Polymer(Korea), Vol. 41, No. 4, pp. 662-669 (2017)
https://doi.org/10.7317/pk.2017.41.4.662

ISSN 0379-153X(Print)
ISSN 2234-8077(Online)

저분자량 α-/β-글루칸을 함유하는 나노섬유의 피부암 세포 성장 저해 효과

김영은 · 김영진†
대구가톨릭대학교 의공학과
(2017년 1월 10일 접수, 2017년 2월 10일 수정, 2017년 2월 22일 채택)

Inhibition Effect of Low Molecular Weight α-/β-Glucans Loaded Nanofibers on the Growth of Skin Cancer Cells

Young-Eun Kim and Young-Jin Kim†
Department of Biomedical Engineering, Catholic University of Daegu, Gyeongsan 38430, Korea
(Received January 10, 2017; Revised February 10, 2017; Accepted February 22, 2017)

초록: 암조직의 외과적 수술 후에 절제 부위의 재생과 종양의 재발 방지를 위해서 적절한 미세환경을 제공해 줄 수 있는 생리활성 물질이 함유되어 있는 나노섬유 지지체의 개발이 요구되고 있다. 따라서 본 연구에서는 poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate)(PHBV), 덱스트란, 라미나린 및 가수분해된 저분자량의 덱스트란과 라미나린을 이용하여 전기방사법으로 나노섬유를 제조하였다. 제조된 나노섬유는 상호연결된 기공구조를 보였으며, 가수분해된 저분자량 글루칸의 사용에 의해서 물접촉각이 낮아지는 것이 확인되었다. 나노섬유의 세포 성장에 미치는 영향을 조사한 결과 PHBV와 β-글루칸인 라미나린의 저분자량 구조체가 8:2로 함유되어 있는 나노섬유(PHHL)에서 악성흑색종 세포의 성장은 가장 억제되었지만, 정상 피부세포의 성장은 가장 촉진된다는 것을 확인하였다.

Abstract: The development of nanofibrous scaffolds containing biological agents is necessary to provide adequate conditions for tissue regeneration and to prevent the recurrence of cancer after surgical operations. Here we fabricated nanofibers composed of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) (PHBV), dextran, laminarin, hydrolyzed dextran, and hydrolyzed laminarin using an electrospinning process. The resulting nanofibers exhibited a fully interconnected pore structure. The water contact angles were reduced by the addition of low molecular weight glucans. The results from cell viability tests showed that the proliferation rate of melanomas on the nanofibers fabricated with 8:2 of PHBV and hydrolyzed laminarin (PHHL) was significantly suppressed by increased TNF-α secretion. However, the proliferation of skin fibroblasts on the PHHL nanofibers was effectively stimulated because of the antioxidant activity and hydrophilicity of hydrolyzed laminarin.

Keywords: glucan, low molecular weight, anticancer activity, skin cancer, nanofiber.

서 론

피부는 인체의 가장 큰 면적을 차지하는 부분으로서 외부 자극 및 세균성 상처에 대한 장벽 역할을 수행한다. 이들 피부가 인공적인 자외선뿐만 아니라 자연적인 자외선에 과다하게 노출될 경우 DNA 손상, 유전자 돌연변이, 면역 억제 및 과도한 염증 발생 등과 같은 이유로 피부암을 초래하게 된다.[1,2] 피부암은 전 세계적으로 가장 흔한 악성 종양이며, 현재 우리나라에서도 발생자 수가 점차 증가하고 있는 추세이다. 피부암은 기전에 따라서 기저세포암(basal cell carcinoma), 편평상피세포암(squamous cell carcinoma) 및 악성흑색종(malignant melanoma)으로 분류된다.[3] 그 중에서 악성흑색종은 표피의 기저층에 있는 멜라닌 세포에서 발생하는 종양으로 멜라닌 세포가 있는 모든 부위에서 발생할 수 있다.[4,5] 빠른 성장, 침윤(local invasion), 전이(metastasis) 및 높은 항암제 내성 등과 같은 특징을 보이고 모든 피부암으로 인한 사망의 65%를 차지할 정도로 악성도가 높은 종양이다.

악성흑색종 치료법으로는 수술 범위에 대한 논란은 있으나 외과적 수술법이 가장 일반적이다. 악성흑색종의 절제 수술 이후에 절제 부위에의 감염 및 수분 손실 등을 방지하기 위한 창상피복제의 사용이 필요하고, 이로 인해서 상처의 치유 속도를 높일 수 있다. 이상적인 창상피복제는 수술 후에 절제 부위의 재생을 돕고, 암의 재발을 방지해주는 기능을 모두 가지는 것이다.

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: yjkim@cu.ac.kr
©2017 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

다당류(polysaccharides)는 진균류, 효모, 박테리아, 갈조류 등의 세포벽을 구성하는 구조성 다당류와 세포질 내에 저장되는 저장성 다당류로 분류된다.[6] 이들 다당류는 항혈전성, 항염증성, 항균성, 항바이러스성, 항암활성, NK 세포 활성 및 사이토카인 분비와 상처치유를 촉진하는 등과 같은 다양한 생리적 기능을 가지고 있다.[7] 그 중에서도 대표적인 β-글루칸(glucan) 물질인 라미나린(laminarin)은 글루코스 단량체가 β-1,3- 및 β-1,6-글리코시드 결합(glycosidic bond)으로 연결되어 있는 갈조류의 주요 저장성 다당류이다.[8] 라미나린은 숙주의 면역기능을 향상시켜 항균 및 항암활성을 보이고, 면역세포를 활성화시킴에 의해 식세포활동(phagocytosis)과 사이토카인 분비에도 영향을 주고 있다. 또한 α-글루칸을 대표하는 덱스트란(dextran)은 글루코스 단량체가 α-1,3- 및 α-1,6-글리코시드 결합으로 연결되어 있는 박테리아 다당류로서 뛰어난 생분해성 및 생체적합성으로 인해서 약물전달체, 항혈전제나 인공혈장 증량제 등과 같이 다양하게 의료용 제품으로 응용되고 있다.[9]

