

Methylcellulose 조성 온도 감응성 졸-젤 유착방지제

김진 · 천서영 · 신동일 · 이창문*[†] · 이기영**[†]

전남대학교 신화학소재공학과, *전남대학교 의공학과, **전남대학교 화학공학부 & (주)바이오크로스모스
(2016년 11월 12일 접수, 2016년 12월 22일 수정, 2016년 12월 23일 채택)

Adhesion Barrier of Methylcellulose Based Thermo-Responsive Sol-Gel

Jin Kim, Seo Young Cheon, Dong Il Shin, Chang Moon Lee*[†], and Ki-Young Lee**[†]

Department of Advanced Chemicals and Engineering, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

*Department of Biomedical Engineering, Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea

**School of Chemical Engineering and Biocosmos Co., Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

(Received November 12, 2016; Revised December 22, 2016; Accepted December 23, 2016)

초록: 유착방지막을 제조하기 위해 methylcellulose(MC)와 xanthan gum(XT) 조성의 온도 감응성 졸-젤을 제조하였다. MC/XT 졸(sol)은 사람의 신체온도(37°C)에서 1분 안에 젤화(gelation)가 일어나는 것을 보였다. Rat에 온도 감응성 졸-젤을 주입하여 생체적합성 및 생체분해성을 확인하였다. 또한 온도 감응성 졸-젤이 장기 및 조직의 유착방지에 효과가 높은 것을 관찰하였다. 그 결과 MC/XT 졸-젤은 조직 유착방지막의 좋은 후보 물질임을 확인하였다.

Abstract: Thermo-responsive sol-gel was prepared from methylcellulose (MC) and xanthan gum (XT) for adhesion barrier. The prepared MC/XT sol-gel showed transition temperature and gelation around body temperature (37 °C) within 1 min. *In vivo* biocompatibility and biodegradability of the MC/XT sol-gel were validated by implantation of the gel in rats. Also, the MC/XT sol-gel was highly effective for the prevention of tissue and organ adhesion. Therefore, the MC/XT sol-gel can be a good candidate material as a tissue adhesion barrier.

Keywords: methylcellulose, xanthan gum, sol-gel, adhesion barrier.

서 론

온도 감응성 고분자는 온도 변화에 민감하게 반응하는 성질을 가지고 있어 그 응용범위가 다양하다. 현재 온도 감응성 졸-젤의 경우, 외부 자극에 반응하는 고분자의 물리화학적 특성을 이용하여 약물전달 시스템과 조직공학에 응용하기 위해 많은 연구가 진행되고 있다.¹ 이러한 온도 감응성 졸-젤을 의료용으로 응용하기 위해서는 체내에서 수분 내에 젤이 형성되고 체내에서 생분해가 일어나야 한다.² 특히, 생체 적합성을 가지고 있어야 하며 체내에서 분해 후 세포와 대사 장기에 손상이 없어야 한다.

졸-젤 전이를 보이는 온도 감응성 고분자로는 poly(*N*-isopropylacrylamide), pluronic, poloxamer(PEG-PPG-PEG triblock copolymer)가 사용되고 있다.^{3,4} 국내에서 생산된 유착방지제의 대부분에는 poloxamer가 포함되어 있다.⁵ 온도 감

응성 고분자는 식약청 고시 총 18가지 유형의 창상피복재 중 3등급에 속하는 심부 체강 창상피복재로서 수술 후 조직의 유착방지제로 활용된다.

현재 시판중인 제품으로는 제네웰의 Guardix-SG와 CG-Bio의 Mediclore 제품이 있는데 poloxamer에 알지네이트를 첨가시킨 것과 poloxamer에 젤라틴과 키토산을 첨가시킨 졸의 형태로 판매되고 있다.

의료용 소재로 활용이 가능한 알지네이트, 히알루론산, 텍스트란, 키토산 등의 천연 고분자는 뛰어난 생체친화성과 생분해성을 갖는 생체재료로 많은 연구가 되어 왔으나, 온도 감응성을 적용시킨 연구는 많이 보고되지 않았다.⁶

최근, 일부 셀룰로오스 유도체가 온도 감응성 졸-젤 전이 특성을 갖는 것으로 보고되었다. 하지만, 온도범위가 체온 정도일 때 졸-젤 전이가 일어나 생체 내에 활용하기 위해서는 추가적인 연구가 필요하다. Methylcellulose 소재는 EU, FDA, FAO/WHO에서 식품원료로 허가된 소재로 다양한 점도를 가진 제품으로 구성되어 있어 안정제, 증점제, 유화제, 코팅제, 현탁제, 기능성 식품 및 의약품 캡슐 등 다양한 용도로 광범위하게 사용되고 있다. Lin의 연구에는 methylcellulose을 이

