그 결과는 MTT 분석과 같은 결과를 보였다. PLGA 지지체와 비타민 C가 함유된 PLGA 지지체의 표면이 다른 양상을 보임을 확인할 수 있었다. 비타민 C가 포함된 지지체는 PLGA로만 이루어진 지지체보다 필로포디아 및 라멜리 포디아 등이 뻗어나 오고, 세포가 긴 방추형으로 뻗어있으며 섬유아세포의 전형적인 세포의 형태로 지지체 전반적으로 고루 부착됨을 관찰할 수 있었다. 전반적으로 세포를 파종한 후 1일째 보다 3일째에서 세포가 많이 관찰된 것으로 보아 세포가 증식되었다고 사료된다. 특히 V 5%에서 세포가 가장 많이 증식되는 것을 확인하였다. 비타민 C/PLGA 지지체의 특성은 PLGA 지지체보다 세포 배양시 조직 세포가 성장하여 내부로 이행하는데 문제가 없을 것으로 예측되며, 비타민 C가 포함되어 친

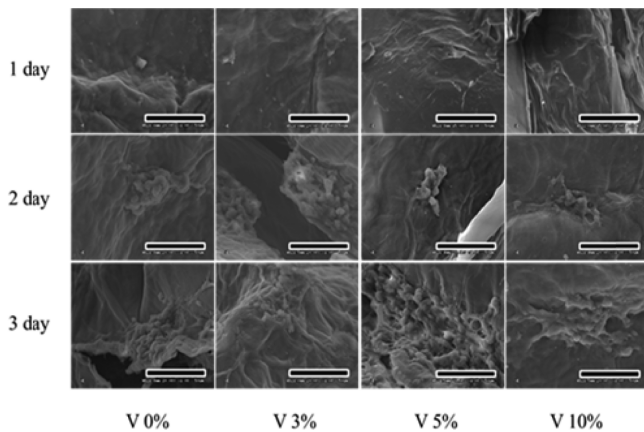


Figure 5. SEM microphotographs of NIH/3T3 morphology on vitamin C/PLGA scaffold surfaces at cultivation time 3 days (magnification, $\times 1.0$ K, scale bar=50 μ m).