글루칸류의 생리활성은 이들 고분자의 길이, 분자량, 분기도(branching degree) 등에 의해서 영향을 받으며, 특히 고분자량의 글루칸은 점도가 높고, 세포 투과성이 낮아서 이들의 응용이 제한되고 있다.[10] 따라서 글루칸류의 기능 향상을 위해서 화학적 또는 효소 분해반응을 이용한 저분자량화가 시도되고 있으며, 그 결과 저분자량의 글루칸이 고분자량보다 우수한 항산화성 및 항암활성과 같은 생리활성을 보인다는 보고가 있다.[11]

생체조직의 빠른 재생을 위해서는 기계적인 지지체 역할과 세포의 성장 및 분화를 조절하여 최적의 미세환경을 제공할 수 있는 3차원 네트워크 구조의 고분자 멤브레인의 개발이 요구되어 지고 있다. 또한 이들 고분자 멤브레인은 세포성장에 영향을 주는 영양분이 적절하게 공급되어 질 수 있도록 다공성 구조를 하며, 나노섬유 멤브레인이 세포의 점착과 성장을 촉진시킬 수 있는 구조적인 특징을 보이고 있다. 그러므로 약물을 함유하는 나노섬유 멤브레인은 생의학적 응용에 많은 가능성을 가지고 있고, 특히 수술 후에 절제 부위의 재생과 종양의 재발 방지를 위해서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다. 따라서 본 연구에서는 조직의 재생과 수술 후 장기적인 항암치료를 위해서 poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate)(PHBV)와 α- 또는 β-글루칸을 함유하는 나노섬유 멤브레인을 제조하였다. α-글루칸인 덱스트란과 β-글루칸인 라미나린의 분자량에 변화에 따른 나노섬유 멤브레인의 표면형태 및 특성 변화에 대해서 조사하였다. 또한 덱스트란과 라미나린의 분자량이 정상세포와 암세포의 성장에 미치는 영향을 평가하였다.

실 험

시약 및 재료. 라미나린(라미나리아 디지타타 추출물), 덱스트란(류코노스톡 메센테로이데스 발효물), poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate)(PHBV, 8 wt% hydroxyvalerate 함유), lipopolysaccharide(LPS), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide(MTT), 2,2,2-trifluoroethanol (TFE), dimethyl sulfoxide(DMSO), 0.1 N hydrochloride(HCl)과 0.1 N sodium hydroxide(NaOH)는 Sigma-Aldrich Co. (USA) 제품을 구입하여 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), RPMI-1640, fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin과 Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS, pH 7.4)은 Gibco BRL(USA)에서 구입하였다. Human skin fibroblast(CCD-986Sk), human malignant melanoma(A-375)와 human leukemic monocyte(THP-1) 세포는 american type culture collection(ATCC, USA)에서 구입하여 사용하였다. 그 외의 사용된 시약과 용매는 일반 회사에서 구입하였으며, 추가적인 정제과정 없이 사용하였다.

덱스트란과 라미나린 가수분해. 저분자량의 덱스트란 및 라미나린을 준비하기 위해서 10 w/v%의 덱스트란 또는 라미나린을 0.1 N HCl에 녹이고 120 °C에서 1시간 동안 고압증기멸균기(autoclave)에서 처리한 후에 0.1 N NaOH를 이용하여 pH를 7.0에 맞추었다. 얻어진 용액을 튜브 형태의 투석용 멤브레인에 넣고 증류수에서 48시간 동안 투석하고 동결건조하여 저분자량의 덱스트란과 라미나린을 얻었다. 이들 저분자량의 덱스트란과 라미나린의 분자량은 젤 투과 크로마토그래피(GPC)인 Waters breeze system(Waters Co., USA)에 Waters ultrahydrogel(Linear, 500, 250 및 120) 칼럼(column)을 장착하여 측정하였다. GPC 측정 조건으로 전개용매는 0.02 N $NaNO_3$ 수용액, 온도는 30 °C, 유속은 0.8 mL/min로 고정하였고, 표준물질로는 poly(ethylene glycol)(PEG)를 사용하였다.

나노섬유 제조. 나노섬유를 제조하기 위해 사용한 전기방사장치는 0-40 kV의 전압공급이 가능한 고전압 공급장치(high voltage DC power supply unit, 청파 EMT, 한국), 평판형태(200×200 mm, stainless steel)의 집전판(collector), 고분자용액을 일정하게 토출해 줄 수 있는 주사기펌프(syringe pump, KDS100, USA), 주사기(gastight and needle lock type 10 mL, Hamilton, USA), 금속주사기바늘(ID = 0.41 mm) 등으로 구성하였다. 나노섬유의 전기방사를 위해서 먼저 PHBV와 덱스트란 또는 라미나린, PHBV와 저분자량 덱드트란 또는 라미나린을 TFE와 증류수 9:1의 혼합용매에 섞어서 45 °C에서 24시간 동안 교반하여 고분자의 최종농도가 25 w/v%인 방사용액을 제조하였다. 이 때 PHBV/덱스트란 또는 라미나린, PHBV/저분자량 덱스트란 또는 라미나린의 혼합비는 8:2로 고정하였다. 나노섬유의 제조조건은 방사거리 15 cm, 인가전압 17 kV, 유체속도 1.5 mL/h로 고정시키고, 실온에서 상대습도 60% 이하의 조건에서 나노섬유를 제조하였다. 방사 완료 후에 집전판에 모여 있는 나노섬유를 수거하여 40 °C에서 24

시간 이상 건조하여 잔존하는 용매를 모두 제거하였다.

나노섬유 특성 분석. PHBV와 α- 또는 β-글루칸을 함유하는 나노섬유 표면 특성은 field-emission scanning electron microscope(FE-SEM, JSM-6335F, JEOL, Japan)과 이미지 분석 프로그램(Image-Pro Plus, Media Cybernetics Inc., USA)을 이용하였다. 먼저 FE-SEM을 통해 얻어진 나노섬유의 사진 이미지를 이미지 분석 프로그램을 이용하여 평균직경, 표준편차 등을 얻어내었다. 나노섬유의 표면 화학구조는 attenuated total reflectance Fourier transform infrared(ATR-FTIR, ALPHA, Bruker Optics, USA)를 이용하였으며, α- 또는 β-글루칸이 PHBV 분자의 결정구조 변화에 미치는 영향을 X-ray diffractometer(XRD, X'Pert Pro, Panalytical B.V., The Netherlands)를 이용하여 조사하였다. XRD 분석에서 X-ray tube는 Cu Kα를 사용하여 40 kV, 30 mA의 조건으로 조사하였다. Diffractogram은 10-40°의 범위의 2θ를 2°/min의 속도로 측정하였다. 나노섬유 멤브레인의 친수화도를 조사하기 위해서 나노섬유 표면에 형성된 물접촉각을 접촉각 측정기(DSA 100, KRÜSS, Germany)를 이용하여 측정하였다.

