

나노 구조체를 이용한 산화질소 전달체에 대한 연구 및 바이오메디컬 응용

최윤서* · 정혜중** · 박경태** · 홍진기**†

*연세대학교 언더우드국제대학 융합과학공학부

21983 인천광역시 연수구 송도과학로 85

**연세대학교 공과대학 화공생명공학과

03722 서울특별시 서대문구 연세로 50

(2019년 2월 28일 접수, 2019년 3월 28일 수정본 접수, 2019년 4월 3일 채택)

Nitric Oxide Delivery using Nanostructures and Its Biomedical Applications

Yunseo Choi*, Hyejoong Jeong**, Kyungtae Park** and Jinkee Hong**†

*Bio-Convergence Major Integrated Science and Engineering Division (ISED), Underwood International College, Yonsei University
85, Songdogwahak-ro, Yeonsu-gu, Incheon, 21983, Republic of Korea

**Department of Chemical and Biomolecular Engineering, College of Engineering, Yonsei University,
50, Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul, 03722, Republic of Korea

(Received 28 February 2019; Received in revised form 28 March 2019; accepted 3 April 2019)

요 약

산화질소(NO)가 혈관 확장, 혈소판 응집 억제, 면역 반응 조절, 상처 치료, 항암 등의 주요 병리 생리학적 프로세스에 관여한다는 사실이 밝혀지면서 최근 산화질소 전달에 대한 국내외 연구진들의 관심이 높아지고 있다. 그러나 인체에 이상적으로 적용될 수 있는 산화질소 전달체의 개발은 산화질소의 높은 반응성과 짧은 반감기로 인하여 여전히 난제로 남아 있다. 본 논문에서는 다양한 산화질소 전달체 중에서도 최근 바이오메디컬 분야에서 연구가 활발히 이루어지고 있는 나노 구조체를 이용한 전달체의 연구 결과 및 응용 방향에 대해서 소개하고자 한다. 나노 크기의 구조체가 다른 전달체와 비교하여 가지는 장점은 표면 대 부피 비율이 높아 산화질소를 효율적으로 탑재할 수 있고, 표면 개조 능력이 뛰어나 산화질소의 방출 양상을 효과적으로 제어할 수 있다는 것이다. 특히 이 글에서는 다양한 나노 구조체 중에서도 나노입자 형태, 마이크로에멀전 형태, 그리고 다층필름 형태의 나노 구조체에 대해서 다룸으로써 각 구조체의 산화질소 방출 양상을 비교하고 그 특징에 대해서 자세히 알아보하고자 한다. 이와 같은 나노 구조체의 개발은 산화질소의 급격한 방출을 방지하고 지효성을 띠게 함으로써 타겟 부위에서의 효과를 높일 수 있을 것으로 기대되며, 더 나아가 차후 다양한 바이오메디컬 분야에서 유망한 치료 기제로서 적용될 수 있을 것으로 보인다.

Abstract – The discovery of nitric oxide (NO) as a major signaling molecule in a number of pathophysiological processes – vasodilation, immune response, platelet aggregation, wound repair, and cancer biology – has led to the development of various exogenous NO delivery systems. However, the development of ideal delivery system for human body application is still left as a challenge due to its high reactivity and short half-life in physiological condition. In this article, an overview of several nano-structures as potential NO delivery system will be presented, along with their recent research results and biomedical applications. Nano-size delivery system has immense advantages compared to others due to its high surface-to-volume ratio and capability for surface modification; thus, it has been proven to be effective in delivering nitric oxide with enhanced performance. Through this novel nano-structure delivery system, we are expecting to achieve sustained release of nitric oxide within adequate range of concentration, which ensures desired drug effects at the target site. Among different nano-structures, in particular, nanoparticle, microemulsion and nanofilm will be reviewed and compared to each other in respect of nitric oxide release profile. The proposed nano-structures for exogenous NO delivery have a biological significance in that it can be further utilized in diverse biomedical fields as a highly promising therapeutic method.