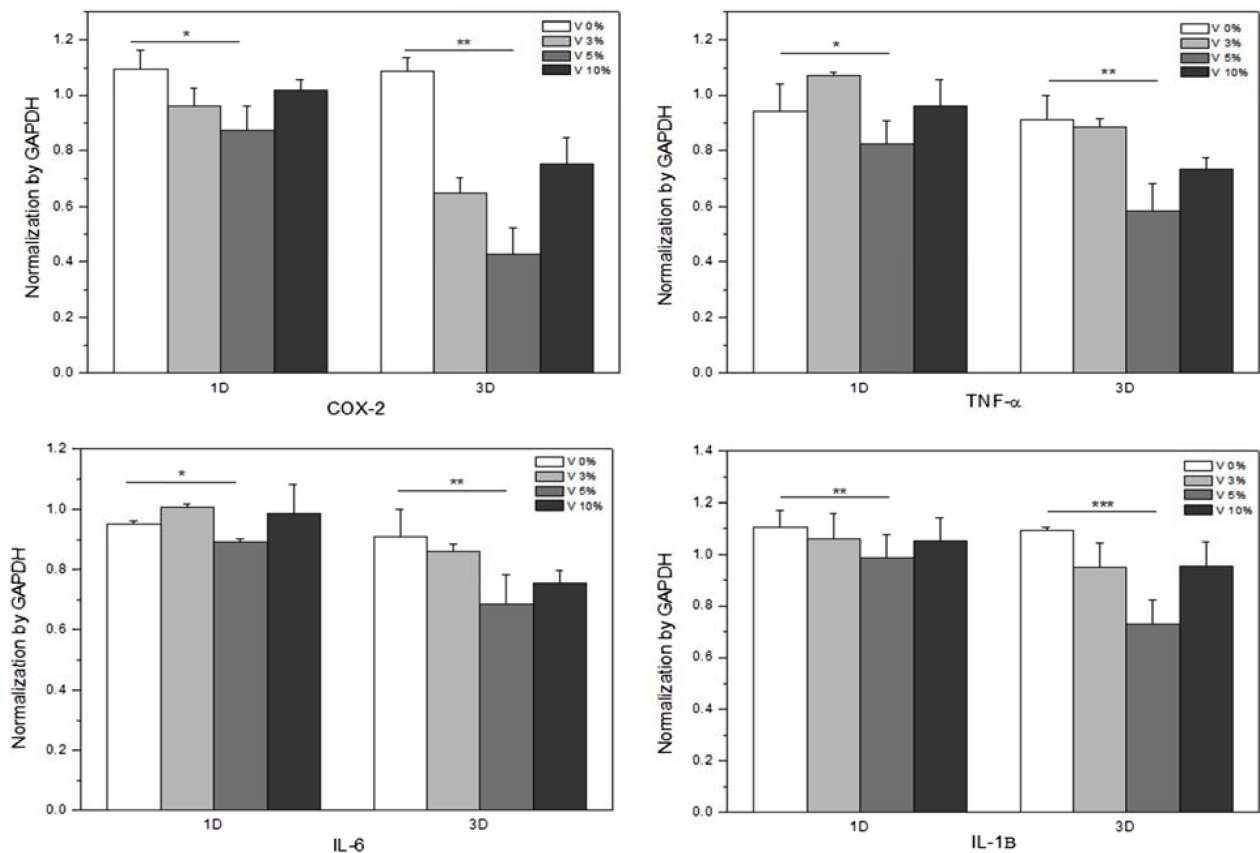


Figure 6. Gene expression profiles of GAPDH, COX-2, TNF- α , IL-6, IL-1 β on vitamin C/PLGA scaffolds (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).

수성이 증가되고, 따라서 초기 세포부착률 증가로 세포의 증식이 활발해져 이식 부위의 재생조직과의 적합성을 보여주는 데 충분할 수 있을 것으로 사료된다.

RT-PCR. 비타민 C 함량에 따른 PLGA 다공성 지지체에 염증의 발현 정도를 알아보기 위해서 지지체에 RAW 264.7 세포를 파종한 뒤 1, 3일 후에 GAPDH, COX-2, TNF- α , IL-6, IL-1 β 염증 사이토카인의 mRNA 발현도를 측정하였다 (Figure 6).

GAPDH는 housekeeping gene으로서 염증 사이토카인의 발현량을 표준화시킨다. COX-2는 프로스타글라틴의 합성에 중요한 효소로서 혈관 내피 성장 인자의 생산을 촉진하고, TNF- α 는 종양 세포를 괴사시키는 항종양 물질로 바이러스 복제를 억제하는 능력을 가지며, IL-6는 신경조직, 섬유아세포, 대식세포에서 생산되며 급성 염증 발생 시 빠르게 유도되며 숙주 방어, 면역반응의 기능을 하며, IL-1 β 는 대식 세포로부터 생성되어 다양한 림포카인을 분비시켜 대식세포의 식균 작용이 증가하게 되면 나타나는 전염증성 사이토카인이다.

1일차와 3일차 실험군에서 housekeeping gene인 GAPDH가 발현이 되었고, 1일차에서는 모든 군에서의 전염증성 사이토카인이 유도되어 높은 값을 나타내는 반면 3일차에는 모든 군에서 전염증성 사이토카인의 발현양이 감소됨을 확인할 수 있다. 특히 V 5% 군에서의 발현량의 감소가 제일 큰 것으로 나타났다. 이 결과로 염증에 관여하는 전염증성 사이토카인인 COX-2, TNF- α , IL-6, IL-1 β 이 시간이 지남에 따라 발현 양이 감소하는 것으로 보아 비타민 C가 항염증 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

FACS. 활성화된 대식세포는 ROS를 과도하게 생성된다고 알려져 있다.^{34,35} 따라서 비타민 C/PLGA 지지체에서 생성된 ROS를 DCFH-DA(dichlorofluorescein-diacetate)를 이용해 검출하기 위하여 사용되었다.

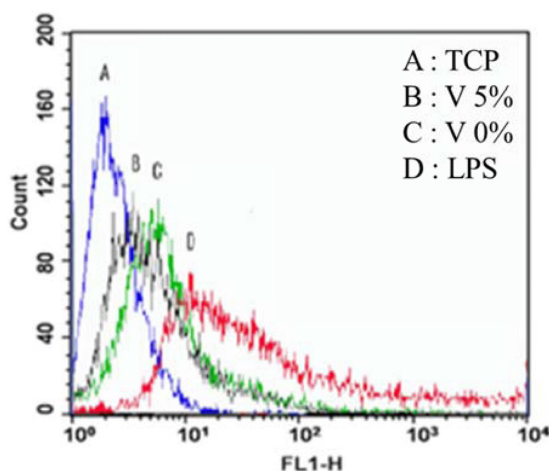


Figure 7. Reduction of oxidative stress on TCP, PLGA scaffold (V 0%), 5% vitamin C/ PLGA scaffold, LPS (A: TCP, B: 5% vitamin C/PLGA scaffold, C: PLGA scaffold (V 0%), D: LPS).