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: cmlee@jnu.ac.kr; kilee@chonnam.ac.kr

©2017 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

용한 줄-젤 전이 관련 연구가 있다. 이를 바탕으로 체내에 적용이 가능하며 의료용으로 유용하게 응용될 수 있을 것으로 기대된다.⁷

본 연구에서는 온도 감응성 및 생체적합성이 뛰어난 methylcellulose를 생체재료로 활용하기 위해 다양한 조건에서 온도 감응성을 확인하고 유착방지제를 제조하여 생체적합성과 체내 생분해성을 갖는 유착방지막으로의 활용 가능성을 알아보려고 한다.

실 험

시약 및 재료. Methylcellulose(MC, 15 cP, 400 cP, 4000 cP), Xanthan Gum(XT, 800-1200 cP), NaCl, CaCl₂, Na₂HPO₄는 Simga사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 대조군으로 사용한 온도 감응성 유착방지제는 CG-Bio의 Mediclore였다. L-929 세포주는 한국 세포주 은행에서 구입하였고 세포배양용 Dulbecco' modified Eagle' medium (DMEM)과 trypsin-ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA)는 Gibco laboratories(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. Fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone laboratories(Logan, UT, USA)에서, 96 well tissue culture plates 및 tissue culture dish는 Nunc Inc.(North Aurora Road, IL, USA)에서 구입하였다. 그 외의 세포 배양에 필요한 기구는 Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하고, 그 외 모든 시약은 1급 또는 특급을 사용하였다.

MC 조성 줄의 제조. 4:1비율의 MC와 XT를 증류수에 넣은 후 0.3 M NaCl, CaCl₂, Na₂HPO₄를 첨가하여 줄을 제조하였다. 제조한 줄을 저온에 방치한 후 균일하게 교반하였고 제조한 줄의 안정화를 위해 제조 후 4시간 동안 4°C에서 방치하였다. 온도에 따라 줄-젤의 최적 비를 찾기 위해 15, 400, 4000 cP 점도를 가진 MC를 줄 형태로 만들어 실험하였다.

특성분석. 줄-젤 상 변화 특성 규명은 각 조성 용액을 각각 8 mL씩 정량한 후, 항온조에서 일정한 온도 간격으로 승온시키면서 각각의 온도에서 상 변화 현상을 관찰하였다. 측정 온도는 25에서 50°C이며, 이때 승온 간격을 1°C로 하여 지속적으로 상 변화를 관찰하였다. 또한, 조성물의 젤화 속도는 37°C에서 각각의 샘플의 젤이 되는 시간이다.⁸

줄-젤 상전이 온도 측정. Tube inverting method를 통해 MC와 XT 혼합 조성물의 줄-젤 전이 온도를 측정하였다. 혼합 조성물을 증류수에 녹인 후 4°C에서 하루 이상 보관하였다. 고분자 수용액을 0.5°C/min의 속도로 승온하면서 줄-젤 전이현상을 관찰하였다. 줄-젤 전이온도는 vial을 뒤집어 30초 후에도 흐름이 관찰되지 않는 온도로 정의하였다.

MC 조성 젤의 특성 분석. 제조된 MC와 XT 혼합 조성물 1 mL을 마이크로 튜브에 넣어 항온조(Jeiotech, Korea)에서 25부터 50°C까지 1°C씩 올려주면서 5분 유지시켜 각각의 젤

화 온도를 측정하였고, 젤화 시간은 항온조의 온도를 37°C로 고정하고 젤화 되는 시간을 육안으로 확인하여 측정하였다. 온도 증가에 따른 점도변화 측정을 위해 점도계(Brookfield, USA)를 사용하여 샘플 4 g을 spindle CP-21, speed 5 rpm 조건에서 온도를 올려가면서 점도를 측정하였다.

