

혈행개선을 위한 키토산 나노입자화

이지수 · 윤현숙 · 김은서 · 남희섭¹ · 이현규*
한양대학교 식품영양학과, ¹동원F&B 동원식품과학연구원

Chitosan Nanoparticle System for Improving Blood Circulation

Ji-Soo Lee, Hyun-Sook Yoon, Eun Suh Kim, Hee Sop Nam¹, and Hyeon Gyu Lee*

Department of Food and Nutrition, Hanyang University
¹Research & Development Center, Dongwon F&B

Abstract The principal objective of this study was to produce a chitosan nanoparticle (NP) system for improving blood circulation. Chitosan NPs were prepared using fucoidan and poly- γ -glutamic acid (PGA), denoted as CS/Fu and CS/Fu/PGA NPs, respectively. As the chitosan concentration was increased, the activated partial thromboplastin time (APTT) of the NPs significantly increased ($p < 0.05$). When the concentration of fucoidan and γ -PGA was 5-20 and 1-10 $\mu\text{g/mL}$, respectively, the size of the CS/Fu and CS/Fu/PGA NPs was approximately 200 and 100 nm, respectively. With an increase in the fucoidan and PGA concentration, the APTT of CS/Fu and CS/Fu/PGA NPs significantly increased ($p < 0.05$). These results suggest that CS/Fu and CS/Fu/PGA NPs could be used as a potent NP system for improving blood circulation.

Keywords: blood circulation, activated partial thromboplastin time, nanoparticle, chitosan

서 론

인체 내 혈액은 정상적인 상태에서 혈관 내 지혈작용의 활성화 및 억제반응이 균형을 이루어 정상적인 혈류의 흐름을 유지한다. 그러나 혈장 내 혈액응고인자의 과도한 활성화와 혈소관의 응집 촉진에 의해 혈류 흐름의 항상성이 깨지면서 혈행장애가 초래된다(1,2). 혈액응고 과정에서 형성된 과도한 혈전은 혈관벽에 점착되어 혈류의 흐름을 방해하는 동시에 혈액의 점도를 증가시키고 혈액 내 산소와 영양소의 조직으로의 유입을 저해하여 혈전증을 비롯한 다양한 심혈관계 질환의 원인이 된다(3).

심혈관계 질환의 주요 원인이 되는 과도한 혈전형성을 방지하기 위하여, 혈행개선 효과가 기대되는 은행잎 추출물, DHA 농축유지, 홍삼 농축액 등과 같은 기능성 식품에 대한 연구가 지속적으로 수행되고 있다(4-8). 그러나 혈행개선 효능을 가지는 활성성분들은 대부분 유지, 폴리페놀, 글리코사이드 등으로 물에 잘 녹지 않는 난용성 성분들이기 때문에 체내 생체이용률이 낮은 단점을 가지고 있다(9). 이를 개선하기 위해서는 난용성 활성성분의 용해도와 안정성을 증진시킴으로써 섭취 후 장내 흡수를 증가시키고 체내에서 보다 안정된 상태로 체류되는 시간을 증가시키기 위한 연구가 필요하다. 그러나 혈행개선 활성성분의 단점 보완을 통해서 생체이용효율을 증진시키고자 하는 연구는 거의 진행된 바 없다.

최근 연구에 따르면, 난용성 성분의 용해도를 증진시키기 위해

서는 초미게 유체화, 고체 분산화, 복합체 형성, 계면활성제 사용, 유기용매 사용, 캡슐화 등의 방법이 연구되고 있다(10). 이중 캡슐화는 내부물질을 특정 조건에서 속도를 조절하여 방출시킬 수 있도록 피복물질로 포집시키는 기술로(11), 외부 환경에 민감한 활성성분을 보호함으로써 안정성을 향상시키며, 식품의 품질을 저해하는 이미와 이취를 마스킹(masking)하기 위한 방법으로 이용되고 있다(12,13). 식품산업에 적용되어 왔던 캡슐화 기술은 지금까지는 대부분 macro나 micro 단위의 미세캡슐, 비드, 미세유화 등의 형태로 이용되어왔다(14). 최근 나노기술의 발달로 입자 크기를 나노 단위로 감소시켜 표면적이 증가됨에 따라 용해도 및 장내 투과성이 향상되고 체내 체류시간이 증가함에 따라 생체이용률이 증가된다는 긍정적인 결과가 도출됨에 따라 약물 전달 시스템으로써 나노입자를 이용하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다(15,16). 캡슐화 방법으로는 분무건조, 분무냉각, 압출, liposome entrapment, coacervation, 복합체 형성, ionic gelation 등의 방법이 있다(17). 그 중 특히 ionic gelation은 유기용매와 같이 유해한 물질을 사용하지 않으며 고온처리 없이 비교적 완만한 조건에서 캡슐화가 가능하기 때문에 식품 및 의약품 분야에서 많이 이용되고 있다(18).

식품분야에서 피복물질로 주로 사용되는 키토산(chitosan)은 갑각류의 주요 구성 성분인 키틴을 탈아세틸화하여 생성된 다당류로 엔-아세틸글루코사민(N-acetylglucosamine)과 글루코사민(glycosamine)이 β -1,4-glycosidic 결합을 기본 구조로 하여 반복된 구조로 구성되어 있다. 특히, 키토산은 생분해되고 생체 적합하며 독성이 없어 식품 성분 및 약물의 전달 물질로 사용되고 있다(19,20). 하지만 키토산은 산성조건에서 용해되는 다당류로 중성 환경에서는 녹지 않아 약물 전달체로서 제한점 또한 보고되고 있다. 이를 보완하기 위해 분자량이 낮으며 유리 아미노 그룹을 가진 수용성 키토산이 연구되고 있다(21). 수용성 키토산은 변형이 쉽고 중성의 수용액에서 쉽게 용해되는 장점을 가지고 있다(22).