세포 생존율 분석. PHBV와 α- 또는 β-글루칸을 함유하는 나노섬유 멤브레인의 *in vitro* 세포 독성을 알아보기 위해서 정상세포로는 CCD-986Sk 세포를 사용하였고, 암세포로는 A-375 세포를 사용하였다. 모든 세포배양에는 10% FBS와 0.5% penicillin-streptomycin을 함유하고 있는 DMEM을 사용하였고, 나노섬유상에서의 세포 생존율은 MTT assay를 이용하여 분석하였다. 세포 배양 전에 나노섬유 멤브레인을 자외선을 이용하여 3시간 동안 멸균시키고, 계속해서 DPBS와 DMEM을 이용하여 각 3회씩 세척하였다. 그 후 세포배양용 24-well plate에 나노섬유를 넣어 주고, 여기에 정상세포 또는 암세포를 2×10^4 cells/well로 파종하여 37 °C에서 7일 동안 배양시킨다. 세포 생존율을 평가하기 위해서 MTT 용액을 각각의 나노섬유 멤브레인 상에서 배양된 세포에 넣어 주고 4시간 추가 배양한다. 상층액을 제거하고 침전물을 DMSO로 용해시켜서 마이크로플레이트 리더기(OPSYS-MR, Dynex Technology Inc., USA)를 이용하여 570 nm에서의 흡광도를 측정하여 평가하였다.

사이토카인 정량. 나노섬유가 tumor necrosis factor-α(TNF-α)의 방출에 주는 영향을 분석하기 위해서 THP-1 세포를 10%의 열처리된 FBS와 항생제를 함유하는 RPMI-1640 배지에서 배양하였다. THP-1 세포를 나노섬유가 들어가 있는 24-well plate에 1×10^5 cells/well로 파종하고 37 °C에서 24시간 배양한 후에 1 μg/mL의 LPS를 세포가 배양되고 있는 배지 용액에 넣어주고 24시간 추가 배양을 하였다. 나노섬유 상에서 THP-1 세포가 방출하는 TNF-α의 정량은 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kits(R&D Systems, USA)를 이용하였다.

결과 및 토론

덱스트란과 라미나린 가수분해. 저분자량의 α- 또는 β-글루칸을 얻기 위해서 덱스트란(M_w = 10000 Da)과 라미나린(M_w = 5400 Da)을 산촉매를 이용한 가수분해를 통해 고분자 분해반응을 행하였고, 가수분해된 덱스트란과 라미나린의 분자량을 GPC를 이용하여 측정한 결과 Figure 1에서 볼 수 있는 것처럼 분자량이 급격하게 줄어든 것을 확인할 수 있었다. 가수분해된 덱스트란과 라미나린의 최대 피크에서의 평균분자량(M_p)은 261 Da 및 259 Da이었고, 또한 중량평균분자량(M_w)은 294 Da 및 268 Da이었다. 이들 결과로부터 산촉매를 이용한 가수분해 반응에 의해서 덱스트란은 두 개의 글루코스가 α-1,3-결합(nigerose) 또는 α-1,6-결합(isomaltose)으로 연결된 이당류(disaccharide)가 주로 얻어졌고, 라미나린은 두 개의 글루코스가 β-1,3-결합(laminaribiose) 또는 β-1,6-결합(gentiobiose)으로 연결된 이당류가 주로 얻어졌다.[12,13] 여기서 가수분해된 덱스트란과 라미나린의 평균 분자량 저하는 다당류(polysaccharide)의 글리코시딕 결합이 산촉매에 의해 분해된 것에 기인한다.

글루칸 함유 나노섬유의 형상 관찰. 전기방사법으로 제조된 나노섬유는 구조적으로 생체 내에서 3차원 네트워크를 형성하고 있는 결합조직의 세포외기질(ECM)과 유사하기 때문에 세포의 점착, 성장 및 분화를 촉진시킨다. 또한 높은 기공도와 큰 비표면적을 가지고 있으므로 상처부위와의 접촉면이 넓어 질 뿐만 아니라 상처에서 배출되는 체액의 흡수능력이 우수하므로 통증 완화 및 상처치유 속도가 매우 빠르다. 특히, 약물을 함유하고 있는 나노섬유의 경우 암조직의 절제 수술 후에 상처의 감염과 암의 재발 방지를 동시에 기능할 수 있는 치료제로서의 응용도 연구되고 있다.[14] 본 연구에서는 PHBV와 α-글루칸인 덱스트란 또는 β-글루칸인 라미나린을

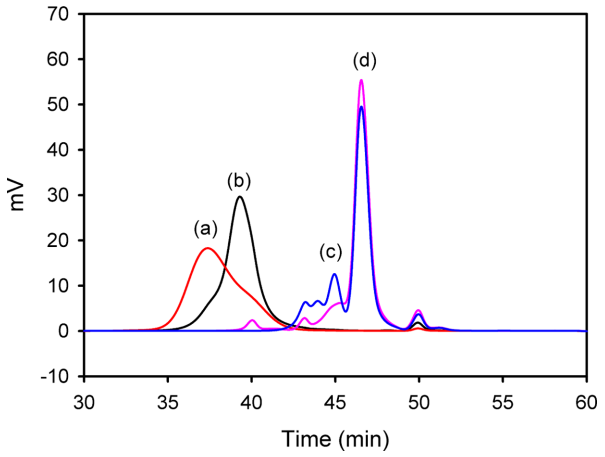

Figure 1. GPC chromatograms of (a) dextran; (b) laminarin; (c) hydrolyzed dextran; (d) hydrolyzed laminarin obtained using a refractive index (RI) detector.

