

헤스페리딘/PLGA 필름에서 망막색소상피세포의 부착과 증식거동

이소진 · 강수지 · 김혜윤 · 이정환 · 김은영 · 권순용* · 정진화*[†] · 주천기** · 강길선[†]

전북대학교 BIN 융합공학과 고분자나노공학과, *가톨릭대학교 의과대학 여의도성모병원 정형외과

**가톨릭대학교 의과대학 여의도성모병원 안과

(2013년 7월 17일 접수, 2013년 8월 22일 수정, 2013년 8월 26일 채택)

Adhesion and Proliferation Behavior of Retinal Pigment Epithelial Cells on Hesperidin/PLGA Films

So Jin Lee, Su Ji Kang, Hye Yun Kim, Jung Hwan Lee, Eun Young Kim, Soon Yong Kwon*,
Jin Wha Chung*[†], Choun-Ki Joo**, and Gilson Khang[†]

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

*Dept. of Orthopedic Surgery, Yeouido St. Mary's Hospital, Catholic University of Korea,
62 Yeouido-dong, Yeongdeungpo-gu, Seoul 150-896, Korea

***Dept. of Ophthalmology and Visual Science, Seoul St. Mary's Hospital, College of Medicine, Catholic University of Korea,
505 Banpo-dong, Seocho-gu, Seoul 137-040, Korea

(Received July 17, 2013; Revised August 22, 2013; Accepted August 26, 2013)

초록: 망막색소상피(retinal pigment epithelium, RPE)는 시기능을 유지하는데 중요한 역할을 하여 RPE의 퇴화는 여러 망막변성질환을 유발한다. 현재 이에 대한 효과적인 치료법이 부족하여 세포 이식에 적합한 지지체를 제작하기 위해, 생분해성 고분자인 PLGA와 항염증, 항산화 작용 등의 기능이 있는 헤스페리딘을 이용하여 하이브리드 필름을 제조하였다. ARPE-19를 파종한 후, MTT 분석법을 이용하여 세포 증식률을 확인하고, 세포의 부착 및 세포 형태를 SEM을 통하여 확인하였다. 또한 RPE 세포의 특이적 유전자 발현정도를 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였고, RPE65의 발현을 확인하기 위해 AEC 면역화학적 염색을 실시하였다. 그 결과, 헤스페리딘/PLGA 필름은 PLGA보다 RPE 세포의 부착, 증식 및 표현형 유지가 우수함을 확인하였고, 이를 통해 헤스페리딘/PLGA 필름의 망막재생을 위한 조직공학적 담체로써 응용 가능성을 확인할 수 있었다.

Abstract: Retinal pigment epithelium (RPE) plays an important role in maintaining the visual function and the degeneration of the RPE causes several retinal degeneration disease. In order to fabricate the suitable carrier for RPE transplantation, the hybrid poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) film with hesperidin was prepared. Hesperidin has an anti-inflammatory and antioxidant characteristics. ARPE-19 was seeded on hesperidin/PLGA film and then, cell proliferation was determined by the MTT assay, and cell adhesion and cell morphology were confirmed by SEM. Also, RT-PCR was performed to confirm the expression of the specific genes, and AEC immunohistochemical staining was performed to determine the expression of RPE65. As a result, we confirmed that attachment, proliferation and phenotype maintenance of RPE cells were more excellent on hesperidin/PLGA film than PLGA film, thereby we were able to confirm the potential applications of hesperidin/PLGA film as tissue engineering carrier for regeneration of retina.

Keywords: retinal pigment epithelial cells, hesperidin, PLGA, hesperidin/PLGA hybrid film.

서 론

망막색소상피(Retinal pigment epithelium, RPE)는 부르크막(Bruch's membrane)과 맥락막 사이에 위치한 육각형의 단세포

포 층이다. RPE 세포는 나이가 들면서 쌓이게 되는 지방갈색소를 포함한 멜라닌과 다른 색소들 때문에 얼룩이 있는 갈색을 띤다.^{1,3} RPE의 크기는 사람의 나이와 망막에서 세포의 위치에 의존한다. RPE는 벗어나는 빛 흡수, 혈관-망막 배리어 형성, 시각 색소의 재생, 광수용체 외부 조직의 식균작용 같은 생리학적으로 중요한 유지기능을 한다.^{4,6} 또한 주위조직인 광수용체 및 맥락막 모세혈관층과의 상호작용으로 시기

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

능을 수행하는데 아주 중요한 역할을 한다. 산업사회에서 망막 변성 질병은 실명의 원인이 된다.⁷ 전세계적으로 안 질환 환자 중 100만 명은 연령관련 황반변성(age-related macular degeneration, AMD), 망막색소변성증(retinitis pigmentosa, RP), 광수용체의 변성을 포함한 망막 변성으로 인해 질병이 발생하였다.⁸ 또한 당뇨병망막병증(diabetic retinopathy)은 젊은 사람들의 실명을 유도하며 당뇨와 관련된 심각한 합병증으로 나타난다.⁹ 이를 치료하기 위해서 다양한 지지체와 함께 RPE 세포를 이식하거나 세포를 부유시켜 주입하는 방법 등의 다양한 방법이 존재하고, 이 중 RPE 세포 이식법은 망막재생에 더욱 효과적이다.¹⁰⁻¹²