Key words: Nano structure, Nitric oxide, Release profile, Biomedical

† To whom correspondence should be addressed.

E-mail: Jinkee.hong@yonsei.ac.kr

‡ 이 논문은 연세대학교 설용건 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서 론

산화질소(Nitric Oxide, NO)가 주요 생리학 및 병리학적 프로세스에 관여한다는 사실이 밝혀지면서 최근 산화질소를 이용한 치료법에 대해 많은 연구가 이루어지고 있다. 산화질소가 관여하는 프로세스에는 혈관 확장[1], 혈소판 응집 억제[1], 면역 반응 조절[2], 상처 치료[3], 항암[4] 등에 이르기까지 매우 다양한데, 이러한 생리학 특성으로 인해 향후 산화질소의 응용 및 기대효과에 대한 관심이 더욱 커질 것으로 예상된다. 산화질소의 작용 원리 및 전달 시스템에 대한 많은 연구가 이루어졌음에도 불구하고, 인체에 적용하여 성공적으로 산화질소를 전달할 수 있는 전달체의 개발은 여전히 난제로 남아있다. 그 이유는 산화질소가 농도에 따라 다른 생리학적 변화를 일으키는 특성을 가지는데, 현재까지 개발된 전달체들은 산화질소의 짧은 반감기와 조절이 어려운 방출 특성으로 인해 체내에서 동일한 농도에 의한 지속적인 효과를 나타내기 어려웠기 때문이다. 따라서 지효성을 갖는 산화질소 전달 시스템을 개발하는 것이 중요하지만 전달체에 산화질소를 탑재하고 방출량 및 방출 양상을 조절하는 것은 여전히 도전적인 과제이다[5]. 따라서 산화질소의 제한적인 탑재량과 급속한 방출 양상으로 인한 임상 적용에서의 한계점을 해결하기 위하여 산화질소를 효과적으로 전달하고 방출할 수 있는 전달체에 대한 연구가 국내외에서 활발하게 이루어지고 있다.

전달체 중에서도 특히 '나노' 크기의 구조체가 가지는 장점은 부피에 비해 큰 표면적을 가져 구조체 내부에 산화질소를 효율적으로 탑재할 수 있고, 다양한 투여 경로를 통해 나노 사이즈의 구조체를 원하는 부위에 도달시킬 수 있으며, 세포 내부로의 전달도 가능하다는 것이다. 또한, 높은 표면적 대 부피 비율(surface-to-volume ratio)로 인해 표면의 성질이 주요하게 작용하기 때문에 표면의 구성 및 특성을 조절함으로써 산화질소의 방출 양상을 효율적으로 제어할 수 있다.

이러한 나노 구조체를 형성함에 있어서 가장 주요한 과제는 산화질소의 급격한 방출을 방지하고 지효성을 띠게 함으로써 세포 독성은 최소화하고 목표로 하는 부위의 약물 효과는 극대화하는 것이다. 지금까지 연구된 산화질소 전달체에는 실리카 기반 나노 입자(silica-based nanoparticles)[6], 리포솜(liposome)[7], 고분자[8], 에멀전(emulsion), 나노 다층 필름(nano-multilayer film) 등이 있고, 뿐만 아니라 산화질소 기체를 생성할 수 있는 NO donor에 대한 연구도 지속적으로 이루어지고 있다. 다양한 종류의 NO donor 중에서도 특히 체내 환경에서 자발적으로 산화질소를 방출할 수 있는 *N*-diazeniumdiolate (NONOate)에 대한 연구가 많이 이루어지고 있는데, 그 이유는 NONOate가 양성자와 반응하여 자발적으로 산화질소를 방출하는 메커니즘을 가지고 있으며 고압반응을 통해 amine을 포함하는 모든 물질에 합성이 가능하기 때문이다[9].