비타민 C/PLGA 지지체에서 배양된 대식세포에서 ROS 생성 정도를 측정함으로써, 비타민 C의 항산화 효과를 Figure 7에 나타내었다. 음성대조군으로 배양액에 RAW 264.7 세포만을 배양하였으며, 양성대조군으로 배양액에 RAW 264.7 세포와 염증 유발 물질 LPS를 첨가하여 배양하고, PLGA 지지체와, SEM, MTT, 그리고 RT-PCR 결과가 가장 우수하게 나온 V 5% PLGA 지지체에서 배양한 RAW 264.7 세포를 40분 동안 DCFH-DA를 처리했다. 세포 내 ROS 생성은 유세포 분석기(FACS)에 의해 탐지된 DCH 형광세기에 의해 결정되었다.

그 결과, V 5%의 경우 V 0% 피크 C 보다 왼쪽으로 이동하여 V 5%는 음성대조군의 피크값에 가장 근접하였고, V 0%는 양성대조군인 LPS 처리를 한 피크 값과 가깝게 측정되었다. 이러한 실험 결과로 비타민 C는 ROS를 감소시키는 효과가 있어 항산화 효과가 있다는 것을 확인하였다.

결론

본 연구에서는 PLGA에서 유도되는 염증반응에 대하여 비타민 C의 효과를 확인하고자 3차원 조직공학용 다공성 지지체를 제조하였다. PLGA는 소수성 성질을 가지고 있기 때문에 세포의 초기 부착률을 낮추는 단점을 가지고 있다. 지지체의 비타민 C가 PLGA 매트릭스 내에 분포되어 친수성을 향상시켜 압축강도가 낮아짐을 확인하였다. MTT와 SEM 분석을 통해 *in vitro* 환경에서 비타민 C 함량에 따른 세포의 부착률과 증식을 확인한 결과 MTT와 SEM 분석 모두 V 5% 군에서 가장 우수한 세포의 부착, 성장률을 보였다. 또한 RT-PCR 결과와 비타민 C는 전염증성 사이토카인의 발현을 억제시키는데 특히 V 5%군에서 가장 발현도가 많이 감소됨을 확인하였다. 그리고 비타민 C의 활성산소 생성억제 효과를 알아보기 위해 FACS를 통해 측정해본 결과 비타민 C가 PLGA에 함유되어 세포 내 활성산소의 생성을 억제시키는 것을 확인해 항산화 효과가 있음을 확인하였다. 이러한 결과로 비타민 C의 강력한 항산화 및 항염증 효과가 나타나는 군은 5%로, 이는 세포의 부착과 증식에 긍정적인 영향을 주어 조직공학용 인공재료 및 세포 치료제로도 응용될 수 있을 것이라고 사료된다.

감사의 글: 이 논문은 농림수산식품부 기술사업화 지원사업(814005-03-1-HD020)과 한국연구재단 바이오·의료기술개발사업(NRF-2012M3A9C6050204)의 지원을 받아 수행된 연구입니다.