따라서 이식할 때 RPE의 낮은 안정성을 보완하고 단일 상피층을 유지하기 위한 재생의학적 생분해성 필름을 제작하여 RPE 세포에 적용시켜 망막재생을 위한 조직공학적 담체로서 응용 가능성을 확인하고자 하였다. 폴리글리콜산, 폴리락티산과 같은 폴리알파-하이드록시산 계와 이것의 공중합체인 PLGA는 합성고분자 중 미국 식품의약품안전청(FDA)의 승인을 받고 뛰어난 생체적합성과 조절 가능한 생분해성 및 편리한 가공성을 갖는다.¹³⁻¹⁵ 그러나 생체활성물질이 부족하고 소수성 성질로 인한 세포 부착 및 주변조직과의 융합에 어려움이 있어 세포의 활성이 낮은 단점이 있다.¹⁶ 이러한 PLGA의 단점을 보완하고자 사용한 헤스페리딘(3',5,7-trihydroxy-4-methoxyflavanone-7-rhamno-glucoside)은 감귤류에서 풍부하게 발견되는 플라바논 글리코사이드이다(Figure 1). 헤스페리딘은 항산화 효과, 항염증 효과, 항-고콜레스테롤혈증 활성, 항-고혈압성 활성, 이노특성을 갖고 있다.¹⁷⁻¹⁹ 망막이상에 대한 헤스페리딘의 효과는 혈관생성, 항산화성, 항염증성의 직접적인 영향뿐만 아니라 망막의 노화에 대해 억제 효과가 뛰어나다고 보고된 바 있다.²⁰

이를 이용하여 본 연구에서는 망막재생을 위한 생체적합성 고분자 PLGA와 항염증, 항산화 작용 등의 효과가 있는 감귤류 플라바논 중 하나인 헤스페리딘을 이용한 헤스페리딘/PLGA 하이브리드 지지체를 만들어 세포에 적용시키는 *in vitro* 연구를 진행하여 어떤 함량의 필름이 RPE 세포의 안정성과 부착, 성장에 가장 좋은 영향을 미치는지 확인하였다.

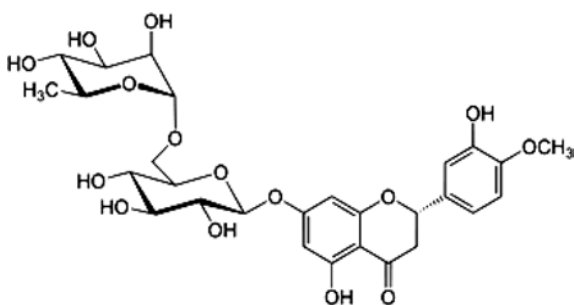


Figure 1. Chemical structure of hesperidin.

실 험

시약 및 재료. 생분해성 고분자인 PLGA(락타이드/글리콜라이드 몰비 75/25, Resomer® RG756, Boehringer Ingelheim Chem. Co. Ltd., Germany)는 평균분자량이 90000 g/mol인 것을 사용하였다. 헤스페리딘(Sigma, USA)은 평균분자량 610.56 g/mol인 것을 사용하였다. 메틸렌클로라이드(MC, Tedia Co. Inc., USA) 및 이외의 모든 화학약품과 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다.

헤스페리딘/PLGA 필름의 제조. 용매 증발법을 이용하여 PLGA와 헤스페리딘을 포함한 PLGA 하이브리드 필름을 제조하였다(Figure 2). PLGA 0.3 g을 MC 6 mL 에 용해시켜 5 w/v%의 PLGA 용액을 준비한 후, PLGA 중량 0.3 g의 0, 5, 10 및 15 wt%에 해당하는 0, 0.015, 0.03 및 0.045 g의 헤스페리딘을 첨가하였다. 균일하게 분산된 필름을 제조하기 위해 볼텍싱하였고, 디쉬에 부은 후 교반시켰다. 유기용매를 제거하기 위하여 실온의 평평한 장소에서 3일 건조시킨 후, 세포 파손을 위한 적절한 크기로 잘라 실험에 사용하였다.

접촉각 측정. 헤스페리딘의 함량이 다른 각 헤스페리딘/PLGA 필름에 물방울을 떨어뜨려 접촉각을 측정함으로써 친수성을 평가하였다. 일반적으로 시료와 물방울이 이루는 각도가 작을수록 친수성을 나타낸다.²¹ 1×1 cm² 크기의 각각의 필름에 증류수 10 μL를 떨어뜨리고 5분 간격으로 물 접촉각 측정기(Tantec™, CAM-PLUSmicro, USA)를 이용하여 필름의 표면과 물방울이 이루는 각도를 측정하였다. 접촉각을 측정하는 것을 3회 실시하였고 평균값을 취하여 평가하였다.

세포 및 배양. 실험에 사용한 ARPE-19 세포(Cell Line, ATCC catalog NO. CRL-2302)는 ATCC(American type culture collection)에서 구입하였다. 세포는 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM, Gibco, USA)과 F-12 영양배지 혼합액(Ham's F-12, Gibco, USA), 10% 우태아혈청(FBS, Gibco, USA) 및 1%의 페니실린-스트렙토마이신(PS, 100 units/mL 페니실린과 100 g/mL 스트렙토마이신)이 함유된 배양액으로 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

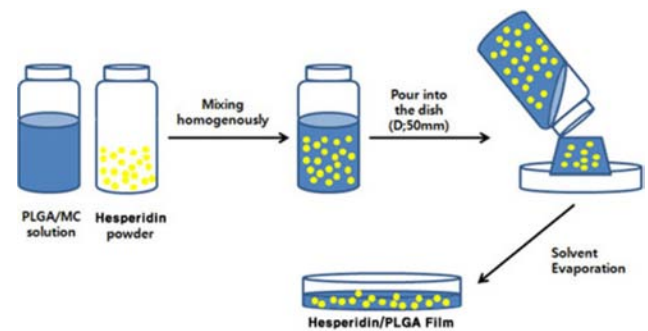


Figure 2. Schematic diagram for illustrating the fabrication process of hesperidin/PLGA films by solvent evaporation method.