이처럼 산화질소 전달 시스템에 대한 연구가 세계적인 주목을 받는 이유는 산화질소 기체의 방출 양상을 조절함으로써 다양한 생체 프로세스에 대한 제어가 가능해지기 때문이다. 따라서 도입하고자 하는 전달체의 구조와 특성을 정확히 파악하고 제어할 수 있게 된다면 우리가 원하는 이상적인 산화질소 전달 시스템을 개발할 수 있게 된다. 본 논문에서는 다양한 산화질소 전달체 중에서도 최근 바이오메디컬 분야에서 연구가 활발히 이루어지고 있는 입자 형태와 다층 필름 형태의 나노 구조체에 대하여 소개하고자 한다.

2. 본 론

본 논문에서 소개할 산화질소 전달체의 종류에는 나노 입자 형태의 BPEI-NO-NP, 마이크로에멀전 형태의 PFC ME, 그리고 나노 필름 형태의 BPEI/ALG와 PLL/PGA가 있다. 각 나노 구조체의 반감기와 총 방출량을 비교한 그래프를 통해 나노 구조체의 종류에 따라서 그 특성과 장단점이 상이하다는 것을 알 수 있고(Fig. 1), 그 특성을 적합한 응용분야에 적용시킴으로써 원하는 효과를 얻을 수 있다. 따라서 본문에서는 각 나노 구조체에 관한 연구 내용을 통해 다양한 바이오메디컬 분야로의 응용 방향을 제시하고자 한다.

2-1. 입자 형태 나노 구조체

산화질소의 체내 약물 대사 및 분포 양상을 조절하기 위한 가장 주된 방법 중 하나는 산화질소 전달체를 나노 입자 형태로 만드는 것이다. Friedman과 그 연구진은 산화질소 전달 시스템에서 가장 중요하게 다루어져야 할 특징으로 약물 효과가 유효할 정도의 지속성을 꼽았고, 그에 적합한 전달체로 나노 입자를 선정하였다[10]. 약물 전달 용도로서의 나노 입자는 1 μm 이하의 콜로이드 입자로 정의되며, 생체적합성, 높은 안정성, 높은 수용량 등 약물 전달체로서 많은 이점을 가지고 있다[11]. 그 중에서도 가장 큰 이점은 입자의 크기 조절을 통해 경구 투여, 혈관 투여, 국소적 도포 등의 다양한 경로로 산화질소를 투여할 수 있다는 것이고[10], 나노 입자의 구성 및 구조를 조절함으로써 산화질소의 지속적인 방출을 유도할 수 있다는 것 또한 중요한 이점 중 하나이다.

다양한 나노 입자 중에서도 실리카 기반 나노 구조체에 대한 연구가 바이오메디컬 분야에서 활발하게 진행되고 있다. 그 이유는 실리카 기반 나노 입자의 합성과정이 간단하고, 나노 입자의 크기, 구성, 형태 등을 원하는 대로 조절할 수 있으며, 안정적이고 독성을 띠지 않아 약물 전달체로서 적합한 성질을 가지고 있기 때문이다[12-15]. 따라서 이러한 특성들을 알맞게 활용한다면 실리카 기반 나노 구조체를 이용하여 우리가 원하는 산화질소 전달 시스템도 개발할 수 있다. 예를 들어, 실리카 나노 입자의 표면을 branched polyethylene imine (BPEI)로 코팅하여 산화질소 기체의 확산을 조절하는 시스템을 개발한 연구 사례가 있다[16].