참고문헌

1. S. R. Caliarra, M. A. Ramirezb, and B. Harley, *Biomaterials*, **32**,

- 8990 (2011).
2. M. J. Yaszemski, R. G. Payne, W. C. Hayes, R. S. Langer, T. B. Sufdemote, and A. G. Mikos, *Tissue Eng. Part A*, **1**, 41 (1995).
3. S. V. Madhally and H. Matthew, *Biomaterials*, **20**, 1133 (1999).
4. S. H. Kim, S. J. Yun, J. W. Jang, M. S. Kim, G. Khang, and H. B. Lee, *Polym. Korea*, **30**, 14 (2006).
5. S. Yang, K. F. Leong, Z. Du, and C. K. Chua, *Tissue Eng.*, **7**, 679. (2001).
6. Z. Ma, M. Kotaki, R. Inai, and S. Ramakrishna, *Tissue Eng.*, **11**, 101 (2005).
7. S. A. Park, J. B. Lee, Y. E. Kim, J. E. Kim, J. H. Lee, J. W. Shin, I. K. Kwon, and W. D. Kim, *Macromol. Res.*, **22**, 882 (2014).
8. K. S. Jones, *Semin. Immunol.*, **20**, 130 (2008).
9. F. Wen, S. Chang, Y. C. Toh, S. H. Teoh, and H. Yu, *Mater. Sci. Eng.*, **27**, 285 (2007).
10. S. R. Cha, N. K. Jang, H. Kuk, E. Y. Kim, J. E. Song, C. H. Park, and G. Khang, *Inter. J. Tissue Regen.*, **5**, 84 (2014).
11. K. Jakab, F. Marga, C. Norotte, and G. Forgacs, *Cryobiology*, **71**, 165 (2015).
12. S. J. Lee, J. J. Yoo, and A. Atala, *Polym. Korea*, **38**, 113 (2014).
13. S. J. Yoon, S. H. Kim, H. J. Ha, Y. K. Ko, J. W. So, and M. S. Kim, *Tissue Eng. Part A*, **14**, 539 (2008).
14. S. Munirah, S. H. Kim, J. E. Song, H. J. Ha, S. J. Yoon, J. M. Rhee, M. S. Kim, H. B. Lee, and G. Khang, *Polym. Korea*, **31**, 14 (2007).
15. Y. Song, J. Kwon, B. Kim, Y. Jeon, G. Khang, and D. Lee, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **98A**, 517 (2011).
16. S. H. Oh, S. G. Kang, and J. H. Lee, *J. Mater. Sci., Mater. Med.*, **17**, 131 (2006).
17. J. Wu, S. Basu, M. L. Funderburgh, W. R. Wagner, and J. L. Funderburgh, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **55**, 4619 (2014).
18. S. Patil, F. Papadimitrakopoulos, and D. Burgess, *J. Control. Release*, **117**, 68 (2007).
19. H. W. Lee, S. H. Seo, C. H. Kum, B. J. Park, Y. K. Joung, T. I. Son, and D. K. Han, *Macromol. Res.*, **22**, 210 (2014).
20. M. L. Ho, Y. C. Fu, G. J. Wang, H. T. Chen, J. K. Chang, and T. H. Tsai, *J. Control. Release*, **128**, 142 (2008).
21. G. T. Kose, F. Korkusuz, P. Korkusuz, and V. Hasirci, *Tissue Eng.*, **10**, 1234 (2004).
22. S. E. Lee, S. R. Cha, N. K. Jang, S. M. Kim, E. Y. Kim, J. E. Song, C. H. Park, and G. Khang, *Inter. J. Tissue Regen.*, **4**, 103 (2014).
23. J. M. Anderson and M. S. Shive, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **64**, 72 (2012).
24. K. Uematsu, K. Hattori, Y. Ishimoto, J. Yamauchi, T. Habata, Y. Takakura, and M. Sato, *Biomaterials*, **26**, 4273 (2005).
25. Y. Zhang, F. Yang, K. Liu, H. Shen, Y. Zhu, W. Zhang, and G. Zhou, *Biomaterials*, **33**, 2926 (2012).
26. D. H. Yang and H. J. Chun, *Inter. J. Tissue Regen.*, **6**, 1 (2015).
27. J. J. Yoo, D. A. Bichara, X. Zhao, M. A. Randolph, and T. J. Gill, *J. Biomed. Mater. Res. Part B*, **99**, 102 (2011).
28. G. Rimbach, A. M. Minihane, J. Majewicz, A. Fischer, and J. Pallauf, *Proc. Nutr. Soc.*, **61**, 415 (2002).
29. U. Singh, S. Devaraj, and I. Jialal, *Annu. Rev. Nutr.*, **25**, 151 (2005).
30. A. C. Carr, M. C. Vissers, and J. Cook, *NZ. Med. J.*, **127**, 66 (2014).
31. T. D. Mickleborough and M. R. Lindley, *J. Allergy Ther.*, **5**, 2 (2014).
32. I. Mayers and D. Johnson, *Can. J. Anaesth.*, **45**, 871, (1998).
33. L. J. Yan, M. G. Traber, H. Kobuchi, S. Matsugo, H. J. Tritschler, and L. Packer, *Arch. Biochem. Biophys.*, **327**, 330 (1996).
34. Y. W. Yang and P. Hsu, *Biomaterials*, **29**, 2516 (2008).
35. M. C. Serrano, R. Pagani, M. Manzano, J. V. Comas, and M. T. Portoles, *Biomaterials*, **27**, 4706 (2006).