Table 1. Primers and Protocol for Thermal Cycling

Species	Gene	Primer sequence	Protocol	Cycles
Human	GAPDH	F : 5'-acc aca gtc cat gcc atc a-3' R : 5'-tcc acc acc ctg ttg ctg ta-3'	D=94 °C; 30 sec A=60 °C; 30 sec E=72 °C; 1 min	24
	RPE65	F : 5'-gcc ctc ctg cac aag ttt gac ttt-3' R : 5'-agt tgg tct ctg tgc aag cgt agt-3'	D=95 °C; 15 sec A=60 °C; 30 sec E=72 °C; 1 min	35
	CRALBP	F : 5'-ttc cgc atg gta cct gaa gag gaa-3' R : 5'-act gca gcc gga aat tca cat agc-3'	D=94 °C; 30 sec A=55 °C; 40 sec E=72 °C; 40 sec	30

헤스페리딘/PLGA 필름에 세포를 배양하기 위해서 70% 에탄올에 필름을 담근 후, PBS로 3번 이상 세척하였다. 필름에 세포배양액을 넣어줌으로써 세포가 헤스페리딘/PLGA 필름에서 잘 자랄 수 있는 환경을 만들어 주었다. 세포를 필름에 파종하였고 세포에 사용한 배양액은 2일에 한번씩 교체하였다.

MTT. 제조한 헤스페리딘/PLGA 필름에서 세포의 생존율을 MTT(3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드, Sigma, USA) 분석법으로 확인하였다.²² 24 well 크기로 제작한 필름에 RPE(1×10^5 cells/필름)를 파종하였고, RPE를 배양한지 1, 2 및 3일째에 기존의 배양액을 제거하고 새로운 배양액 1 mL을 넣어준 후, MTT 시약을 100 μ L 씩 넣고 4시간 동안 37 °C 인큐베이터에서 배양하였다. 4시간 후, 디메틸 설펝사이드(DMSO, Sigma, USA)를 1 mL 씩 넣어 결정을 완전히 녹인다. 96 well에 샘플을 100 μ L 씩 분주하고 마이크로 플레이트 리더기(E-max, Molecular Device, USA)를 이용하여 흡광도 570 nm에서 측정하였다.

SEM 관찰. 헤스페리딘/PLGA 필름에서 헤스페리딘 함량에 따른 RPE 세포의 부착 및 모폴로지를 알아보기 위해 SEM 측정을 실시하였다. 24 well 크기로 제조한 필름에 RPE(1×10^5 cells/필름)를 파종하고, 1, 2 및 3일 동안 배양한 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척하였다. 이를 2.5% 글루타알데하이드(Sigma)로 24시간 동안 고정하고, 알코올 구배용액(50, 60, 70, 80, 90 및 100%)을 이용하여 각 30분씩 탈수과정을 진행하였다. 지지체를 잘라 시료홀더에 고정시킨 후, 아르곤 가스 하에서 플라즈마 스퍼터(Emscope, Model SC500K, UK)를 이용하여 약 200 μ m의 두께로 백금 코팅하고 이를 주사전자 현미경(Hitachi Co, Model S-2250N, Japan)을 이용하여 각각 세포의 부착 및 모폴로지 변화를 관찰하였다.²³

mRNA 분리 및 RT-PCR. 헤스페리딘의 함량을 조절한 헤스페리딘/PLGA 필름에서 RPE 세포의 유전자 발현 정도를 확인하기 위하여 RT-PCR을 실시하였다. 세포는 1×10^5 cells/필름의 농도로 계산하여 파종하였다. 세포의 배양액을 제거하고 1 mL의 Trizol(Invitrogen, USA)과 0.2 mL의 클로로포름을 처리하여 세포에서 RNA층을 분리하였고 상층액을 취하여 이소프로판올(Sigma, USA) 0.5 mL을 넣고, Polyacryl

CarrierTM(Molecules Res) 5 μ L을 넣어 RNA를 침전시켰다. RNA는 SuperScriptTM II Reverse Transcriptase(Intvirogen, USA)를 이용하여 cDNA로 역전사하였다. cDNA는 2유닛 Taq DNA 폴리머라아제를 포함한 PCR 마스터키트(Roche, Germany)를 이용하여 원하는 DNA의 특정 영역을 증폭시켰다. 프라이머는 GAPDH, RPE65, CRALBP를 사용하였다. PCR 후 증폭된 DNA를 ethidium bromide solution(EtBr, Sigma, USA)이 포함된 1.2%(w/v) 아가로스겔(Sigma, USA)에 전기영동을 수행한 후 상대적 발현을 시각화하여 300 nm 자외선 투과조사기(Vilber Lourmat ETX-20.M, France)로 촬영하여 밴드의 발현정도를 관찰하였다. 프라이머의 염기서열은 Table 1에 나타내었다.