*Corresponding author: Hyeon Gyu Lee, Department of Food and Nutrition, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea
Tel: 82-2-2220-1202
Fax: 82-2-2292-1226
E-mail: hyeonlee@hanyang.ac.kr
Received February 5, 2016; revised March 25, 2016;
accepted March 28, 2016

키토산은 특히 천연 다당류 중 양전하를 나타내는 유일한 성분으로, 음전하를 갖는 성분과 ionic gelation에 의해 균일한 입자크기의 나노캡슐을 형성할 수 있기 때문에 산화방지, 항당뇨, 항염증 등을 위한 기능성 식품분야에서 나노캡슐의 피복물질로 활발하게 연구되고 있다(18). 또한 키토산은 상처 치유의 효과를 가지고 있고 혈소판의 응집을 촉진시켜 지혈제로써 효과적이라는 연구 결과가 있다(23,24). 이는 양전하를 띠는 키토산과 음전하를 나타내는 혈소판과 적혈구 사이의 이온적 상호작용에 의한 것으로 설명된다(25). 또한 현재까지 명확한 기전은 밝혀지지 않았으나 키토산에 의해 혈소판의 Ca²⁺ 농도가 증가되어 혈소판 응집을 촉진시킨다고 알려져 있다(23). 따라서 키토산은 매우 우수한 나노캡슐 피복물질임에도 불구하고 혈소판 응집을 촉진시키는 특성으로 인해서 다른 활성들과는 달리 혈행개선을 위한 전달체로써의 캡슐화 연구는 매우 미진한 상황이다.

폴리-감마글루탐산(poly-γ-glutamic acid, PGA)은 음전하를 띠는 수용성의 천연 고분자물질로 식용 가능하고 독성이 없으며, 생분해 되는 특성을 가지고 있어 식품, 의약, 화장품 산업에서 다양하게 이용되고 있다(26). 또한 음전하를 띠고 있어 양전하를 띤 키토산과 나노입자를 형성하여 인슐린 및 DNA, 헤파린 등의 전달체로 연구되고 있다(27-28). 특히 PGA는 혈액응고를 지연시킴으로써 혈전예방용 조성물로서의 가능성에 대해 연구되고 있다.

갈조류의 세포벽 성분인 푸코이단(fucoidan)은 수용성 음전하성 다당류로 주로 푸코스(fucose)와 sulfate로 구성되어 있다(29,30). 푸코이단은 체내에 축적되지 않고 쉽게 배출되어 인체에 안전한 성분이며 항암, 항바이러스, 면역조절제로 이용되고 있다(29). 특히 푸코이단은 혈액응고 억제물질인 헤파린과의 구조적 유사성에 의해 항혈액응고 작용을 하며, 혈액응고 과정 중 트롬빈(thrombin)의 활성을 억제하여 혈액응고를 지연하는 것으로 알려져 있다(31,32). 따라서 혈행개선 활성이 보고된 음전하 물질인 PGA와 푸코이단을 양전하의 키토산과 함께 나노캡슐의 피복물질로 활용한다면 혈행개선을 위한 나노 전달체로써 효과적인 것으로 예상된다.

본 연구의 목적은 키토산과 항혈액응고 기능을 가진 PGA와 푸코이단을 피복물질로 사용하여 혈행개선을 위한 나노전달체를 제조하는 것이다. 제조된 나노캡슐의 입자크기, polydispersity index (PDI), derived count rate를 측정함으로써 물리적 특성을 관측하

였고, 혈행개선 기능성평가를 위해서는 혈소판 응집능과 혈액응고시간을 분석하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

나노입자 제조에 사용된 수용성 키토산(Mw 1,000-3,000 Da)은 Kitto life Co. (Pyeongtaek, Korea)에서 구입하였으며, 푸코이단 (*Laminaria Japonica*)과 PGA (Mw 50 kDa)는 Haewon biotech (Seoul, Korea)와 Bioleaders Corp. (Daejeon, Korea)에서 각각 구입하였다. 혈소판 분리에 사용된 citrate-dextrose solution (ACD), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), bovine serum albumin (BSA) 등은 모두 Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 콜라겐은 Chrono-log Corp. (Havertown, PA, USA)로부터 구입하였으며, activated partial thromboplastin time (APTT)과 prothrombin time (PT) 시약은 Behnk Elektronik (Norderstedt, Germany)로부터 구입하여 사용하였다. 그 밖의 모든 시약은 1등급 혹은 특급을 사용하였다.

나노입자 제조 방법

나노입자는 ionic gelation 방법(33)에 의해 키토산과 푸코이단, PGA를 사용하여 키토산/푸코이단(CS/Fu)과 키토산/푸코이단/PGA (CS/Fu/PGA)의 2 종류로 제조하였다(Fig. 1). CS/Fu 나노입자를 제조하기 위하여, 키토산 용액 10 mL을 1,000 rpm으로 교반(WiseStir MS-MP8, Wisd Laboratory Instruments, Wertheim, Germany)하면서 푸코이단 용액 2 mL을 연동펌프(Master flex 77200-60, Cole Parmer Inc., Vernon Hills, IL, USA)를 이용하여 1.0 mL/분의 속도로 떨어뜨린 후 10분간 교반하였다. CS/Fu/PGA 나노입자는 CS/Fu 나노입자 제조방법과 동일하게 제조되며, 다만 푸코이단과 PGA 혼합액 2 mL을 키토산 용액에 떨어뜨려 제조되었다.