세포독성 실험. 국제 표준화기구 기준(ISO 10993)에 제시된 시험방법으로 평가하였다. MC와 XT 혼합 조성 줄-젤의 세포독성은 MTT-assay를 이용하였다. 줄-젤을 37°C에서 72시간 동안 세포 배양액에 용출시켜 실험에 사용하였다. MTT assay 법에서 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 시약은 세포 내로 흡수된 후 미토콘드리아의 succinate dehydrogenase에 의해 formazan을 형성한다. 96 well plate에 각 well 당 L-929 세포 5×10⁴ cells/well를 분주하고 24시간 후 다양한 농도로 제조한 시트 용출액을 함유한 DMEM 배양액으로 갈아준 후 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. Well 당 20 µL의 MTT 용액을 첨가하여 4시간 동안 반응시킨 후, 배양액을 버리고 DMSO 100 µL씩 넣어 formazan이 형성된 정도를 ELISA 측정기(ELX 808, Biotek Instruments, Vermont, USA)를 이용하여 570 nm에서 분광학적 방법으로 측정하였다.

생분해성 평가. 국제표준화기구 기준(ISO 10993-6)에 제시된 시험방법으로 평가하였다. Sprague-Dawley rat(Orient bio, Kyeonggi, Korea) (7주령, 220 g)의 backside의 피하조직(subcutaneous tissue)에 줄 상태의 용액을 23G 주사기 바늘로 주입하였다. 피하에 주입후 이식물의 캡슐화 정도와 염증의 정도를 평가하고 대식세포의 침투의 유무도 확인하였다.⁹

동물 실험. MC와 XT 혼합 조성 줄-젤의 유착방지 효과와 분해 거동을 확인하기 위하여 Sprague-Dawley rat(Orient bio, Kyeonggi, Korea) (5주령, 150~180 g) 모델을 이용하여 평가하였다. 본 실험은 전남대학교 동물 실험 윤리위원회에서 허가를 받은 후 실시하였다(CNU IACUC-YB-2016-40). 마취제로는 케타민과 럼폰을 이용하였고, 젤의 분해 시험은 rat의 등 피하에 1 cc 주입하여 시간대별로 부피를 측정하여 분해 정도를 확인하였다.

유착방지 효과를 확인하기 위하여 rat의 복부를 절개하여 맹장 표면과 복막에 1×1 cm² 크기의 인위적인 상처를 내서 강제 유착을 일으켰다. 상처를 낸 부위에 줄을 처리하여 1주일 후 쥐의 맹장과 복막의 유착 정도를 평가하였다. 유착 정도는 0~3까지 구분하였다. 유착 정도는 0; 유착이 일어나지 않은 경우, 1; 박리가 쉽게 되는 유착이 매우 적게 일어난 경우, 2; 유착이 중간 정도 일어난 경우, 3; 유착이 심하게 된 경우로 구분하여 평가하였다.

조직학적 평가. 조직학적 평가를 위해 수술 부위를 근육층과 경막을 포함하여 떼어낸 후 10% 중성 포르말린 용액에 24시간 동안 넣어 고정시킨 다음, 탈수화 용액에 48시간 넣어 충분히 탈수시킨 후 알코올로 건조시키고 파라핀 블록

을 만들었다. 이 블록을 6~8 μm 두께로 절편을 만들어 헤마톡실린-에오신(hematoxylin-eosin)염색을 하였고 현미경을 통해 관찰하였다.

결과 및 토론

MC 조성 졸-젤의 물리적 특성. 졸-젤 전이가 가능한 생체 적합성 고분자를 이용하여 37°C에서 빠르게 젤화되는 용액을 제조하였다. 상온에서 액체상태로 존재하며 주사기 제제로의 활용이 가능함을 확인하였다. MC는 heterogeneous 고분자로 hydrophobic과 hydrophilic으로 구성되어 있다.^{10,11} 온도와 염(salt)에 따라 고분자의 물성 변화가 자유로워 다양한 분야에 폭넓게 활용할 수 있다. Figure 1에서 MC의 농도와 염에 따라 달라지는 졸-젤 전이온도를 확인하였다. 농도가 높을수록 낮은 온도에서 빠른 젤화가 이루어지는 것을 확인할 수 있었다. Figure 2에서는 MC의 점도에 따라 달라지는 졸-젤 전이현상을 나타낸다. MC 2%, XT 0.5%로 고정하고 다양한 농도의 NaCl, CaCl₂, Na₂HPO₄가 첨가된 졸이 젤화 되는 것을 확인하였다. 낮은 점도의 MC에서는 염의 농도가 1M일 때 37°C에서 졸-젤이 형성되었다. Figure 2(c)는 4000 cP의 점도를 가진 MC 조성에 0.3 M의 Na₂HPO₄를 첨가했을 때 37°C에서 졸-젤 전이가 빠르게 형성되는 것을 나타냈다.