면역화학적 평가. RPE 세포에서 특이적으로 발현하는 단백질질을 확인하고 각각의 필름에서 배양한 세포의 증식을 비교하기 위해 RPE 특정단백질인 RPE65를 이용하여 면역세포화학 염색을 수행하였다. 세포배양 1, 2 및 3일째에 PBS로 세척하고 10% 포르말린 용액으로 고정하여 4 °C에서 하루 동안 보관하였다. AEC 방법으로 면역세포화학적 염색을 수행하였고 1:200으로 희석한 Rabbit anti-RPE65 항체(sc-32893, Santa Cruz Biotechnology, INC., Europe)를 1시간 30분 동안 처리한 후, anti-rabbit 면역글로블린 항체(Immunotech, France)를 상온에서 20분 동안 처리했다. PBS로 세 번 세척한 후 streptavidin peroxidase reagent(Immunotech, France)를 첨가하여 다시 30분 방치하였다. PBS로 세 번 세척하고 Chromogen substrate(ultra tech AEC kit AEC substrate:ultra tech AEC kit AEC chromogen, 1:50) 발색을 확인하였다. 발색을 확인하기 위해 현미경을 통하여 200배율에서 관찰하였다.¹⁶

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

결과 및 토론

헤스페리딘/PLGA 필름의 친수성 평가. PLGA 필름과 헤스페리딘 함량을 달리하여 제조한 헤스페리딘/PLGA 필름은

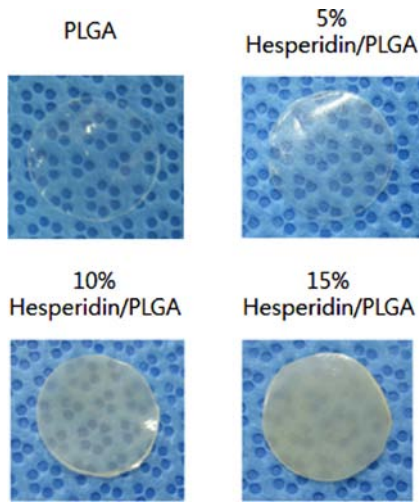


Figure 3. Photographs of surface of PLGA and hesperidin/PLGA films.

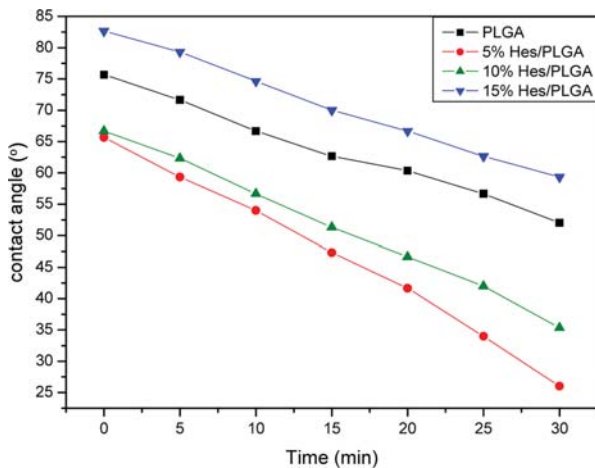


Figure 4. Water contact angle of hesperidin/PLGA film surfaces: PLGA only, 5, 10 and 15 wt% hesperidin/PLGA.

육안관찰 결과, 함량이 증가할수록 불투명해지는 것을 알 수 있었다(Figure 3). 이는 헤스페리딘이 아세톤, 클로로포름, MC 등의 용매에 용해되지 않기 때문에²⁴ 분산된 형태로 존재하였고, 따라서 함량이 증가할수록 헤스페리딘/PLGA 필름이 헤스페리딘 특유의 주황색을 띠는 것을 확인할 수 있었다.

헤스페리딘/PLGA 필름의 접촉각을 측정하여 친수성을 평가하였다(Figure 4). 친수성이 헤스페리딘의 함량과 비례하게 증가하지는 않았지만, 소수성인 PLGA에 5, 10 wt% 함량의 헤스페리딘 첨가는 수분 흡수를 도와 필름의 친수성이 증가하는 결과를 가져왔다. 반면에, 15 wt% 헤스페리딘/PLGA 필름은 PLGA 필름보다 높은 접촉각 결과를 보였다. 이는 헤스페리딘이 헤스페리딘의 아글리콘 형태인 헤스페리틴으로 구성되어 있고, 헤스페리딘은 헤스페리틴보다 친수성이나, 헤스페리틴은 소수성을 띠기 때문에²⁵ 함량이 증가하면서 소수성

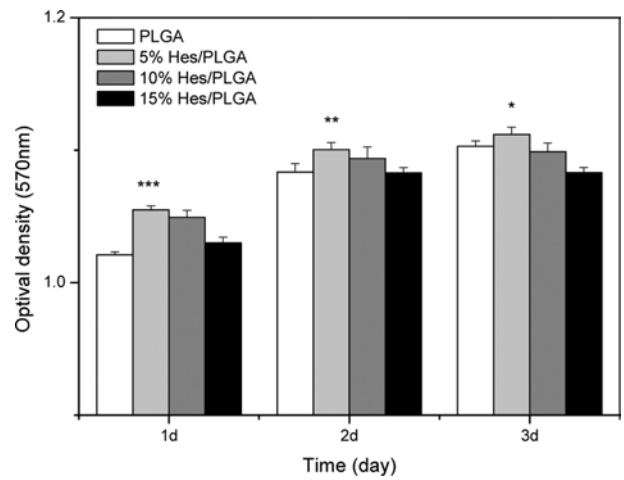


Figure 5. RPEs viability in hesperidin/PLGA film analyzed by MTT assay after 1, 2 and 3 days post-seeding (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

이 증가한 것으로 사료된다. 친수성을 갖는 표면은 세포 부착과 증식을 돕는다고 보고된 바 있다.²⁶ 따라서 친수성이 증가한 헤스페리딘/PLGA 필름은 세포 성장과 증식에 더 나은 환경을 제공할 것으로 사료된다.