나노입자의 물리적 특성 측정

나노입자 분산액을 disposable cuvette에 넣고 Marvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK)를 이용하여 입자 크기, PDI, derived count rate를 측정하였다. 측정조건은 여러 peak를 동시에 나타낼 수 있는 multiple

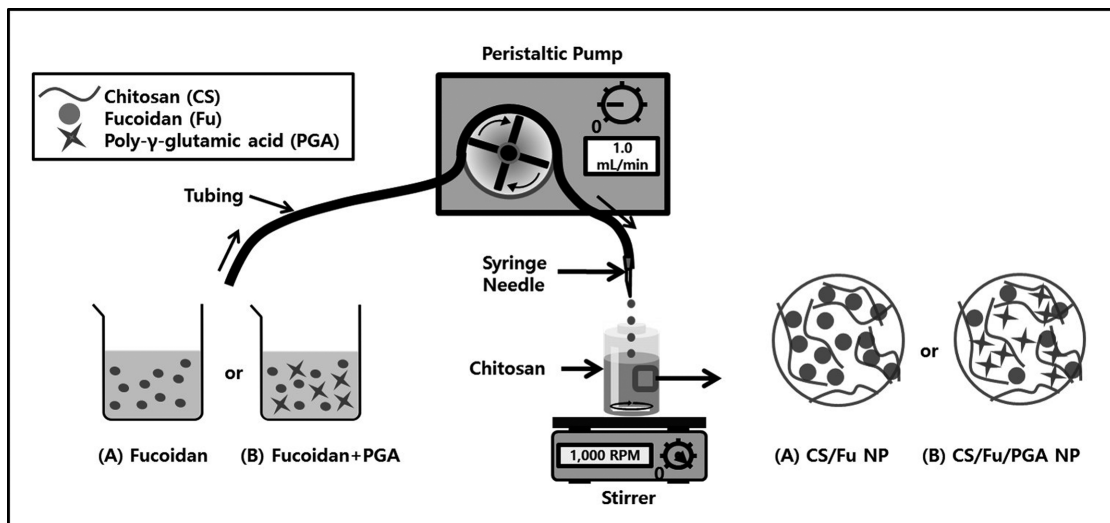


Fig. 1. Schematic diagram of CS/Fu and CS/Fu/PGA NPs.

narrow modes에서 수행하였고, 나노입자의 크기는 25±1°C에서 intensity distribution을 통하여 비교 분석하였다. 모든 시료는 3번 이상 측정하여 평균값으로 나타내었다.

Washed platelets의 조제

실험에 사용된 rabbit (New Zealand White Rabbit)은 코아텍 (Pyeongtaek, Korea)에서 구입하였으며, 사육장의 온도와 습도는 16-27°C, 40-60%으로 유지하였고, 사료는 오리엔트바이오(Sungnam, Korea)에서 구입하여 공급하였다. 혈액은 순환혈액량을 고려하여 2주에 한번 이동막에서 채취하였다. Washed platelets (WP)은 Yu 등(8)에 의해 보고된 방법을 변형하여 조제하였다. 항응고제로는 citrate-dextrose solution을 사용하였다. 혈액을 10분간 원심분리 (230×g)한 후 상층액인 platelet-rich plasma (PRP)를 얻었으며, PRP를 다시 원심분리(800×g, 10분)하여 platelet-poor plasma (PPP)와 혈소판 pellet으로 구분하였다. 혈소판 pellet은 1차 washing buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 3.5 mM HEPES, 5.6 mM D-glucose, 0.35% BSA, 0.4 mM EGTA, pH 6.5)를 이용하여 세포 서스펜션(cell suspension)을 만들어 충분히 세척한 후, 10분간 원심분리(800×g)하여 혈소판 pellet 층을 분리 하였다. 이 과정은 2차 washing buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 3.5 mM HEPES, 5.6 mM D-glucose, 0.35% BSA, pH 6.5)을 이용하여 반복되었다. 분리된 혈소판 pellet에 suspension buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 3.5 mM HEPES, 5.6 mM D-glucose, 0.35% BSA, 0.4 mM EGTA, pH 7.4)를 첨가하여 세포 서스펜션을 제조한 후, 혈구계수기(Vet ABC, Horiba, Kyoto, Japan)를 이용하여 혈소판 개수가 3.1×10⁸/mL이 되도록 조정한 후 사용하였다. 이 실험은 한양대학교 동물 윤리위원회의 승인(HY-IACUC-12-063)을 받았으며 위원회의 동물 실험 취급 규정에 따라 사용하고 실험하였다.

혈소판 응집능 측정

혈소판의 응집능은 aggregometer (Chrono-log 490, Chrono-log Corp., Havertown, PA, USA)를 이용하여 탁도 측정법으로 분석하였다. Washed platelets을 37°C에서 3분간 안정화시킨 후 시료를 처리하고 3분 후 혈소판 응집유도물질인 collagen (5 µg/mL)을 넣은 후 light transmission을 측정하여 혈소판 응집능을 측정하였다 (34).

혈액응고(PT, APTT) 활성 측정

혈액응고 기전 중 내인성과 외인성 경로에 미치는 영향을 분석하기 위하여 APTT와 PT를 혈액응고자동분석기(Fibrometer, Behnk Elektronik, Norderstedt, Germany)를 이용하여 측정하였다 (35). WP 분리과정에서 얻은 PPP (90 µL)에 시료(10 µL)와 PT reagent (200 µL)를 가한 후 37°C로 미리 incubation한 후 25 mM CaCl₂ (100 µL)를 넣고 응고시간을 측정하였다. APTT 또한 PT 측정과 동일한 과정으로 분석되었으며 PT reagent 대신 APTT reagent를 사용하여 응고시간을 측정하였다.