8:2로 혼합하여 전기방사법으로 나노섬유를 제조하였다. 여기서 PHBV/덱스트란 혼합물의 나노섬유는 PHDE, PHBV/라미나린 혼합물의 나노섬유는 PHLA로 표기하였다. 또한 α- 또는 β-글루칸의 분자량에 따른 생물학적 활성(biological activity) 변화를 조사하기 위해서 PHBV와 α-글루칸의 가수분해 산물인 저분자량 덱스트란(PHHD) 또는 β-글루칸의 가수분해 산물인 저분자량 라미나린(PHHL)을 8:2로 혼합하여 나노섬유를 제조하였다. 여기서 모든 전기방사 용액의 농도는 25 w/v%로 고정하여 사용하였다.

전기방사된 나노섬유의 형상을 SEM을 이용하여 관찰한 결과, Figure 2에서 볼 수 있는 것처럼 이들 나노섬유는 작은 크기의 기공이 3차원적으로 연결된 구조를 가지고 있었다. 이들 나노섬유의 평균 직경은 PHDE가 463±37 nm, PHLA가 481±41 nm, PHHD가 425±31 nm 및 PHHL이 471±29 nm로 저분자량의 글루칸을 함유하는 나노섬유가 고분자량 글루칸을 함유하는 나노섬유에 비해서 섬유의 직경이 약간 줄어든 것을 확인하였다. 이는 전기방사 용액의 점도가 나노섬유 형상 및 평균 직경에 영향을 준 것으로 용액의 점도가 높을수록 평균 직경은 증가하는 것으로 알려져 있다.[14]

글루칸 함유 나노섬유의 물리화학적 특성. 먼저 ATR-FTIR을 이용하여 400-4000 cm^{-1} 범위에서 나노섬유의 표면 특성을 분석하였다. Figure 3에서 볼 수 있는 것처럼 모든 나노섬유 샘플에서 결정성 PHBV 고분자 사슬에 존재하는 에스테르(ester) 그룹의 C=O stretching에 기인하는 특성 피크가 1721 cm^{-1}에서 확인되었고, 결정 부분의 C-O-C stretching에 해당하는 피크가 1271 및 1223 cm^{-1}에서 확인되었다.[15] 또한 PHBV의 O-C-C stretching vibration에 기인하는 특성피크가 1049 cm^{-1} 부근에서 확인되었다. 또한 고분자량 글루칸을 함유하고 있는 PHDE 및 PHLA 나노섬유는 3432 cm^{-1} 부근에서 덱스트란과 라미나린에 존재하는 -OH 그룹의 stretching vibration에 기인하는 피크가 관찰되었다. 이들 -OH 그룹에 기인하는 특성피크는 가수분해된 저분자량의 글루칸을 넣어줌에 의해서 더 낮은 진동 영역대로 이동하여 3355 cm^{-1} 부근에서 관찰되었다. 이는 PHBV와 저분자량 글루칸 사이의 분자간 수소결합이 증가된 것에 기인하는 것으로 판단된다.[16]

글루칸을 함유하는 나노섬유의 결정구조 변화를 알아보기 위해서 XRD를 이용하여 결정구조 분석을 행하였다. PHBV는 3-hydroxyvalerate(HV)의 함량이 50 mol% 이하에서는 poly(3-hydroxybutyrate)(PHB)의 결정구조를 보이지만, HV의 함량이 50 mol% 이상에서는 poly(3-hydroxyvalerate)(PHV)의 결정구조를 보이는 것으로 알려져 있다.[17] 본 연구에서 사용된 PHBV는 8 wt%의 HV를 함유하고 있으므로 PHB와 동일한 결정구조를 가지고 있다. 모든 나노섬유 샘플에서 PHBV의 (020) 및 (110) plane에 기인하는 두 개의 강한 피크가

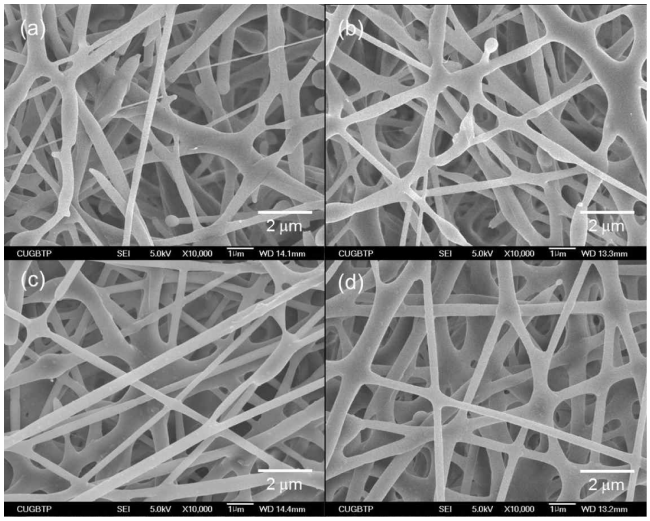

Figure 2. SEM micrographs of electrospun (a) PHDE; (b) PHLA; (c) PHHD; (d) PHHL nanofibers.

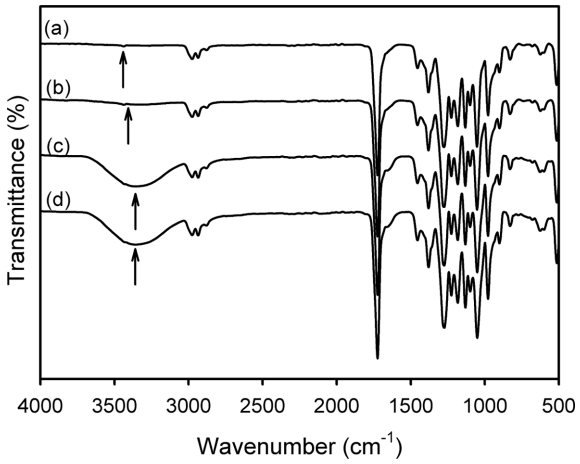

Figure 3. ATR-FTIR spectra of (a) PHDE; (b) PHLA; (c) PHHD; (d) PHHL nanofibers.