졸-젤 상전이 온도 측정. 0.3M의 Na₂HPO₄가 첨가된 MC/XT 조성의 졸은 농도에 따라 민감하게 젤화되는 것을 관찰하였다(Figure 3). 온도가 올라갈수록 점도가 증가하였다. 기존 연구에서 제시된 키토산에 글리세롤인산염 나트륨을 처리한 온도 감응성 졸-젤 조성과의 비교한 결과, Na₂HPO₄가 첨가된 MC/XT 조성의 졸은 1분 내에 젤로 전이됨을 관찰할 수 있었다. 체내 주입시 빠른 젤화가 필요로 하는 경우에 효율

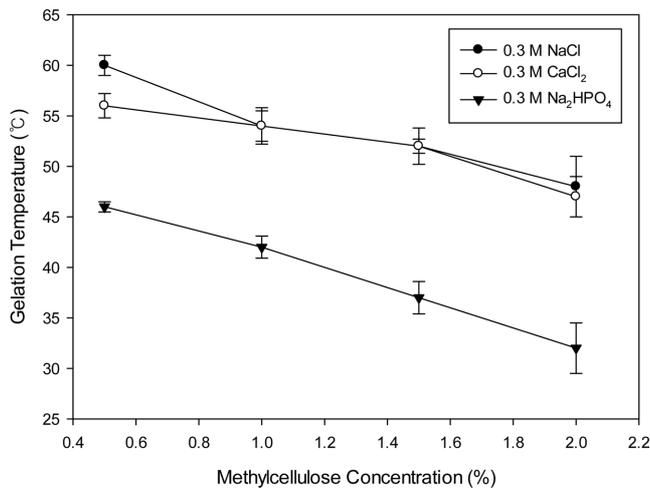


Figure 1. Gelation temperature of different salt depending on the MC sol with the increase of concentration.

적으로 활용될 것으로 판단된다.¹² CG-Bio의 poloxamer 조성의 온도 감응성 졸은 7분 정도에 졸에서 젤로 변화되지만 MC 조성은 1분 내에 졸에서 젤로 전이되는 것을 확인하였다(Table 1).

세포독성 평가. 온도 감응성 졸-젤 제조에 사용된 MC와 XT는 세포독성이 없는 물질이며 화장품, 식품, 의약품에 쓰이고 있다. 유착방지제로 활용하기 위해 염을 처리한 졸-젤