통계분석

모든 실험은 3회 이상 반복 수행하였고, 실험결과는 SPSS 17.0.0 (Statistical Package for the Social Science, Chicago, IL, USA)을 이용하여 일원배치분산분석(one-way ANOVA)으로 비교 분석 후 평균값±표준편차로 나타내었다. 통계적 유의성은 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 검정하였다.

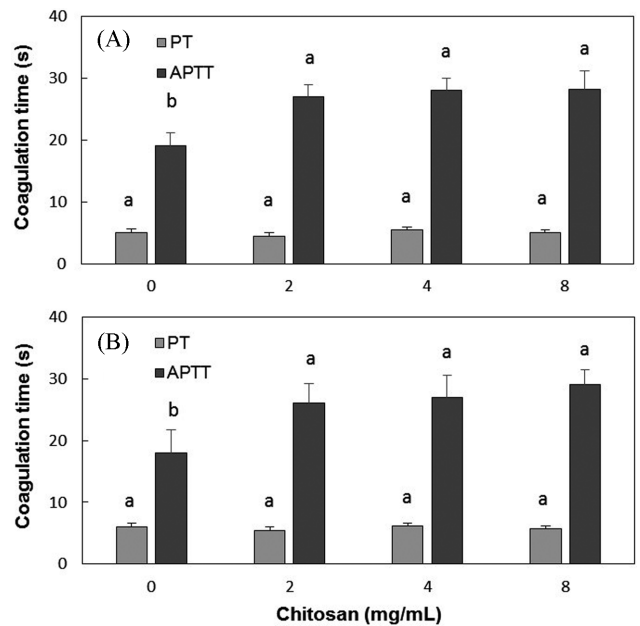


Fig. 2. Coagulation time (APTT and PT) of CS/Fu (A) and CS/Fu/PGA NPs (B) prepared with different concentration of chitosan. Values are means±standard deviation of three experiments. Different letters on the bars indicate significant differences (p<0.05). Fucoidan concentration of CS/Fu NPs in (A) was 5 µg/mL. Fucoidan and PGA concentrations of CS/Fu/PGA NPs in (B) were 10 and 1 µg/mL, respectively.

결과 및 고찰

키토산 농도에 따른 키토산 나노입자의 혈액응고 활성

혈액응고는 혈액응고인자들의 연속적인 활성화에 의해 일어나는데, 혈액응고의 최종 단계에서 혈관벽 손상 등에 의한 내인성 경로와 외상에 의한 외인성 경로에 의해 피브리노겐(fibrinogen)이 피브린(fibrin)으로 변화하며 혈전이 형성된다(36). 이때 내인성 경로에 의한 혈전 생성시간은 APTT로 측정하고 외인성 경로에 의한 혈전 생성시간은 PT로 측정한다. 키토산 농도가 나노입자의 혈액응고 활성에 미치는 영향을 분석하기 위하여, 다양한 키토산 농도에서 CS/Fu 및 CS/Fu/PGA 나노입자를 제조한 후 APTT 및 PT를 측정함으로써 혈액응고 활성을 측정하였다(Fig. 2). CS/Fu과 CS/Fu/PGA 모두, 키토산 농도에 따라 PT는 유의적 변화를 보이지 않은 반면, APTT는 키토산 농도가 2 mg/mL로 증가되면서 유의적으로 증가되었으며 그 이상의 농도에서는 다소의 증가는 보이나 유의적 차이는 나타내지 않았다. 따라서 키토산에 의해 CS/Fu과 CS/Fu/PGA 두 종류의 나노입자 모두 외인성 경로에 의한 혈전 생성시간이 지연됨을 알 수 있었다.

키토산 농도에 따른 키토산 나노입자의 혈소판 응집능

키토산 농도가 나노입자의 혈소판 응집능에 미치는 영향을 분석하기 위하여, 다양한 키토산 농도에서 제조된 CS/Fu 및 CS/Fu/PGA 나노입자의 혈소판 응집능을 측정하였다(Fig. 3). CS/Fu과 CS/Fu/PGA 나노입자 모두 키토산 농도가 높아질수록 혈소판 응집능이 유의적으로 증가되는 경향을 보였다. 이러한 현상은 전술한 바와 같이 양전하의 키토산과 음전하인 혈소판이 이온 상호작용을 통해 응집이 유발되었거나, 혈소판의 Ca²⁺ 농도를 증가시

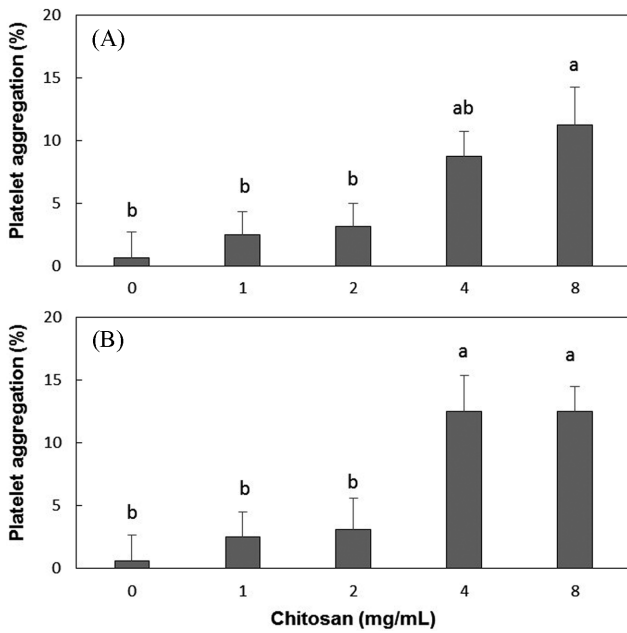


Fig. 3. Platelet aggregation of CS/Fu (A) and CS/Fu/PGA NPs (B) prepared with different chitosan concentration. Values are means±standard deviation of three experiments. Different letters on the bars indicate significant differences ($p < 0.05$).