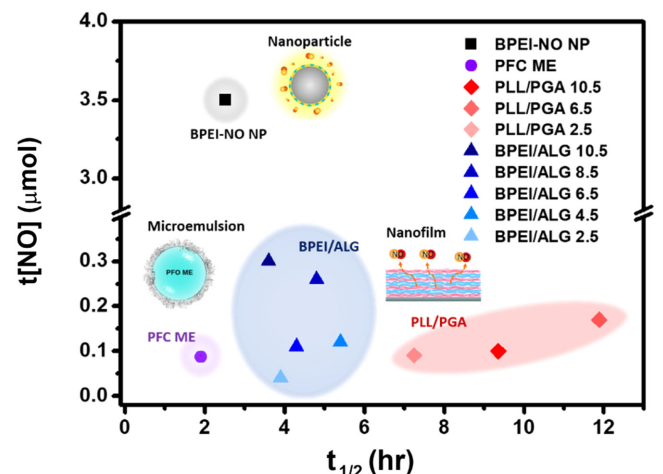


Fig. 1. Nitric oxide release profile ($t[NO]$) and half-life ($t_{1/2}$) in different types of nanostructure delivery systems.

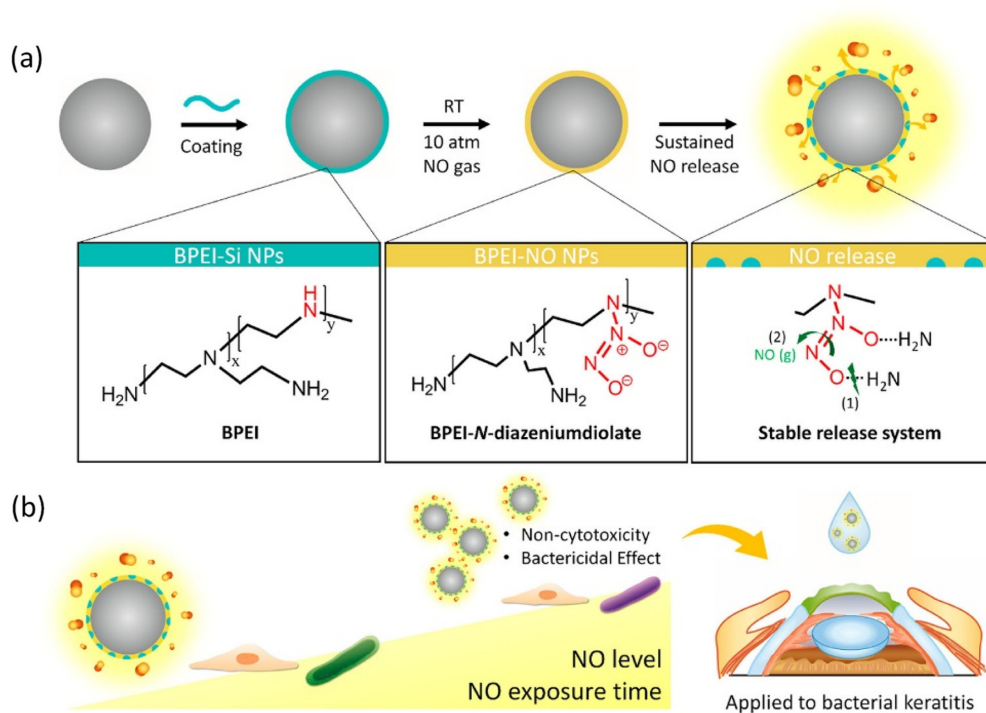


Fig. 2. (a) Synthetic process and nitric oxide release mechanism of BPEI-NO NP, and (b) the effect of BPEI-NO NP with sustained nitric oxide release as a treatment for bacterial keratitis.

이 연구는 Fig. 2(a)에서 볼 수 있는 바와 같이 실리카 나노 입자의 표면에 BPEI라는 고분자 물질을 코팅함으로써 산화질소의 방출 양상을 조절하고자 하였다. 실리카 나노 입자의 표면 코팅 물질로 BPEI가 사용된 이유는 BPEI가 많은 아민(amine)을 포함하고 있어 NONOate를 생성하기에 적합할 뿐만 아니라, 주변 아민(amine)과의 상호작용을 통해 NONOate를 안정화하는 역할도 수행할 수 있기 때문이다. 그리고 이러한 NO donor의 안정화 과정을 통해 산화질소 기체의 방출이 지속적으로 유지될 수 있다는 이점이 있다[16]. BPEI의 또 다른 이점은 수용액 내에서의 정전기적 인력을 통해 실리카 나노 입자 표면에 자동적으로 코팅될 수 있다는 것인데, 이러한 자가 조립 과정을 통해 BPEI-NO NP의 합성 과정을 단순화시킬 수 있다[17-20]. 합성된 BPEI-NO NP는 체내 환경에서 양성자와 반응하여 산화질소 기체를 방출하게 되고, 그 지속적인 방출 양상을 화학 발광 분석기를 통해 확인할 수 있다(Fig. 3a).