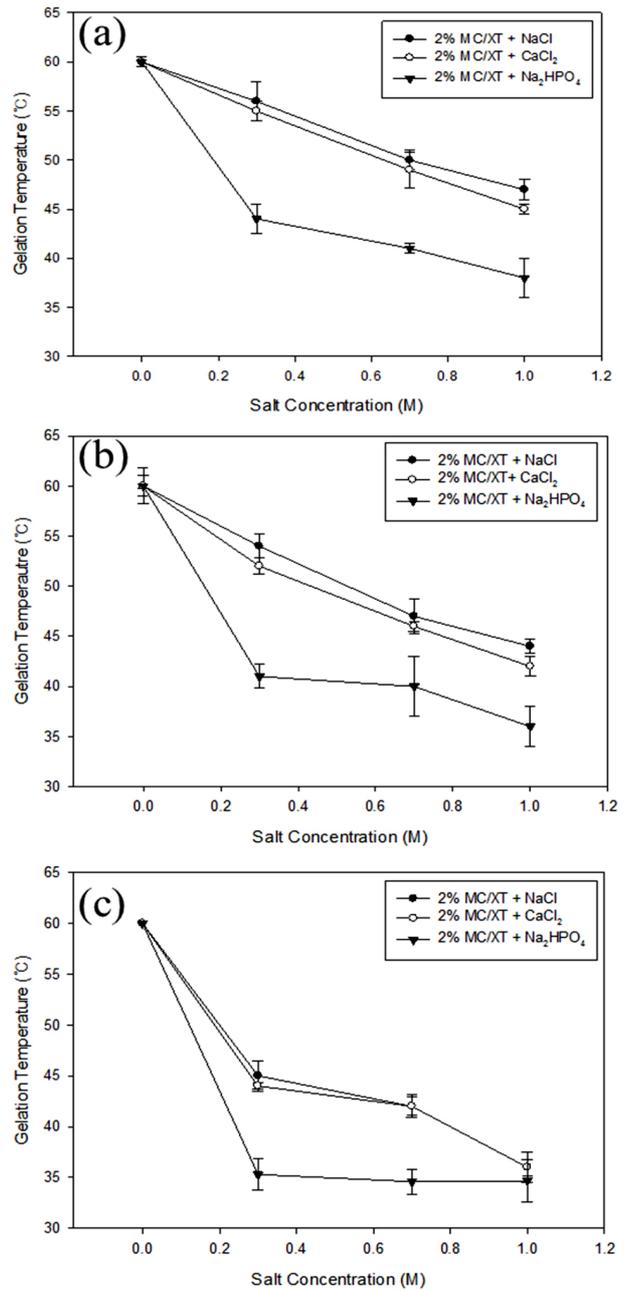


Figure 2. Sol-gel transition temperatures measured by tube inverting method. MC/XT sol with varying viscosity: (a) MC 15 cP; (b) MC 400 cP; (c) MC 4000 cP.

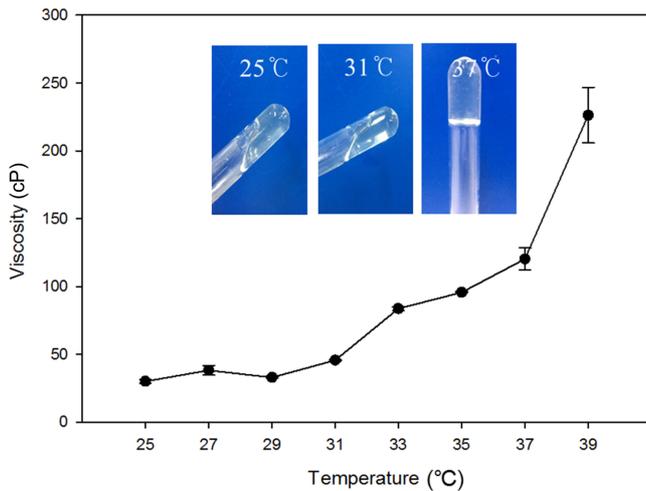


Figure 3. Temperature dependent viscosity changes of MC/XT- Na_2HPO_4 samples measured at 2 °C/min heating rate and sol-to-gel image of MC, XT-sensitive gel: the sol state at 25 °C; the gel state at 37 °C.

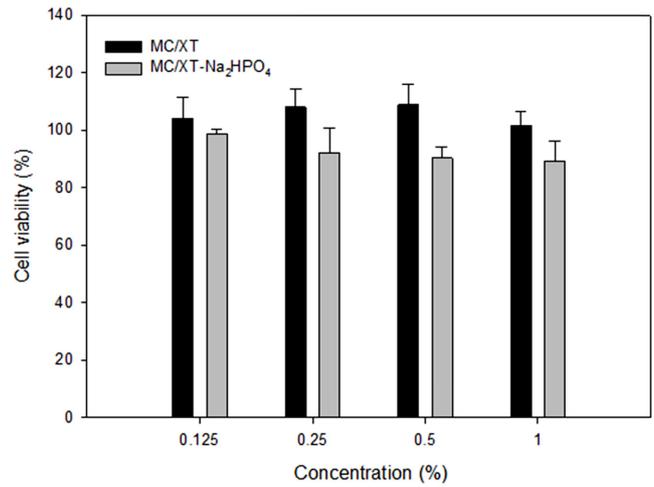


Figure 4. Cell viability of L929 cells assess of via MTT assay in the presence of 0.125 to 1% MC/XT and MC/XT - Na_2HPO_4 sol-gel extracts after culturing for 24 h.

조성의 독성 평가를 진행하였다. L-929 세포를 이용하여 MTT assay 방법으로 실험을 수행하였다. 80%이상의 생존율을 관찰하였으며 인체내 적용이 가능한 물질로 판단하였다(Figure 4).