켜 응집을 유발하였을 것으로 생각된다. 그러나 키토산은 ionic gelation에 의해 나노캡슐을 제조하기 위해서 필요한 양전하성 천연 다당류이기 때문에 대조군과 유의적 차이를 나타내지 않으면서 캡슐 제조를 위해 필요한 최소 농도인 2 mg/mL로 고정하여 이후 실험을 진행하였다.

키토산 입자의 물리적 특성

피복물질인 푸코이단과 PGA의 농도에 따른 키토산 나노입자의 물리적 특성을 파악하기 위하여, 먼저 푸코이단의 농도를 1-100 µg/mL의 범위에서 CS/Fu 나노입자를 제조한 후 입자크기와 PDI, derived count rate을 측정하였다(Fig. 4). 푸코이단의 농도가 1 µg/mL에서 10 µg/mL까지 증가됨에 따라 입자크기가 유의적으로 감소하다가, 푸코이단 농도가 그 이상 증가됨에 따라서는 입자크기의 차이 없이 유지되는 경향을 나타냈다. 이러한 현상은 음전하인 푸코이단의 농도가 증가됨에 따라 양전하인 키토산과 결합력이 강해지면서 구조적으로 조밀한 나노캡슐이 형성되기 때문인 것으로 판단된다. PDI는 전반적으로 약 0.4-0.5 정도로 푸코이단 농도 변화에 따른 뚜렷한 경향을 나타내지 않았다. Derived count rate은 푸코이단 농도가 1 µg/mL에서 20 µg/mL까지 증가될 수록 급격하게 증가하는 경향을 보였는데, 푸코이단 농도 20 µg/mL 이상에서는 증가경향이 다소 감소되는 경향을 나타냈다. 이는 푸코이단 농도가 1-20 µg/mL의 농도 범위에서는 푸코이단 농도증가에 따라서 형성되는 나노입자의 수가 급격하게 증가되지만, 그 이상 증가될 때에는 제조되는 입자의 수 측면에서 상대적으로 뚜렷한 차이가 없어 효율적이지 않은 것으로 판단된다. 따라서 푸코이단의 농도 5-20 µg/mL 범위에서 일 때 400 nm 이하의 비교적 작은 입자크기의 나노캡슐이 효율적으로 제조되었다고 판단된다.

CS/Fu 나노입자에서 유의적으로 가장 작은 입자크기를 나타내면서 효율적인 나노입자 형성을 나타낸 푸코이단 농도인 10 µg/

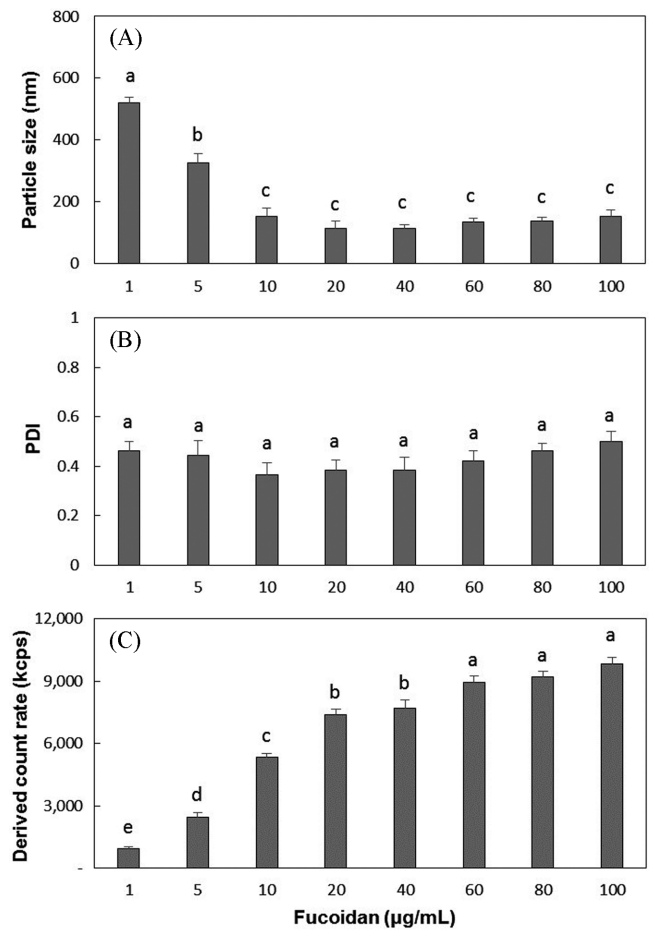


Fig. 4. Particle size (A), PDI (B), and derived count rate (C) of CS/Fu NPs prepared with different fucoidan concentration. Values are means±standard deviation of three experiments. Different letters on the bars indicate significant differences ($p < 0.05$).

mL과 20 µg/mL에서 PGA의 농도를 다양하게 하여 CS/Fu/PGA 나노입자를 제조하였다. 그러나 푸코이단 20 µg/mL에서 CS/Fu/PGA 나노입자 제조 시에는 나노입자가 집합(aggregation) 되는 현상이 관측되었다. 따라서 푸코이단 농도는 집합현상이 나타나지 않는 10 µg/mL로 고정한 후, PGA 농도 변화(1-500 µg/mL)에 따른 입자의 물리적 특성을 관측하였다(Fig. 5). PGA 농도가 증가됨에 따라 입자 크기와 PDI는 비교적 유사한 경향을 나타냈는데, PGA 농도 50 µg/mL까지 유의적 차이 없이 유지되다가 그 이상 농도가 증가됨에 따라서는 유의적으로 증가되는 경향을 나타내었다. 반면, derived count rate는 PGA 농도 10 µg/mL까지 유의적 차이 없이 유지되다가 그 이상의 농도에서는 유의적으로 뚜렷이 감소되는 경향을 나타냈다. 따라서 입자크기와 입자분포도 및 입자형성의 효율을 고려해봤을 때, PGA 농도 10 µg/mL 이하의 농도에서 나노캡슐이 제조되었을 때, 약 100 nm 정도의 작은 크기의 나노캡슐이 비교적 균일한 분포를 보이며 효율적으로 형성되었다고 판단된다.