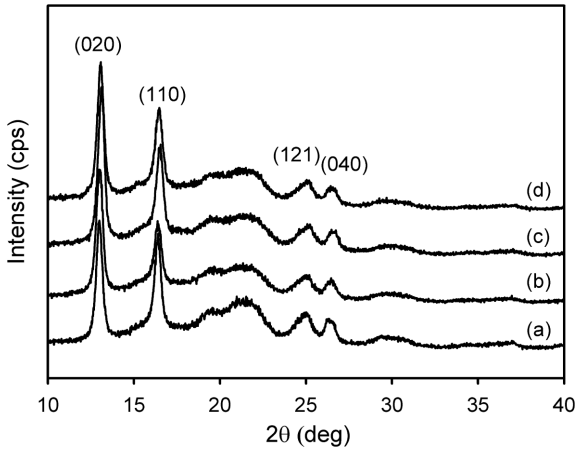

Figure 4. X-ray diffraction patterns of (a) PHDE; (b) PHLA; (c) PHHD; (d) PHHL nanofibers.

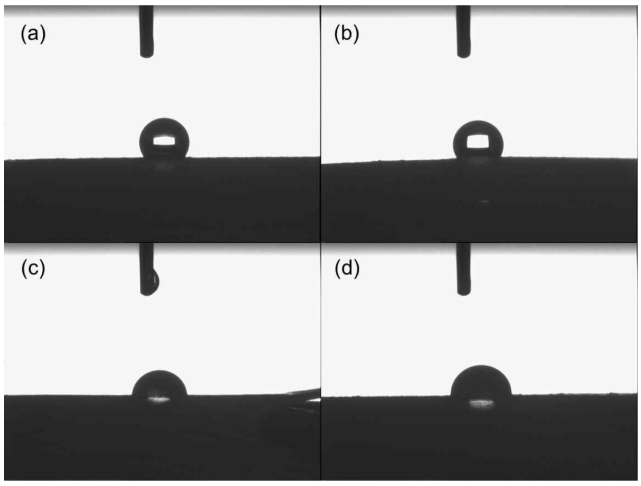

Figure 5. Contact angle changes of (a) PHDE; (b) PHLA; (c) PHHD; (d) PHHL nanofibers.

13.1°와 16.4°에서 관찰되었으며, 또한 (121)과 (040) plane에 기인하는 약한 회절 피크가 25.2°와 26.6°에서 나타났다(Figure 4). 그러나 고분자량의 글루칸 또는 저분자량의 글루칸을 추가함에 의해서 PHBV의 결정구조에 미치는 영향은 나타나지 않았다.

나노섬유 표면의 미세구조, 친수성 및 표면 전하 등과 같은 물리적 특성도 세포의 점착 및 성장에 많은 영향을 준다. 그 중에서도 친수성은 세포의 점착과 퍼짐(spreading)에 직접적으로 영향을 주므로 매우 중요한 특성이라 할 수 있다.[18] 따라서 물접촉각 측정을 이용하여 나노섬유의 친수성을 평가하였으며, Figure 5에서 확인할 수 있는 것처럼 고분자량의 글루칸인 덱스트란과 라미나린을 함유하는 PHDE와 PHLA는 물접촉각이 111°와 108°로 높은 접촉각을 보였다. 그러나 저분자량의 글루칸을 함유하는 나노섬유의 물접촉각은 PHHD에서 86°, PHHL에서 85°로 낮아져서 저분자량 글루칸의 사용에 의해서 나노섬유의 친수성이 개선되었다는 것을 확인할 수 있었다.

나노섬유에서의 세포 생존율. 나노섬유가 악성흑색종의 절제 수술 후에 절제 부위의 재생과 암의 재발 방지의 기능을 동시에 부여할 수 있는지를 알아보기 위해서 먼저 *in vitro*에서 사람 유래의 피부 악성흑색종(A-375) 세포의 나노섬유 상에서의 성장거동을 MTT assay 방법을 이용하여 조사하였다. 고분자량의 덱스트란과 라미나린을 함유하고 있는 PHDE와 PHLA에서는 A-375 세포가 매우 빠른 속도로 성장하였으나, 저분자량의 가수분해된 덱스트란과 라미나린을 함유하고 있는 PHHD과 PHHL 나노섬유에서는 A-375 세포의 성장이 상당히 억제되고 있는 것이 확인되었다(Figure 6). 특히 β-글루칸인 라미나린의 저분자량 구조체가 함유되어 있는 PHHL 나노섬유에서 A-375 세포의 성장이 가장 효과적으로 억제되었으며, 이는 저분자량 라미나린의 악성흑색종 세포에 대한

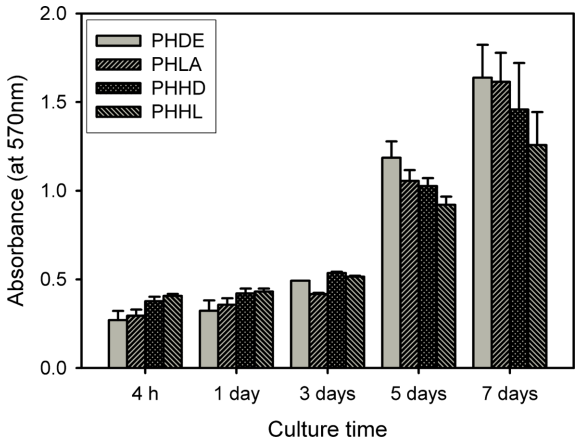

Figure 6. Cell viability of A-375 cells incubated on low or high molecular weight α-/β-glucans loaded nanofibers as a function of the culture time (n=5).

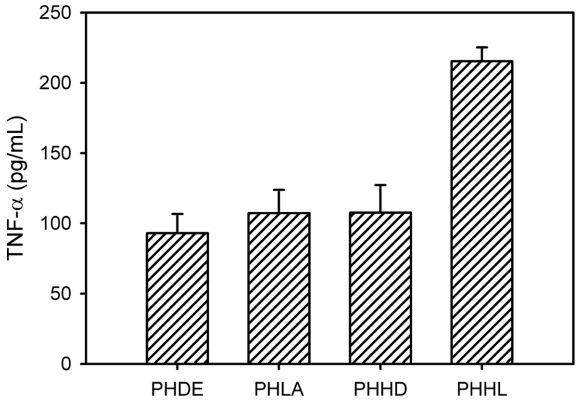

Figure 7. Levels of TNF-α released from THP-1 cells after incubation for 24 h on low or high molecular weight α-/β-glucans loaded nanofibers (n=5).