산화질소 기체의 지속적인 방출로 인한 효과에는 두 가지가 있다. 먼저, 산화질소 기체의 살균 효과를 통해 상처를 빠르고 효과적으로 치료할 수 있다. 산화질소는 일반적으로 항균 효과가 뛰어난 물

질로 널리 알려져 있는데, 항균 효과가 나타나는 메커니즘은 바로 산화적 스트레스(oxidative stress)를 통해서이다. 세포 내의 산화질소 농도가 높아지면 산화질소가 활성산화질소 상태로 변하게 되고, ONOO-와 같은 과산화물질이 세포막을 파괴함으로써 세균이 사멸된다.

두 번째 효과는 산화질소의 농도를 조절함으로써 세포 생존율을 높이는 것이다. 높은 농도의 산화질소가 방출되면 세포 독성이 나타나 체내에서 조직 손상이 일어날 수 있기 때문에 산화질소의 방출량을 일정하게 조절하여 세포에 미치는 영향을 최소화하는 것이 중요하다. Fig. 3(b)의 세포 생존율을 보면 산화질소 전달체가 도달한 이후에도 세포가 체내 환경에서의 생존율과 비슷한 정도를 보이는 것을 확인할 수 있다. 이는 BPEI-NO NP가 산화질소의 방출을 지속적으로 조절하여 같은 농도의 산화질소가 도달하였을 때 세균은 사멸하는 반면 세포는 증식될 수 있도록 하였기 때문이다. 따라서 이 연구는 항균 효과와 세포의 생존율을 높이는 두 가지 효과를 동시에 가지기 때문에 상처 치료에 효과적으로 적용될 수 있고, 결국 결막염 치료에도 뛰어난 효과를 보일 수 있다(Fig. 2b).

이전에도 NONOate가 탑재된 나노 입자에 대한 연구가 많이 이루어졌었지만, 이 연구는 BPEI라는 고분자 물질을 이용하여 NONOate와의 분자 작용을 통해 나노 입자 표면에서 안정화가 일어나도록 했다는 점에서 그 차별성을 찾아볼 수 있다. NONOate가 안정화됨에 따라 산화질소 방출 양상도 지속적으로 변할 수 있었고 세균성 각막염 치료에 있어서 뛰어난 항균 효과를 보였다. 뿐만 아니라 나노 입자 표면의 자가 조립 과정을 통해 산화질소 전달체의 합성과정을 단순화시켰다는 점 또한 이 연구결과에 주목해야 할 이유 중 하나이다.

다음으로 설명하고자 하는 것은 에멀전(emulsion) 형태의 나노 입자를 이용한 산화질소 전달 시스템이다. 국내 연구진이 개발한

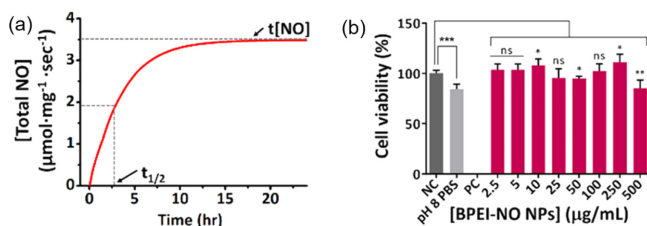


Fig. 3. (a) Nitric oxide release profile of BPEI-NO NP, and (b) the quantitative results of cell viability for 24 h. BPEI-NO-NP: BPEI-coated NO-releasing silica nanoparticle, PC: positive control, NC: negative control.