헤스페리딘/PLGA 필름에서 RPE 세포의 부착 및 증식 거동 확인. 헤스페리딘 함량에 따른 헤스페리딘/PLGA 필름에서 RPE의 부착 및 증식 정도를 측정하기 위하여 필름에 RPE를 파종한 후 1, 2 및 3일째에 MTT 분석을 실시하였다(Figure 5). 분석 결과, PLGA 필름에 파종한 세포는 다른 군에 비해 초기에 가장 낮은 성장을 나타냈고, PLGA 필름에 비해 다양한 함량별 헤스페리딘/PLGA 필름에서 높은 증식률을 나타냈다. 시간이 지남에 따라 5 wt% 헤스페리딘/PLGA 필름에서 배양한 세포가 꾸준히 가장 높은 증식을 한 것을 관찰할 수 있었고, 10 wt% 헤스페리딘/PLGA 필름에서는 2 일째까지는 PLGA 필름에서보다 높은 증식을 보이다가 3 일째에는 비슷한 수준을 증식을 한 것으로 측정되었고, 15 wt% 헤스페리딘을 함유한 헤스페리딘/PLGA 필름에서는 3 일째에 가장 낮은 증식을 보였다. 15 wt% 헤스페리딘/PLGA 필름에서 배양한 세포가 낮은 증식률을 보인 것은 접촉각 측정 결과 가장 친수성이 낮았던 것과 일치함을 알 수 있었다. 헤스페리딘은 세포의 노화와 관련된 일산화질소(NO)의 합성을 10-30% 감소시켜 준다고 보고된 바 있다.²⁷ 이러한 헤스페리딘의 효과로 인해 RPE가 손상되지 않고 잘 부착할 수 있는 환경을 만들어 주고, 헤스페리딘의 영향으로 NO의 합성도 감소하여 세포의 괴사가 덜 일어나게 되어 세포의 증식이 잘 유지되었을 것으로 사료된다.²⁸

헤스페리딘/PLGA 필름에서 RPE 세포의 부착 및 모폴로지 확인. 헤스페리딘 함량에 따른 헤스페리딘/PLGA 필름에서 RPE의 부착과 세포의 형태 및 증식을 육안으로 관찰하기

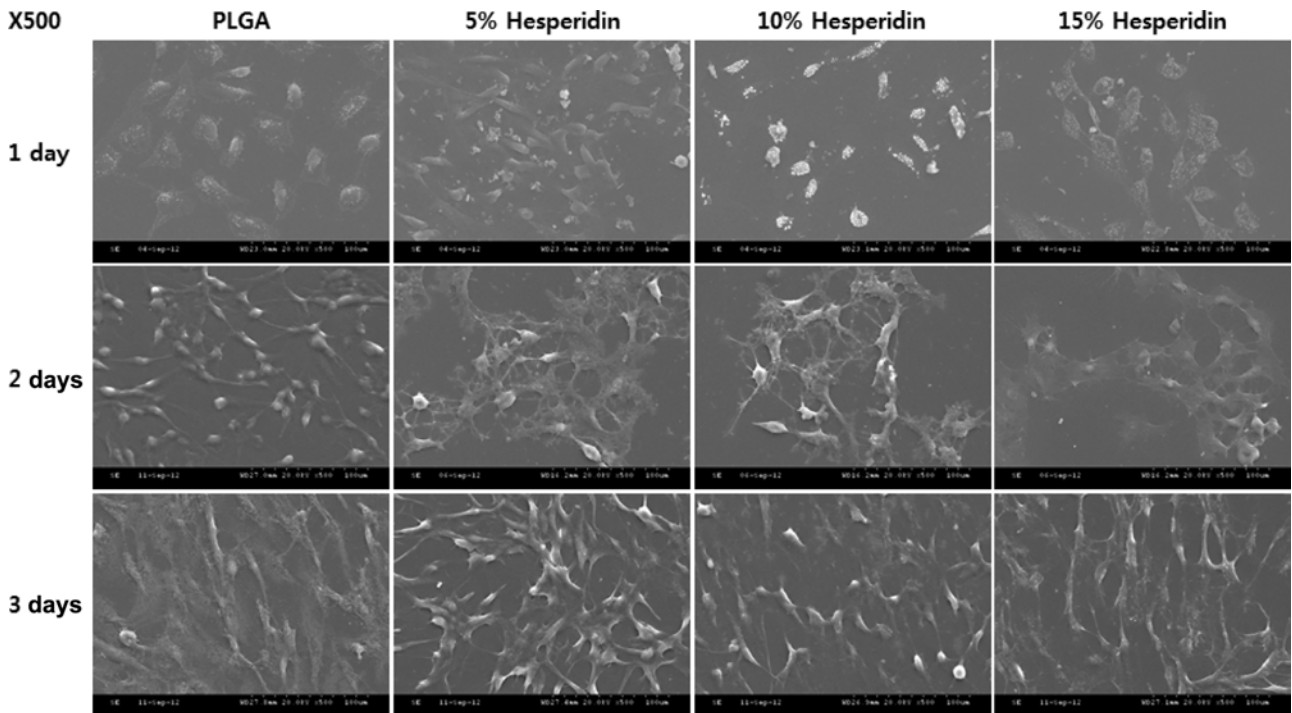
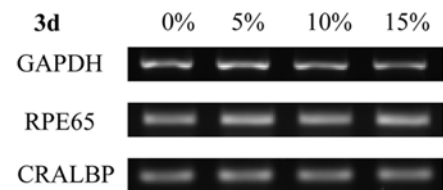


Figure 6. SEM micrographs of PLGA and hesperidin/PLGA scaffolds following hesperidin contents by means of the solvent-evaporation method (magnification; ×500).