높은 세포독성 효과 때문이라고 생각되어진다.

일반적으로 β-글루칸의 생리활성은 분자량, 분기도, 곁사슬의 길이 등과 같은 물질의 분자구조에 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있다.[10] 이들의 분자량과 생리활성 상관관계에 대한 연구에서 고분자량의 라미나린은 단핵세포(monocyte)에 의해서 만들어지는 세포자멸사(apoptosis) 유발 사이토카인인 TNF-α의 생성 및 방출에 거의 영향을 주지 않았지만, 저분자량의 라미나린은 TNF-α의 생성을 가속화시키는 것으로 보고되어졌다.[8] 따라서 악성흑색종 세포에 대한 나노섬유의 세포독성 메카니즘을 알아보기 위해서 고분자량 또는 저분자량 글루칸을 함유하는 나노섬유에서 단핵세포인 THP-1 세포를 배양하여 이들 세포에 의해서 발현되는 TNF-α를 정량하였다. 그 결과 Figure 7에서 볼 수 있는 것처럼 고분자량 글루칸인 덱스트란과 라미나린을 함유하는 나노섬유에서는 세포자멸사 유도 사이토카인인 TNF-α의 생성이 거의 촉진되지

않았으며, THP-1 세포에 의해서 발현된 TNF-α의 양도 매우 적었다. 또한 α-글루칸인 덱스트란의 저분자량 구조체가 함유되어 있는 PHHD 나노섬유에서도 TNF-α 발현양이 매우 낮은 것으로 보아 α-글루칸류는 분자량에 관계없이 단핵세포를 효과적으로 자극하지 않는 것으로 판단된다. 그러나 β-글루칸인 라미나린의 저분자량 구조체가 함유되어 있는 PHHL 나노섬유에서는 TNF-α 발현양이 현저하게 증가하였다. 이들 결과로부터 β-글루칸류는 분자량에 따라 암세포에 대한 세포독성이 다르다는 것을 알 수 있으며, 그 중 저분자량 라미나린이 가장 효과적으로 단핵세포를 자극하여 TNF-α 발현양을 증가시켰다. 따라서 TNF-α 발현양에 대한 영향이 저분자량 라미나린의 악성흑색종 세포에 대한 세포독성의 주요 원인인 것으로 판단되어 진다.

악성흑색종 세포에 대한 나노섬유의 세포독성을 다시 확인하기 위해서 SEM을 이용하여 세포의 성장을 관찰하였다. Figure 8에서 볼 수 있는 것처럼 고분자량 글루칸이 함유되어 있는 PHDE와 PHLA 나노섬유에서는 A-375 세포가 빠른 속도로 나노섬유의 표면에 점착하였고, 또한 빠른 속도로 성장하여 세포 배양 5일 후에는 나노섬유의 모든 표면을 세포가 덮고 있었다. 이들 결과로부터 PHDE와 PHLA 나노섬유는 악성흑색종 세포의 성장을 억제시키는 것이 아니라 촉진시키고 있다고 생각되어 진다. 그러나 저분자량의 라미나린을 함유하고 있는 PHHL 나노섬유에서는 세포자멸사 유도에 의해서 악성흑색종 세포의 성장이 억제되고 있다는 것이 확인되었다.

나노섬유가 악성흑색종의 절제 수술 후에 절제 부위의 재생에도 영향을 주는지 알아보기 위해서 정상 피부세포인 CCD-986Sk 세포를 이용하여 나노섬유 상에서의 세포의 성장에 대해서 조사하였다. 모든 나노섬유 샘플에서 CCD-986Sk 세포가 시간에 따라서 성장하고 있는 것이 관찰되었다(Figure 9). 특히 저분자량 라미나린이 함유되어 있는 PHHL 나노섬유에서 가장 빠른 세포 성장을 보였다. β-글루칸은 우수한 항산화성을 가지고 있다고 알려져 있으며, 특히 저분자량 β-글루칸이 고분자량보다 더 뛰어난 항산화성을 보인다는 보고가 있다.[8,10,11] 또한 앞에서 서술한 것처럼 저분자량 라미나린의 사용에 의해서 나노섬유의 친수성이 일부 개선되었다. 따라