Perfluorocarbon(PFC) 마이크로 에멀전(ME) 전달체는 많은 양의 산화질소 기체를 수용할 수 있고, 높은 생체 적합성을 가지는 동시에 산화질소의 방출량을 조절하여 뛰어난 항균효과를 보이는 것을 확인하였다[21]. PFC가 기체 전달체로서 적합한 이유는 강한 탄소-플루오린 결합을 바탕으로 높은 안정성을 보이며, PFC 간의 반데르발스 상호작용이 기체의 용해성을 높여 많은 양의 기체를 수용할 수 있기 때문이다[22]. 이러한 성질들로 인하여 PFC 액체는 혈액을 대신해서 산소 기체를 전달할 수 있는 물질로 많은 주목을 받았지만[23], 산화질소 기체 전달에 있어서는 아직까지 많은 연구가 이루어지지 않았다.

이 연구에서는 소수성을 띠는 PFC를 에멀전 또는 입자 형태로 만들어 물속에서도 확산이 일어날 수 있도록 함으로써 다양한 바이오메디컬 분야에의 적용이 가능하게 하였다. PFC를 에멀전 형태로 만드는 것은 산화질소 기체를 방출하는데 있어서도 중요한 역할을 수행한다. 산화질소는 반응성이 매우 높기 때문에 다른 활성산소와 만나면 질소산화물을 생성하는 불안정한 양상을 보인다[24]. 따라서

산화질소는 다른 반응성 물질에 노출이 최소화될수록 안정적으로 유지될 수 있는데[25], 문제는 PFC가 산화질소 뿐만 아니라 다른 기체에도 높은 용해성을 가져 산화질소가 다른 기체와 접촉하게 될 가능성이 높다는 것이다.

그러므로 PFC를 이용하여 산화질소 기체를 안정적으로 전달하기 위해서는 산화질소와 다른 기체의 접촉을 최소화해야 하는데, Fig. 5(a)에서 보는 바와 같이 에멀전의 경계면이 그 접촉을 방지하는 역할을 수행한다. PFC와 물에서의 산화질소 용해도가 각각 다르기 때문에 산화질소가 방출되는 속도를 늦출 수 있고, 따라서 Fig. 4에서와 같이 산화질소 농도가 지속적으로 유지되는 방출 양상을 확인할 수 있다.

이렇게 방출된 산화질소는 활성산소 생성물과 반응하여 항균 물질들을 생성하거나[26], 산화질소 자체가 OONO-, RSNO, NO₂ 등으로 바뀌어 세균의 DNA를 손상시키는 역할을 한다. 산화질소가 PFC로부터 빠져나와 세균의 세포질에 도달하는 과정은 헨리의 법칙에 따른 부분압력에 의해서 결정된다[21]. 높은 압력의 PFC 입자에서 낮은 압력의 외부로 산화질소가 빠져나오게 되면, 시간이 지남에 따라 외부에 산화질소가 축적되고 이후 외부의 압력과 농도가 높아짐에 따라 산화질소가 세균 내로 침투할 수 있게 된다[21].

PFO ME (Perfluorooctane Microemulsion)은 10분간의 초음파처리 과정을 통해서 매우 간단하게 합성될 수 있기 때문에 복잡한 화학 처리 과정이 요구되고 시간이 많이 소요되는 다른 산화질소 전달체 합성과정과 비교하여 큰 이점을 가진다. 또한, PFO ME에는 많은 양의 산화질소가 별다른 화학 반응을 거치지 않고서도 탑재될 수 있으며, 이렇게 탑재된 산화질소는 12시간 동안 방출을 유지하는 높은 지효성을 띤다. 인체 피부 세포(HDF)를 통해 세포 생존율을 확인하였을 때도 3일여 간 독성을 보이지 않는 것을 확인할 수 있었고(Fig. 5b), 높은 농도의 산화질소가 *S. aureus*에 강한 항균 효과를 보이는 것을 확인하여 항균을 위한 용도로 사용하기에 적합하다는 사실을 알 수 있었다(Fig. 5c).