생분해성 평가. Na_2HPO_4 가 첨가된 MC/XT 조성 졸이 담지된 주사기에 바늘(23 G)을 이용하여 rat의 backside에 피하 주사(subcutaneous)하였다. 주사 후 30분에 사진을 촬영하였다(Figure 5, 0 day). Na_2HPO_4 가 첨가된 MC/XT 조성의 졸-젤 형태를 나타냈다. 1일에서 7일의 사진은 졸-젤이 점차 팽윤되어 부피가 늘어난 것을 확인할 수 있었다. 14일에서부터 점차 졸-젤의 부피가 감소되었다. 30일이 경과되면서 분해되

어 사라진 것을 확인할 수 있었다. Figure 5(b)에서의 조직학적 평가를 관찰한 결과 조직 내에서 초기에 염증세포를 관찰할 수 있었으며 시간이 경과됨에 따라 주입한 졸-젤이 분해되고 염증세포가 감소하는 것을 조직학적 평가에서 확인할 수 있었다. *In vivo* 결과를 통해 Na_2HPO_4 첨가한 MC/XT 조성의 졸-젤은 생체적합하고 및 생분해가 가능한 소재임을 확인했다.¹³

복막 유착방지효과. Figure 6에서 음성대조군(non-treatment)은 맹장과 복벽에 강하게 유착된 것으로 확인되었다. 또한 주사제형(졸-젤)으로 처치한 양성대조군 5마리 중 한 마리에서 유착이 발생하였다. 실험군인 Na_2HPO_4 가 첨가된 MC/XT 조

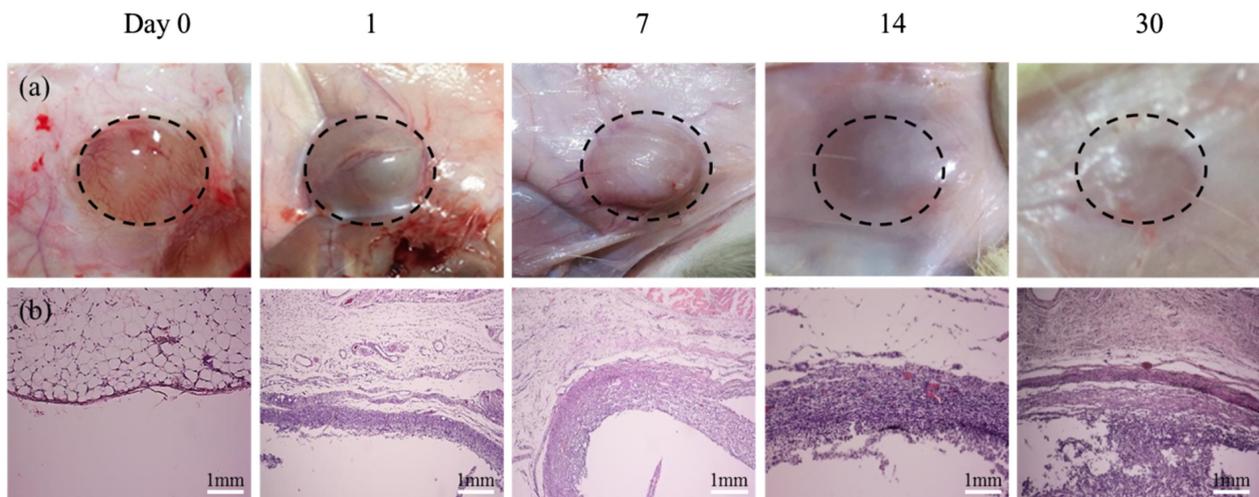


Figure 5. Photos of MC/XT- Na_2HPO_4 sol-gel after subcutaneous injection into backside tissues of SD rats (a); H&E staining of histological evaluation at 0, 7, 14, 30 days after injection of MC/XT- Na_2HPO_4 sol-gel surgery (b).