위해 SEM 분석을 실시하였다(Figure 6). RPE 세포가 필름에 부착한 것을 관찰한 결과, 세포 부착 1일째에 PLGA 필름과 함량별 헤스페리딘/PLGA 필름 군에서 세포가 고르게 부착한 것을 확인할 수 있었다. 그러나 2일째에는 15 wt% 헤스페리딘/PLGA 필름에서 세포의 증식이 잘 일어나지 않음을 확인할 수 있었다. 이 결과는 앞서 측정된 MTT 분석결과와도 일치함을 보인다. 3일째에는 모든 군에서 시간이 지남에 따라 세포가 안정화됨은 물론 세포가 잘 증식하였지만, 특히 5 wt% 헤스페리딘/PLGA 필름에서의 세포 부착과 증식이 다른 군들에 비해 좋음을 관찰할 수 있었다. PLGA에서 증식한 세포의 모폴로지는 헤스페리딘이 첨가된 필름들보다는 좋지 않음을 확인하였다. 이 결과 또한 앞의 MTT 결과와 일치함을 보인다. PLGA 필름에서는 소수성 성질에 의해 부착에 도움을 주지 못했지만 헤스페리딘/PLGA 필름에서는 PLGA의 소수성을 보완하고 헤스페리딘이 세포와 친화력이 있는 재료로써 세포의 부착을 돕고, 헤스페리딘의 특징인 항산화 기능에 의해 세포가 빠르게 안정화되고 세포의 모폴로지를 유지하도록 도움을 준 것으로 사료된다.²⁷

헤스페리딘/PLGA 필름에서 RPE 세포의 특정 mRNA 발현정도 확인. PLGA 필름과 헤스페리딘/PLGA 필름에서 배양한 RPE에서 헤스페리딘의 함량에 따라 RPE의 특정 및 기능에 어떠한 영향을 주는지 확인하기 위해 RT-PCR을 실시하였다. mRNA 발현정도를 알아보기 위해 RPE 세포의 프라이머인 RPE65와 CRALBP를 사용하여 mRNA 발현정도를



(a)

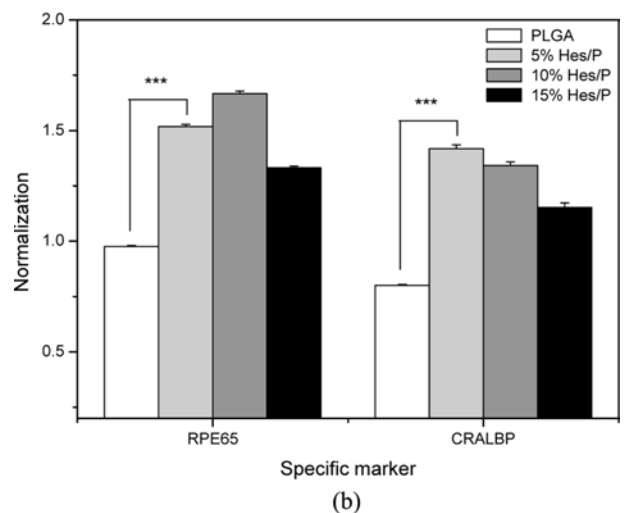


Figure 7. Gene expression profiles of GAPDH, RPE65, CRALBP as analyzed by RT-PCR after 3 days: (a) results of agarose gel electrophoresis; (b) normalization of GAPDH expression by RPE65 and CRALBP (***) $p < 0.001$.