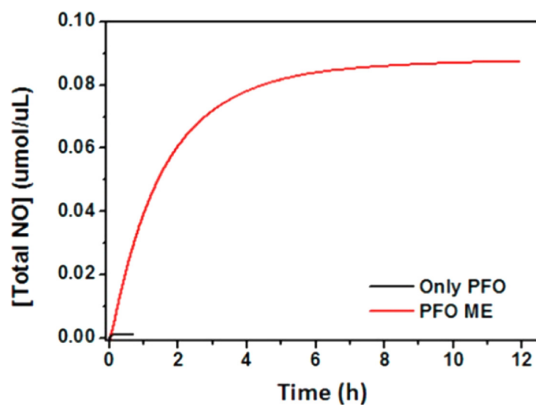


Fig. 4. Nitric oxide release profile of PFO. PFO ME: Perfluorocarbon Microemulsion.

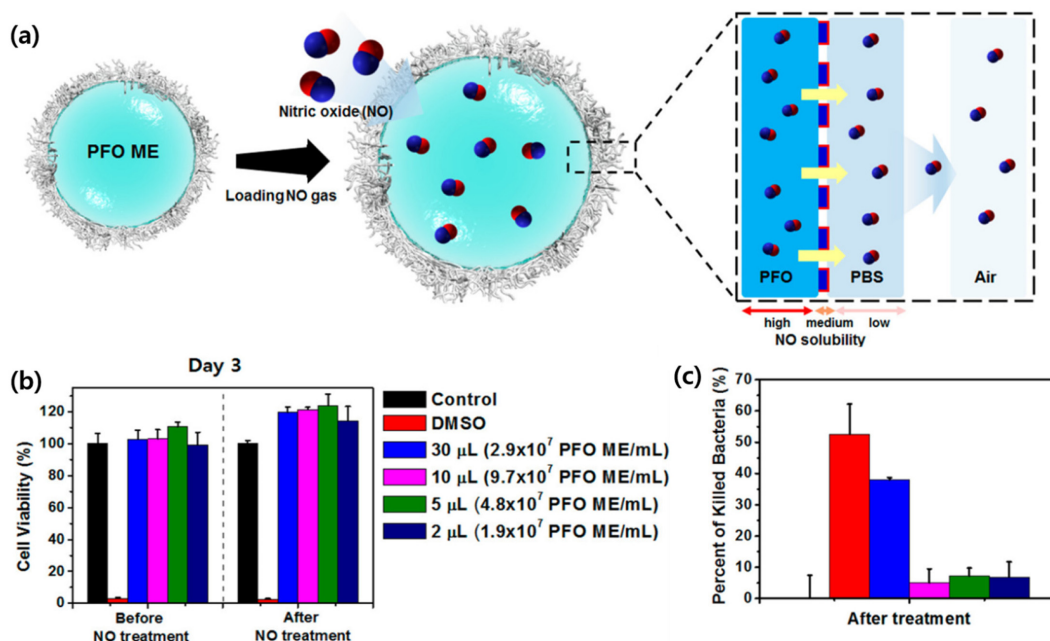


Fig. 5. Schematic illustration of PFO ME after nitric oxide gas loaded and the release mechanism of nitric oxide, (b) Cell viability change after 3 days of nitric oxide treatment, (c) Anti-bacterial effect for *S. aureus* of NO-loaded PFO ME.

이처럼 PFO ME가 생체적합성을 가진과 동시에 합성과정이 간단하고, 높은 수용량을 보이며, 지속적인 방출이 가능하다는 사실을 고려하면, 앞으로 PFC를 이용한 전달체가 산화질소를 전달하는 목적 이외에도 다양한 바이오메디컬 및 바이오 분석 분야에서 많은 주목을 받을 것으로 예상된다.