푸코이단과 PGA 농도에 따른 혈액응고 활성

푸코이단과 PGA 농도변화에 따른 CS/Fu과 CS/Fu/PGA 나노입자의 혈액응고 활성을 관측한 결과(Fig. 6), 푸코이단과 PGA 농도가 증가됨에 따라 PT에는 유의적인 영향을 미치지 않았다. 반

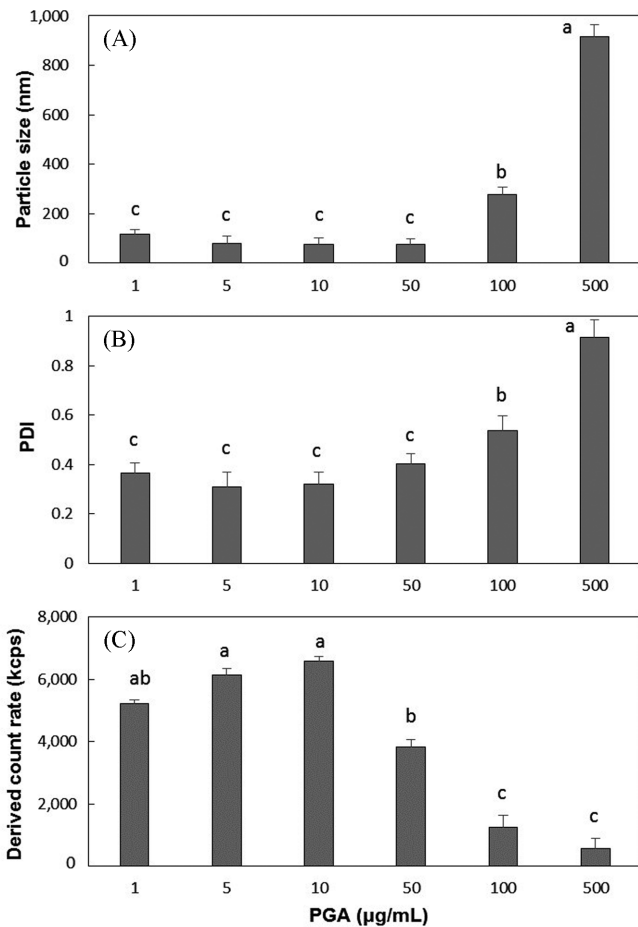


Fig. 5. Particle size (A), PDI (B), and derived count rate (C) of CS/Fu/PGA NPs prepared with different PGA concentration. Values are means±standard deviation of three experiments. Different letters on the bars indicate significant differences ($p<0.05$).

면 APTT의 경우는, 푸코이단과 PGA 농도가 증가됨 따라 CS/Fu와 CS/Fu/PGA 나노입자 모두 유의적으로 증가하는 경향을 나타냈다. 따라서 나노입자 소재 중 푸코이단과 PGA 모두 혈액응고의 외인성 경로에는 영향을 미치지 않으나, 내인성 경로를 통한 혈전 생성 시간을 지연시킨다는 것을 알 수 있었다. 이를 통해 CS/Fu와 CS/Fu/PGA 나노입자는 내인성 경로를 통한 혈전 생성을 예방할 수 있을 것이라 생각되며, 특히 혈행개선 활성성분을 포함할 수 있는 나노전달체로서 활용가치가 있다고 판단된다.

푸코이단과 PGA 농도에 따른 혈소판 응집능

키토산 농도는 2mg/mL로 고정하고 푸코이단과 PGA의 농도 변화에 따른 CS/Fu과 CS/Fu/PGA 나노입자의 혈소판 응집능을 측정하였다. 두 종류의 나노캡슐 모두 푸코이단과 PGA 농도 변화에 따른 혈소판 응집능에 유의적 차이를 나타내지 않았다(data not shown). 이러한 결과는 푸코이단과 PGA 모두 혈소판 응집저해능을 가진다고 보고되었기 때문에 키토산에 의한 혈소판 응집능을 다소 상쇄시킬 수 있을 것이라는 예상과는 다른 결과였다. 이는 본 연구에서는 나노입자의 물리적 특성을 고려하여 결정된 푸코이단과 PGA의 농도가 각각 최대 20 µg/mL과 10 µg/mL로, 매우 낮은 농도에서 나노캡슐이 제조되었기 때문에 푸코이단과 PGA에 의한 혈소판 응집능의 발현이 어려웠던 것으로 추정