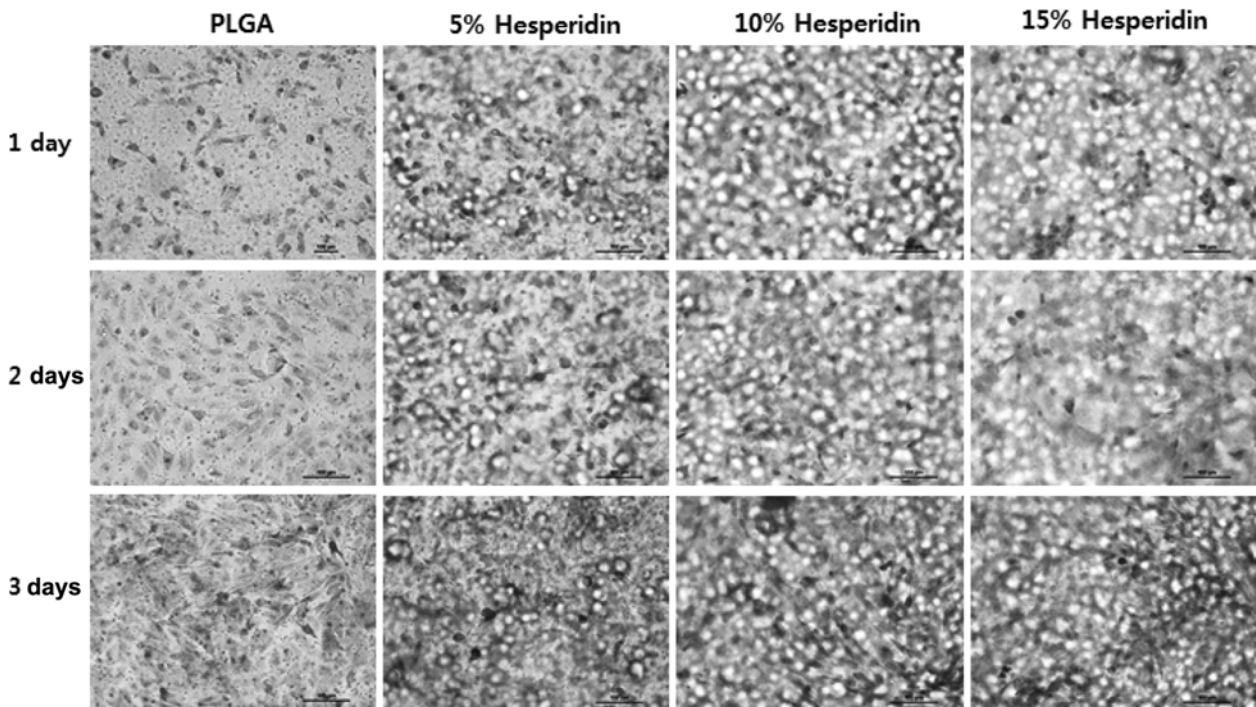


Figure 8. Microphotographs of anti-RPE65 staining with AEC method of films of PLGA, 5 wt% hesperidin/PLGA, 10 wt% hesperidin/PLGA, and 15 wt% hesperidin/PLGA at 1, 2 and 3 days after cell seeding (magnification; $\times 200$).

표준화시켜 그래프화하였다. 모든 군에서 house keeping gene 인 GAPDH가 일정하게 발현하였고, RPE에 특이적으로 존재하는 RPE65, CRALBP가 나타난 것을 확인할 수 있었다 (Figure 7(a)). 발현세기를 정확히 확인하기 위하여 그래프로 나타내었다(Figure 7(b)). Figure 7(b) 에서 확인할 수 있듯이, 3일째에 헤스페리딘을 함유한 모든 헤스페리딘/PLGA 필름에서 PLGA 필름보다 발현이 강하게 나타났다. RPE65의 경우, 5, 10 wt% 헤스페리딘/PLGA 필름에서 더욱 강한 발현이 나타났고, CRALBP의 발현은 5 wt% 헤스페리딘/PLGA 필름에서 가장 높은 발현이 나타났음을 확인하였다. 이러한 결과는 앞에서 기술하고 있는 결과와 부합하므로 헤스페리딘이 세포의 표현형 유지에 더 좋은 영향을 주는 것으로 사료된다.

헤스페리딘/PLGA 필름에서 RPE 세포의 특정 단백질 발현확인. RPE 세포에서 발현되는 특이 단백질 발현을 확인하고 각각의 필름에서 배양한 세포의 형태와 분포 양상을 평가하기 위해 RPE 세포를 배양한 PLGA 및 헤스페리딘 함량에 따른 헤스페리딘/PLGA에 AEC 방법을 통하여 면역세포화학 적 염색을 실시하였다. RPE 세포에서만 발현하는 특정 단백질인 RPE65를 1차 항체로 사용하여 1, 2 및 3일째에 관찰하였다(Figure 8). 1일째의 결과를 관찰하였을 때, PLGA 필름과 함량별 헤스페리딘/PLGA 필름을 비교한 결과 PLGA 필름과 다른 함량의 필름에서는 고른 부착이 나타났지만 15 wt% 헤스페리딘/PLGA 필름에서는 다른 함량에 비해 세포의 부착이 적게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 또한 2

일과 3일이 지나면서 세포가 증식하는 것을 발색한 분포를 통해 육안으로 확인할 수 있었고 2일째에 PLGA와 5 wt% 헤스페리딘/PLGA 필름에서는 좋은 모폴로지와 증식을 확인할 수 있었지만, 상대적으로 10, 15 wt% 헤스페리딘/PLGA 필름에서는 발현된 색이 약했으며, 모폴로지 또한 좋지 않음을 확인할 수 있었다. 특히 15 wt%에서 그 증식이 약했으며, 이 결과는 앞서 측정된 MTT의 2일째 결과와 일치한다. 3일째에는 PLGA 필름 군에서 세포의 증식은 많이 이루어졌지만, 그에 따른 세포의 모폴로지 변형이 나타났다. 이는 소수성인 PLGA 필름이 세포의 표현형 유지에 영향을 미친 것으로 사료된다. 이러한 세포의 단백질 발현의 경향성은 앞서 측정된 MTT와 SEM의 결과와 유사한 경향성을 나타냈으며, 이 결과로 헤스페리딘/PLGA 필름이 RPE 세포가 증식하고 표현형을 유지하는 데에 더 도움을 준 것이라고 사료된다.

결론

PLGA는 뛰어난 생체적합성, 생분해성 그리고 편리한 가공성을 갖고 있어 임상에 널리 적용되고 있지만 생체활성 물질의 결여와 소수성 성질로 인해 세포 활성이 낮은 단점을 가지고 있다. 헤스페리딘을 이용하여 PLGA의 소수성을 개선시켜 제조한 헤스페리딘/PLGA 필름에서 RPE 세포의 안정성과 부착, 세포 증식을 및 표현형 유지에 긍정적인 영향을 미치는지 확인하였다.