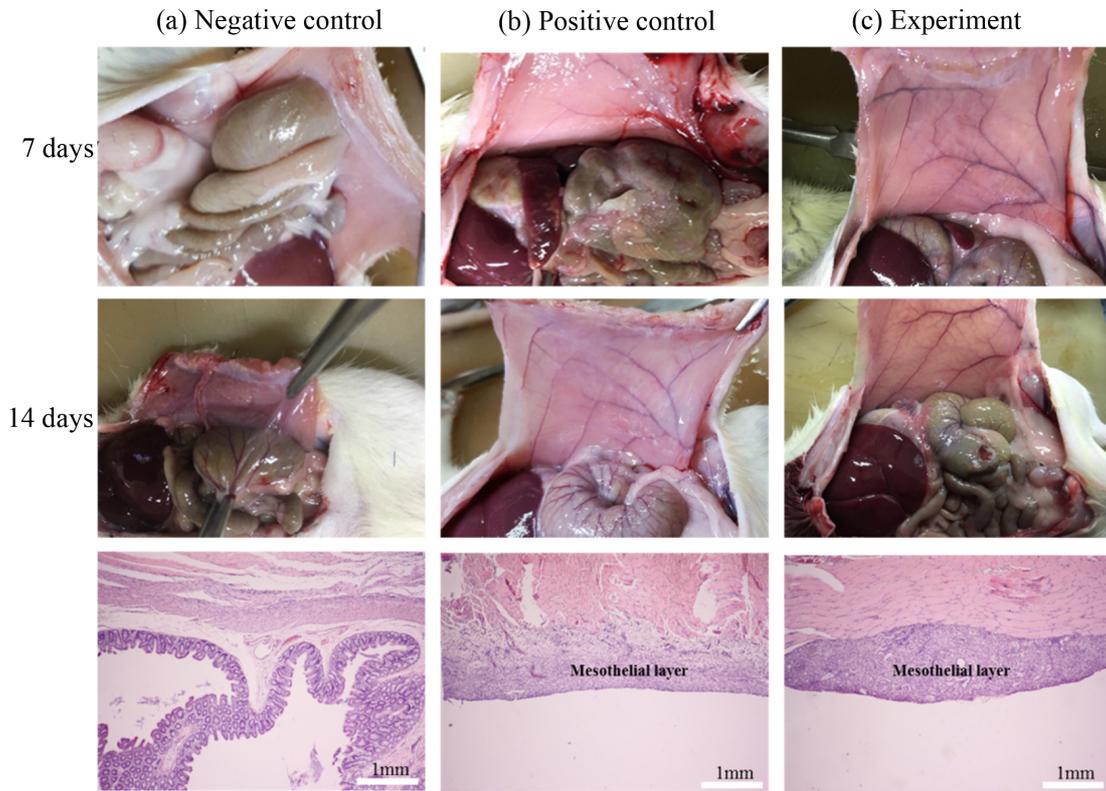


Figure 6. *In vivo* anti-adhesion effects of the control and the experiment group in rats: (a) a negative control not treated with gel; (b) a positive control treated syringe type solution; (c) MC/XT- Na₂HPO₄ sol-gel. Adhesion was apparent in the non-treated rat and in the syringe type solution treated rat after surgical damage of the surfaces of the abdominal wall and cecum. No adhesion was observed in the MC/XT-Na₂HPO₄ sol-gel treated rat at 7 and 14 days after the surgery and the wound to the peritoneum and cecum were healed.

Table 1. Composition and Gelation Characteristic of Sol-Gel Solution

Sample	Temperature (°C)			Temperature change	Gelation time (min) (at 37 °C)
	32	37	40		
MC(4000 cP, 2%), XT(0.5%), Na ₂ HPO ₄ (0.3 M)	sol	sol->gel	gel	32->37->40	1
Chitosan(1.5%), Glycerol phosphate(8%)	sol	sol->gel	gel	32->37->40	6
CG-Bio	sol	sol->gel	gel	32->37->40	7

Table 2. Postoperative Adhesion Formation Ratio, Grades and Score for 3 Groups

Group	No. of rats	Adhesion grades				^a Mean of score	^b Adhesion ratio (%)
		0	1	2	3		
Negative control	5	0	0	2	3	2.6	5/5(100)
Positive control	5	4	1	0	0	0.2	1/5(20)
MC/XT -Na ₂ HPO ₄	5	4	1	0	0	0.2	1/5(20)

^aMean of score = (adhesion grades × adhesion number)/total number. ^bAdhesion ratio = (adhesion number/total number)×100%.

성의 졸-젤을 처치한 그룹에서 5마리 중 한 마리에서 유착이 발생한 것이 확인되었다. 유착의 정도에 따라 0에서 3단계까지 분류하여 Table 2에 나타냈다. 동물실험 결과 음성 대조군에서 복벽과 맹장에 유착이 발생하였다(유착점수 2.6). 양

성 대조군으로 poloxamer 조성 온도감응성 액체타입의 주사 제형을 처리한 군에서는 유착점수가 0.2로 유착이 거의 발생되지 않았다. 실험군에서도 Na₂HPO₄가 첨가된 MC/XT 조성의 졸-젤을 처치한 군에서는 유착점수가 0.2로 유착이 거의