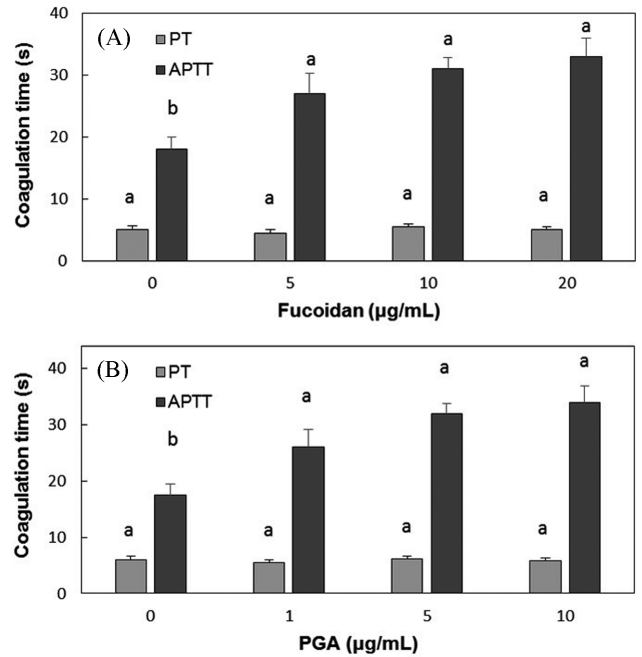


Fig. 6. Coagulation time (APTT and PT) of CS/Fu (A) and CS/Fu/PGA NPs (B) prepared with different fucoidan and PGA concentration. Values are means±standard deviation of three experiments. Different letters on the bars indicate significant differences ($p<0.05$). Chitosan concentration of CS/Fu and CS/Fu/PGA NPs was 2 mg/mL.

된다. 그러나 본 연구를 통해서 혈소판 응집능이 있기 때문에 혈행개선을 위한 나노전달체로서 활용되지 못했던 키토산을 이용하여, 대조군의 혈소판 응집능과 유의적 차이가 나지 않는 범위에서 나노캡슐의 제조가 가능한 키토산 조건을 결정하였으며 내인성 혈액응고 시간을 지연시키는 혈행개선을 위한 나노캡슐을 제조하였다는 점에서 의미가 있다고 판단된다. 또한 CS/Fu과 CS/Fu/PGA 나노입자는 각각 약 200 nm와 100 nm의 작고 균일한 입자분포를 나타내어 향후 혈행개선을 위한 다양한 활성성분을 포함할 수 있는 나노전달체로서 활용가치가 높을 것으로 예측된다.

요 약

혈행개선을 위한 나노전달시스템을 제조하기 위하여, 천연 양전하성 다당류인 키토산과 혈행개선 소재로 알려져 있는 푸코이단과 PGA를 이용하여 CS/Fu 및 CS/Fu/PGA 두 종류의 나노캡슐을 제조하였다. 기본 피복물질인 키토산의 농도가 증가됨에 따라 나노캡슐의 APTT의 증가로 내인성 혈액응고 활성은 증진되었으나 혈소판 응집능 또한 증가되는 경향을 나타냈다. 따라서 키토산 농도는 대조군과 혈소판 응집능이 유의적으로 차이가 나지 않으며 나노입자 제조가 가능한 최소 농도인 2 mg/mL로 고정하였다. 그 결과 CS/Fu 나노입자의 경우 푸코이단의 농도가 5-20 µg/mL일 때 약 200 nm 크기의 입자가 균일하게 생성되었고, CS/Fu/PGA 나노입자의 경우 PGA의 농도 1-10 µg/mL에서 약 100 nm 크기의 입자가 균일하게 생성되었다. 푸코이단과 PGA 농도 증가에 따라서 나노캡슐의 내인성 혈액응고 활성은 증가되었으나, 혈소판 응집능에는 유의적 차이를 나타내지 않았다. 즉, CS/Fu과 CS/Fu/PGA 나노입자는 각각 약 200 nm와 100 nm의 작고 균일한 입자분포를 가지고 있으며, 내인성 혈액응고 활성을 나타

내고 혈소판 응집능에 영향을 미치지 않기 때문에 향후 다양한 특성의 혈행개선 활성성분을 포집할 수 있는 나노전달체로써 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2014년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(2014M3A7B4051898).