MTT 분석을 통하여 세포생존율과 증식률을 관찰하였고, SEM을 통하여 세포의 안정성과 부착 정도를 확인하였다. 그리고 AEC 염색을 실시하여 RPE 세포의 성장과 기능유지에 대하여 알아보았다. 그 결과 증식에서 5 wt% 헤스페리딘/PLGA 필름에서 초기 부착률과 증식, 특히 단백질의 발현이 우수한 것을 확인할 수 있었으며 시간이 경과함에 따라서 5 wt%의 헤스페리딘/PLGA 필름이 RPE의 생존에 유용함을 확인하였다. RT-PCR 결과에서는 PLGA 필름보다 RPE65, CRALBP의 mRNA 발현이 다양한 함량의 헤스페리딘/PLGA 필름에서 높게 나타나 헤스페리딘/PLGA 필름이 RPE의 성장과 표현형 유지에 긍정적인 영향을 미침을 확인하였다. 따라서 본 실험은 적절한 양의 헤스페리딘을 함유한 헤스페리딘/PLGA 필름은 RPE 세포에 긍정적인 영향을 미치므로 망막 재생에 있어 유용한 지지체로 사용될 수 있다는 정보를 제공할 것이다.

감사의 글: 본 연구는 2012년도 정부(미래부)의 재원으로 한국연구재단 바이오 의료기술개발사업의 지원을 받아 수행된 연구로(2012M3A9C6050204) 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. S. Beatty, H. Koh, M. Phil, D. Henson, and M. Boulton, *Surv. Ophthalmol.*, **45**, 115 (2000).
2. J. Ambati, B. K. Ambati, S. H. Yoo, S. Ianchulev, and A. P. Adamis, *Surv. Ophthalmol.*, **48**, 257 (2003).
3. D. T. Organisciak and D. K. Vaughan, *Prog. Retin. Eye Res.*, **29**, 113 (2010).
4. S. Aisenbrey, B. A. Lafaut, P. Szurman, S. Grisanti, C. Luke, R. Krott, G. Thumann, J. Fricke, A. Neugebauer, R. D. Hilgers, P. Esser, P. Walter, and K. U. Bartz-Schmidt, *Arch. Ophthalmol.*, **120**, 451 (2002).
5. O. Strauss, *Physiol. Rev.*, **85**, 845 (2005).
6. S. Binder, B. V. Stanzel, I. Krebs, and C. Glittenberg, *Prog. Retin. Eye Res.*, **26**, 516 (2007).
7. R. van Leeuwen, C. C. Klaver, J. R. Vingerling, A. Hofman, and P. T. de Jong, *Eur. J. Epidemiol.*, **18**, 845 (2003).
8. R. Klein, C. F. Chou, B. E. Klein, X. Zhang, S. M. Meuer, and J. B. Saaddine, *Arch. Ophthalmol.*, **129**, 75 (2011).
9. C. A. Shah, *Indian. J. Med. Sci.*, **62**, 500 (2008).
10. A. Kubota, K. Nishida, M. Yamato, J. Yang, A. Kikuchi, T. Okano, and Y. Tano, *Biomaterials*, **27**, 3639 (2006).
11. N. Yaji, M. Yamato, J. Yang, T. Okano, and S. Hori, *Biomaterials*, **30**, 797 (2009).
12. J. H. Lee, S. J. Park, H. J. Chun, and C. H. Kim, *Inter. J. Tissue Regen.*, **1**, 1 (2010).
13. C. T. Lee, C. P. Huang, and Y. D. Lee, *Biomol. Eng.*, **24**, 131 (2007).
14. T. Yoshioka, N. Kawazoe, T. Tateishi, and G. Chen, *Biomaterials*, **29**(24-25), 3438 (2008).
15. B. K. Gu, M. S. Kim, S. J. Park, and C.-H. Kim, *Inter. J. Tissue Regen.*, **2**, 83 (2011).
16. E. H. Jo, S. J. Kim, S. J. Cho, G. Y. Lee, O. Y. Kim, E. Y. Lee, W. H. Cho, D. W. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **35**, 289 (2011).
17. A. Garg, S. Garg, L. J. Zaneveld, and A. K. Singla, *Phytother. Res.*, **15**, 655 (2001).
18. A. Gil-Izquierdo, M. I. Gil, F. Ferreres, and F. A. Tomas-Barberan, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 1035 (2001).
19. S. T. Ahmad, W. Arjumand, S. Nafees, A. Seth, N. Ali, S. Rashid, and S. Sultana, *Toxicol. Lett.*, **208**, 149 (2012).
20. X. Shi, S. Liao, H. Mi, C. Guo, D. Qi, F. Li, C. Zhang, and Z. Yang, *Molecules*, **17**, 12868 (2012).
21. G. Thumann, A. Viethen, A. Gaebler, P. Walter, S. Kaempf, S. Johnen, and A. K. Salz, *Biomaterials*, **30**, 287 (2009).
22. T. Udono, K. Takahashi, M. Nakayama, O. Murakami, Y. K. Durlu, M. Tamai, and S. Shibahara, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **41**, 1962 (2000).
23. A. Y. Oh, S. H. Kim, S. J. Lee, J. J. Yoo, M. van Dyke, J. M. Rhee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **32**, 403 (2008).
24. N. Tirkey, S. Pilkhwil, A. Kuhad, and K. Chopra, *BMC Pharmacol.*, **5**, 2 (2005).
25. V. Kuntic, I. Filipovic, and Z. Vujic, *Molecules*, **16**, 1378 (2011).
26. Y. S. Song, J. I. Kwon, B. K. Kim, Y. Y. Jeon, G. Khang, and D. W. Lee, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **98**, 517 (2011).
27. Y. K. Rao, S. H. Fang, and Y. M. Tzeng, *Phytother. Res.*, **22**, 957 (2008).
28. L. Xiaoting, Z. Xiangyun, L. Shumei, D. Minghua, and X. Liang, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **664**, 193 (2010).