발생되지 않았으며 상처가 수복된 조직을 관찰할 수 있었다. 실험군에서 유착이 거의 형성되지 않은 것은 Na_2HPO_4 가 첨가된 MC/XT 조성 줄-젤이 상처부에서 젤화 되어 적절한 조직유착 방지 기능과 역할을 수행한 것으로 판단된다.^{14,16}

조직학적 평가. 실험 후 희생시킨 rat의 조직학적 평가를 Figure 6에 나타냈다. 실험군 조직은 이물반응으로 약한 정도의 염증세포 침윤 및 섬유화 현상의 소견이 보였다. 맹장과 복벽 사이에 삽입시킨 Na_2HPO_4 가 첨가된 MC/XT 조성의 줄-젤은 조직에 서서히 흡수되는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 줄-젤을 처치하였을 때 세포증식과 혈관형성을 위한 분해 및 흡수 과정의 반복으로 조직간의 장벽에 중피층(mesothelial layer)이 형성된 것을 관찰할 수 있었다. 연구결과, MC/XT 조성의 줄-젤은 유착방지 효과를 보임으로써 유착방지제로의 활용가능성을 확인하였다.

결 론

본 연구에서는 Na_2HPO_4 가 첨가된 MC/XT 조성의 온도 감응성 줄-젤의 유착방지막으로서의 적용 가능성을 평가하였다. 0.3 M의 Na_2HPO_4 가 첨가된 MC(4000 cP, 2%)/XT(0.5%)의 조성이 37°C에서 줄-젤로 빠르게 전이되는 것을 관찰하였다. 또한 Na_2HPO_4 가 첨가된 MC/XT 조성의 줄-젤을 rat에 주입하여 생체 내 적합성 및 생분해성을 평가한 결과 생체 내 무독성이며 30일 이내에 분해되는 것을 확인하였다. 또한 유착방지막의 기능을 평가하기 위해, 복강 내 유착을 일으켜 Na_2HPO_4 가 첨가된 MC/XT 조성의 줄-젤을 복강 내에 주입하여 유착방지막으로서의 역할을 확인하였다. 체내에서 안정적으로 젤이 형성되어 유착방지 역할을 하는 것이 확인되었다. Na_2HPO_4 가 첨가된 MC/XT 조성의 줄-젤은 다양한 장점을 보유함으로써 유착방지제 및 생체의료용 응용분야에 다양하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글: 이 논문은 2015년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2015H1C1A1035894), 2016년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2016R1A6A3A11935439).

참 고 문 헌

1. Y. Li, J. Rodrigues and H. Tomas, *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 2193 (2012).
2. A. Gutowska, B. Jeong, and M. Jasionowski, *Anatom. Record.*, **263**, 342 (2001).
3. R. Namgung and W. J. Kim, *Biomater. Res.*, **14**, 86 (2010).
4. L. Klouda and A. G. Mikos, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **68**, 34 (2008).
5. J. K. Park, J. W. Nah, and C. Y. Choi, *Polym. Korea*, **39**, 480 (2015).
6. H. S. You, M. O. Cho, I. S. Cho, Z. Li, N. H. Kim, M. K. Jang, S.-W. Kang, and K. M. Huh, *Polym. Korea*, **40**, 328 (2016).
7. L. Lin, *Macromolecules*, **35**, 5990 (2002).
8. J. K. Park, K. J. Lee, D. H. Son, C. Choi, M. K. Jang, and J. W. Nah, *J. Chitin Chitosan*, **16**, 45 (2011).
9. J. K. Kim, Y. W. Won, K. S. Lim, and Y. H. Kim, *Pharm. Res.*, **29**, 525 (2012).
10. K. Kabayashi, C. Huang, and T. P. Lodge, *Macromolecules*, **32**, 7070 (1999).
11. N. Sarkar and L. C. Walker, *Carbohydr. Polym.*, **27**, 177 (1995).
12. L. Li, H. Shan, C. Y. Yue, Y. C. Lam, K. C. Tam, and X. Hu, *Langmuir*, **18**, 7291 (2002).
13. K. Elham, G. Fariba, T. Mohsen, and S. Maryam, *Iran Polym. J.*, **22**, 785 (2013).
14. Z. Liu and P. Yao, *Carbohydr. Polym.*, **132**, 490 (2015).
15. A. G. Oh, *Biomater. Res.*, **17**, 138 (2013).
16. J. Kim, E. B. Cho, C. M. Lee, and K. Y. Lee, *Polym. Korea*, **40**, 306 (2016).