References

- Kim YD, Bae ON, Chung SM, Chung JH. Improvement of haemostasis mediated by anti-platelet activities by plant vinegar. *J. Toxicol. Public Health* 20: 137-142 (2004)
- Chung HK, Shin MJ, Cha YJ, Lee KH. Effect of onion peel extracts on blood lipid profile and blood coagulation in high fat fed SD rats. *Korean J. Food Nutr.* 24: 442-450 (2011)
- Noh KH, Park CM, Jang JH, Shin JH, Cho MK, Kim JO, Song YS. Effects of nattokinase fibrinol supplementation on fibrinolysis and atherogenesis. *J. Life Sci.* 19: 289-298 (2009)
- Akahane N, Ohba S, Suzuki J, Wakabayashi T, Nakahara T, Yanagi K, Ohsima N. Antithrombotic activity of a symmetrical triglyceride with eicosapentaenoic acid and γ -linolenic acid in guinea pig mesenteric microvasculature. *Thromb. Res.* 78: 441-450 (1995)
- Akiba S, Kawauchi T, Oka T, Hashizume T, Sato T. Inhibitory effect of the leaf extract of *Ginkgo biloba* L. on oxidative stress-induced platelet aggregation. *Biochem. Mol. Biol. Life Sci.* 46: 1243-1248 (1998)
- Choi IS, Jin BH. Effects of sardine oil on plasma lipids, fatty acid composition of erythrocyte membrane phospholipids and lipid peroxide levels of plasma and liver in rats. *Korean J. Nutr.* 20: 330-340 (1987)
- Lee HA, Yoo IJ, Lee BH. Research and development trends on omega-3 fatty acid fortified foodstuffs. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 26: 161-174 (1997)
- Yu JY, Jin YR, Lee JJ, Chung JH, Noh JY, You SH, Kim KN, Im JH, Lee JH, Seo JM, Han HJ, Lim Y, Park ES, Kim TJ, Shin KS, Wee JJ, Park JD, Yun YP. Antiplatelet and antithrombotic activities of Korean red ginseng. *Arch. Pharm. Res.* 29: 898-903 (2006)
- Tan CP, Nakajima M. β -Carotene nanodispersions: Preparation, characterization and stability evaluation. *Food Chem.* 92: 661-671 (2005)
- Leuner C, Dressman J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50: 47-60 (2000)
- Cho, YH, Shin, DS, Park J. A study on wall materials for flavor encapsulation. *Korean J. Food Sci. Tech.* 31: 1563-1569 (1999)
- Mozafari MR, Khosravi-Darani K, Borazan GG, Cui J, Pardakhty A, Yurdugul S. Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. *Int. J. Food Prop.* 11: 833-844 (2008)
- Fathi M, Mozafari MR, Mohebbi M. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends Food Sci. Tech.* 23: 13-27 (2012)
- Nedovic V, Kalusevic A, Manojlovic V, Levic S, Bugarski B. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Sci.* 1: 1806-1815 (2011)
- Mauludin R, Müller RH, Keck CM. Kinetic solubility and dissolution velocity of rutin nanocrystals. *Eur. J. Pharm. Sci.* 36: 502-510 (2009)
- Rashidi L, Khosravi-Darani K. The applications of nanotechnology in food industry. *Crit. Rev. Food Sci.* 51: 723-730 (2011)
- Gibbs BF, Kermasha S, Alli I, Mulligan CN. Encapsulation in the food industry: A review. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 50: 213-224 (1999)
- Liu Z, Jiao Y, Wang Y, Zhou C, Zhang Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Adv. Drug Delivery Rev.* 60: 1650-1662 (2008)
- Sinha VR, Singla AK, Wadhawan S, Kaushik R, Kumria R, Bansal K, Dhawan S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *Int. J. Pharm.* 274: 1-33 (2004)
- Yoksan R, Jirawutthiwongchai J, Arpo K. Encapsulation of ascorbyl palmitate in chitosan nanoparticles by oil-in-water emulsion and ionic gelation processes. *Colloid. Surface. B.* 76: 292-297 (2010)
- Kim DG, Jeong YI, Choi C, Roh SH, Kang SK, Jang MK, Nah JW. Retinol-encapsulated low molecular water-soluble chitosan nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 319: 130-138 (2006)
- Sajomsang W, Gonil P, Ruktanonchai UR, Petchsangsa M, Opanasopit P, Puttipipatkachorn S. Effects of molecular weight and pyridinium moiety on water-soluble chitosan derivatives for mediated gene delivery. *Carbohydr. Polym.* 91: 508-517 (2013)
- Chou TC, Fu E, Wu CJ, Yeh JH. Chitosan enhances platelet adhesion and aggregation. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 302: 480-483 (2003)
- Periyah MH, Halim AS, Hussein AR, Saad AZM, Rashid AHA, Noorsal K. *In vitro* capacity of different grades of chitosan derivatives to induce platelet adhesion and aggregation. *Int. J. Biol. Macromol.* 52: 244-249 (2013)
- Stoltz JF, Nicolas A. Analytical study of ionized or ionizable groups of platelet membrane. *Blut.* 38: 103-117 (1979)
- Hajdu I, Bodnár M, Filipcsei G, Hartmann JF, Daróczy L, Zrínyi M, Borbély J. Nanoparticles prepared by self-assembly of chitosan and poly- γ -glutamic acid. *Colloid Polym. Sci.* 286: 343-350 (2008)
- Sonaje K, Chen YJ, Chen HL, Wey SP, Juang JH, Nguyen HN, Hsu CW, Lin KJ, Sung HW. Enteric-coated capsules filled with freeze-dried chitosan/poly (γ -glutamic acid) nanoparticles for oral insulin delivery. *Biomaterials* 31: 3384-3394 (2010)
- Tang DW, Yu SH, Ho YC, Mi FL, Kuo PL, Sung HW. Heparinized chitosan/poly (γ -glutamic acid) nanoparticles for multi-functional delivery of fibroblast growth factor and heparin. *Biomaterials* 31: 9320-9332 (2010)
- Bilan MI, Grachev AA, Ustuzhanina NE, Shashkov AS, Nifantiev NE, Usov AI. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C. Ag. *Carbohydr. Res.* 337: 719-730 (2002)
- Li B, Lu F, Wei X, Zhao R. Fucoidan: Structure and bioactivity. *Molecules* 13: 1671-1695 (2008)
- Cumashi A, Ushakova NA, Preobrazhenskaya ME, D'Incecco A, Piccoli A, Totani L, Tinari N, Morozevich GE, Berman AE, Bilan MI, Usov AI, Ustuzhanina NE, Grachev AA, Sanderson CJ, Kelly M, Rabinovich GA, Iacobelli S, Nifantiev NE. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology* 17: 541-552 (2007)
- Nishino T, Yokoyama G, Dobashi K, Fujihara M, Nagumo T. Isolation, purification, and characterization of fucose-containing sulfated polysaccharides from the brown seaweed *Ecklonia kurome* and their blood-anticoagulant activities. *Carbohydr. Res.* 186: 119-129 (1989)
- Janes KA, Fresneau MP, Marazuela A, Fabra A, Alonso MJ. Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. *J. Control. Release* 73: 255-267 (2001)
- Son DJ, Cho MR, Jin YR, Kim SY, Park YH, Lee SH, Akiba S, Sato T, Yun YP. Antiplatelet effect of green tea catechins: A possible mechanism through arachidonic acid pathway. *Prostag. Leukotr. Ess.* 71: 25-31 (2004)
- Li C, Mao X, Xu B. Pulsed electric field extraction enhanced anti-coagulant effect of fungal polysaccharide from Jew's Ear (*Auricularia auricula*). *Phytochem. Analysis* 24: 36-40 (2013)
- Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 145: 1310-1312 (1964)