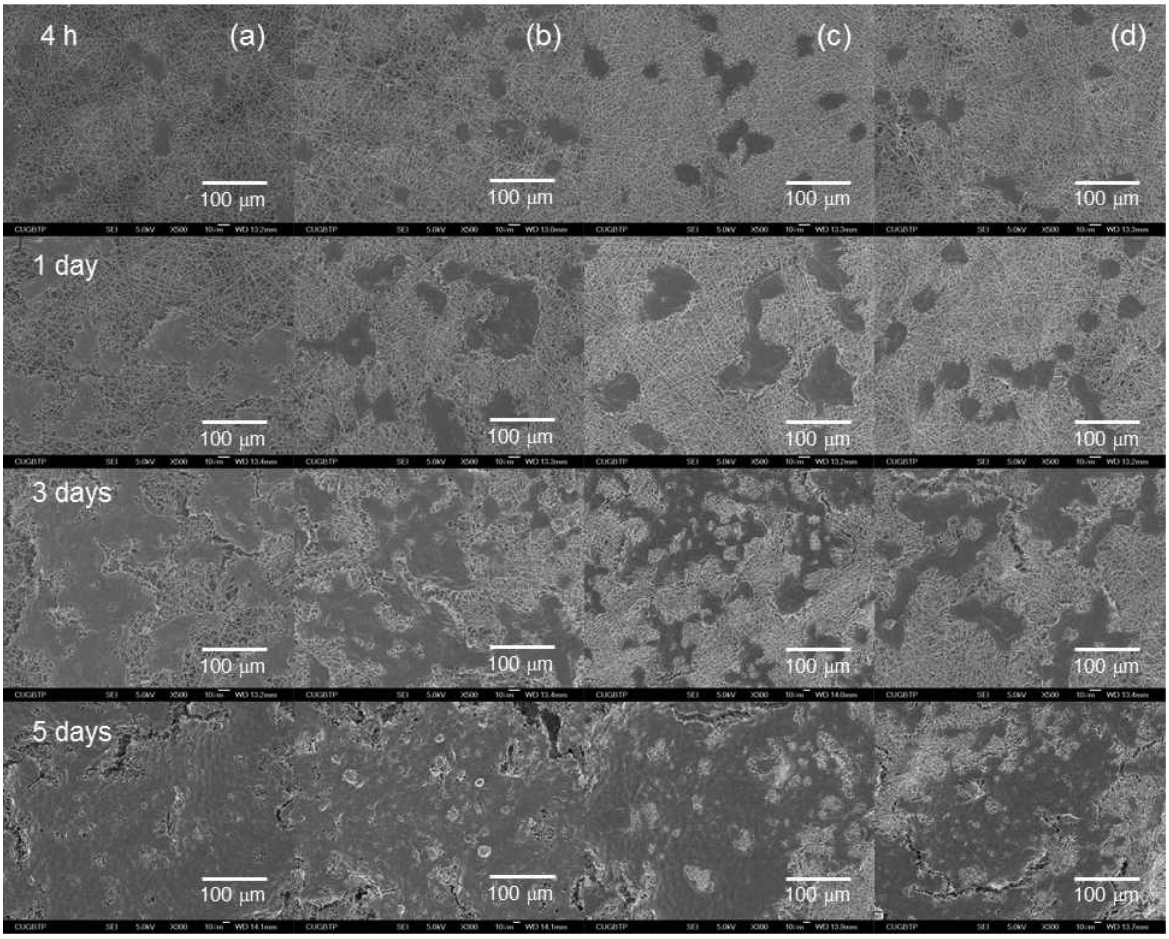

Figure 8. SEM micrographs of A-375 cells grown on (a) PHDE; (b) PHLA; (c) PHHD; (d) PHHL nanofibers for different periods of time.

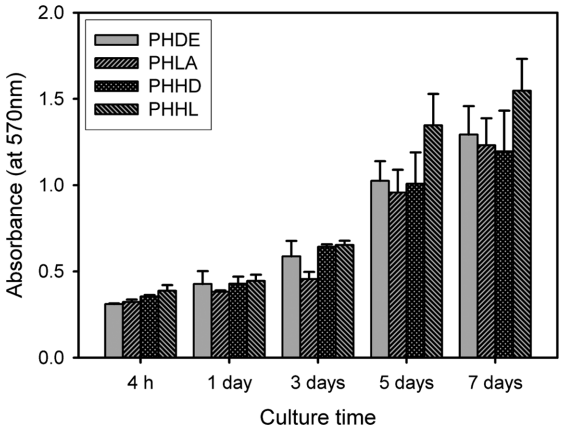

Figure 9. Cell viability of CCD-986Sk cells incubated on low or high molecular weight α-/β-glucans loaded nanofibers as a function of the culture time (n=5).

서 저분자량 라미나린을 나노섬유 제조에 사용함에 의해서 나노섬유의 친수성이 개선되었고 항산화성이 부여되어서, 그 결과 피부세포의 성장이 촉진된 것으로 판단되어 진다.

나노섬유 상에서의 피부세포의 성장거동을 확인하기 위해서 SEM을 이용하여 세포의 성장을 관찰하였다. Figure 10에서 볼 수 있는 것처럼 모든 나노섬유 상에서 CCD-986Sk 세포가 시간에 따라 잘 성장하고 있는 것이 관찰되었으며, 저분자량 라미나린을 함유하고 있는 PHHL 나노섬유에서 가장 빠른 피부세포의 성장이 관찰되었다. 이들 결과는 MTT assay 결과와 잘 일치하는 것으로 확인되었다.

결 론

악성흑색종의 절제 수술 후에 암의 재발을 방지하기 위해서 다양한 형태의 치료가 수반되고 있으나 아직도 부작용의 문제가 남아 있다. 또한 암조직 제거 수술 후에 남아 있는 상처 부분이 감염 없이 재생되는 것도 해결되어야할 문제점이다. 따라서 암조직 제거 수술 후에 사용될 수 있는 이상적인 창상피복제는 정상조직의 재생을 돕고, 암조직의 재발을 방

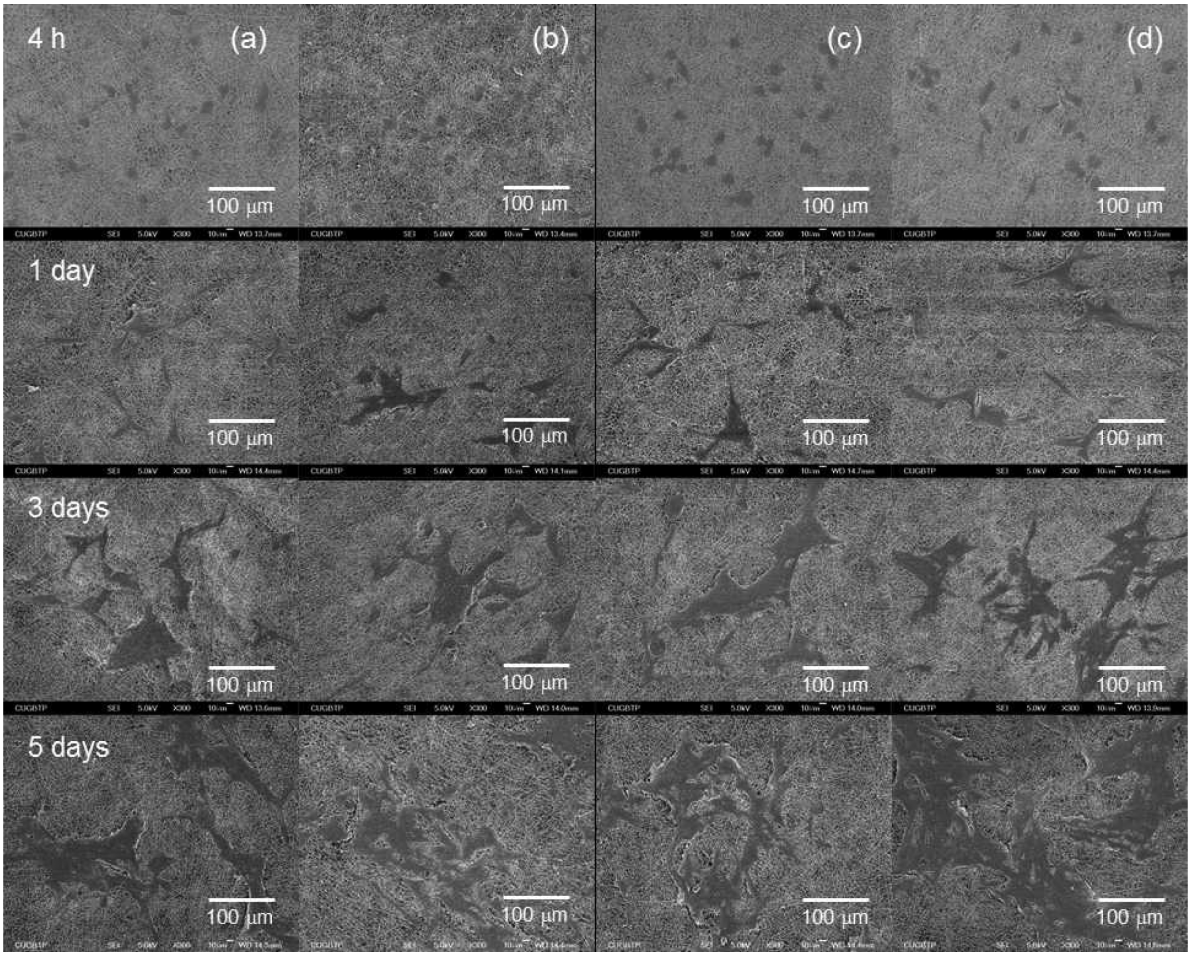

Figure 10. SEM micrographs of CCD-986Sk cells grown on (a) PHDE; (b) PHLA; (c) PHHD; (d) PHHL nanofibers for different periods of time.

지할 수 있는 기능을 가져야 한다. 본 연구에서는 정상 피부세포의 성장은 촉진시키고 악성흑색종 세포의 성장은 억제시키기 위해서 저분자량의 α- 또는 β-글루칸을 함유하는 나노섬유 지지체를 전기방사법으로 제조하였다. 제조된 나노섬유는 다공성 구조를 보였고, 글루칸의 분자량에 따라서 정상세포 및 암세포에 대한 나노섬유의 세포독성이 다르다는 것이 관찰되었다. β-글루칸인 라미나린의 저분자량 구조체가 함유되어 있는 PHHL 나노섬유에서 악성흑색종 세포의 성장이 가장 억제되었고, 정상 피부세포의 성장은 가장 촉진되었다. 이들 결과로부터 저분자량의 라미나린이 함유되어 있는 나노섬유는 새로운 조직공학용 지지체의 개발에 많은 도움이 될 것으로 생각된다.

감사의 글: 본 연구는 2015학년도 대구가톨릭대학교 연구년 중 수행한 것임.

참 고 문 헌

1. R. Greinert and M. Boniol, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **107**, 473 (2011).
2. R. Gordon, *Semin. Oncol. Nurs.*, **29**, 160 (2013).
3. M. C. F. Simões, J. J. S. Sousa, and A. A. C. C. Pais, *Cancer Lett.*, **357**, 8 (2015).
4. D. S. Shin and U. S. Kim, *J. Korean Bone Joint Tumor Soc.*, **17**, 30 (2011).
5. G. Whyte and A. T. Evans, *Surgery*, **29**, 480 (2011).
6. M. Y. K. Leung, C. Liu, J. C. M. Koon, and K. P. Fung, *Immunol. Lett.*, **105**, 101 (2006).
7. A. H. Abou Zeid, E. A. Aboutabl, A. A. Sleem, and H. M. El-Rafie, *Carbohydr. Polym.*, **113**, 62 (2014).
8. J. I. Choi, H. J. Kim, and J. W. Lee, *Food Chem.*, **129**, 520 (2011).
9. A. Autissier, C. Le Visage, C. Pouzet, F. Chauber, and D. Letourneur, *Acta Biomater.*, **6**, 3640 (2010).
10. A. L. Fuentes, L. Millis, and L. B. Sigola, *Int. Immunopharmacol.*, **11**, 1939 (2011).
11. A. Shah, F. A. Masoodi, A. Gani, and B. A. Ashwar, *Radiat. Phys. Chem.*, **117**, 120 (2015).
12. M. Pleszczyńska, J. Szczodrak, J. Rogalski, and J. Fiedurek, *Mycol. Res.*, **101**, 69 (1997).
13. E. C. Giese, L. G. Covizzi, R. F. H. Dekker, N. K. Monteiro, M. L. Corradi da Silva, and A. M. Barbosa, *Process Biochem.*, **41**, 1265 (2006).
14. A. R. Unnithan, N. A. M. Barakat, P. B. T. Pichiah, G. Gnanasekaran, R. Nirmala, Y. S. Cha, C. H. Jung, M. El-Newehy, and H. Y. Kim, *Carbohydr. Polym.,* **90**, 1786 (2012).
15. S. Kennouche, N. L. Moigne, M. Kaci, J.-C. Quantin, A.-S. Caro-Bretelle, C. Delaite, and J. -M. Lopez-Cuesta, *Eur. Polym. J.,* **75**, 142 (2016).
16. B. Fei, C. Chen, H. Wu, S. Peng, X. Wang, and L. Dong, *Eur. Polym. J.,* **39**, 1939 (2003).
17. N. Yoshie, M. Saito, and Y. Inoue, *Macromolecules*, **34**, 8953 (2001).
18. J. H. Wei, M. Yoshinari, S. Takemoto, M. Hattori, E. Kawada, B. L. Liu, and Y. Oda, *J. Biomed. Mater. Res. Part B; Appl. Biomater.,* **81B**, 66 (2007).