2-2. 필름 형태 나노 구조체

입자 형태의 산화질소 전달체가 산화질소를 효과적으로 방출할 수 있다는 이점이 있지만, 높은 표면적으로 인하여 빠른 속도의 방출이 일어날 수 있다는 한계점이 존재한다. 이와 달리 고분자 scaffold를 이용한 필름 형태의 나노 구조체는 표면적이 상대적으로 작고, 필름 위의 구조와 구성을 별다른 제한없이 조절할 수 있어 산화질소의 방출 양상을 비교적 세밀하게 조절할 수 있다. 뿐만 아니라 필름 형태의 전달체는 표면에 어떤 것이든 손쉽게 적용시킬 수 있기 때문에 원하는 성질을 갖는 전달체를 제작할 수 있다는 이점이 있다.

나노 필름을 다층으로 제조하기 위해서 Layer-by-Layer (LbL) assembly라고 불리는 층과층 적층법 기술이 사용되는데, 이는 서로 다른 고분자 전해질 물질을 정전기적 인력을 통해 층층이 쌓아 올리는 것이다[27]. 고분자 전해질 물질이 주로 사용되기는 하지만, 분자 간 상호작용이 일어나는 모든 물질에도 적용이 가능하기 때문에 최근에는 산화 그래핀(graphene oxide)[28], 약물[29], 나노 입자(nanoparticle)[30], 단백질[31,32], DNA[33] 등이 이용되는 경우도 있다. 또한, 나노 필름의 표면에 코팅하는 기질의 크기, 구성, 재료 등을 원하는 대로 조절할 수 있기 때문에 앞으로 바이오메디컬 분야에서의 폭 넓은 응용이 가능할 것으로 보인다.

따라서 LbL 적층법을 이용하여 생체에 적합한 성질을 갖는 나노 필름을 제조한다면 산화질소의 방출 양상을 조절할 수 있는 산화질소 전달 시스템도 개발할 수 있다. 이렇게 개발된 나노 필름 산화질소 전달체는 스텐트에 코팅되어 restenosis를 방지하거나, 콘택트렌즈에 부착시켜 각막염을 치료하거나, 또는 상처 드레싱 패드에 부착하여 상처를 치료하는 용도 등 다양한 의료 분야에 적용될 수 있다[34] (Fig. 6).

나노 필름은 그 두께 또는 환경(pH, 온도 등)에 따라서 성질이 달라지기 때문에 산화질소를 전달하기에 적합한 특성을 갖는 조건을 찾는 것이 중요하다. 예를 들어, 나노 필름의 구조에 따라서 달라지는

산화질소 방출 양상에 대해 알아보기 위해 고분자 전해질 물질의 pH 환경을 조절하여 비교한 연구 결과가 있다[34]. 이 연구는 나노 필름의 구조와 산화질소 방출 패턴 사이의 관계를 밝히기 위해 서로 다른 구조를 가진 나노 필름을 만들어 그 특성을 확인하고자 하였다.

나노 필름을 코팅하는 기질로는 branched polyethylene imine (BPEI)와 alginate (ALG)의 두 고분자 전해질 물질이 사용되었다. BPEI는 amine 그룹을 많이 보유하고 있어 산화질소를 생성하는데 적합한 동시에 아미노기(NH_3^+)로 인해 양전하를 띠고, ALG는 생체에 적합하면서도 카르복실기(COO^-)로 인해 음전하를 띠기 때문에 나노 필름으로 적층되기에 적합한 성질을 가지고 있다. BPEI와 ALG는 정전기적 상호작용을 통해 나노 필름 위에 코팅되었으며, 두 가지 다른 pH 조건을 사용함으로써 그 구조에 변화를 주었다 [35].

BPEI의 이온화 정도는 pH9로 고정시켜 pKa 값과 동일한 수준으로 유지시킨 반면, ALG의 pH는 pH4와 pH8의 두 가지 조건으로 분리하여 실험을 진행하였다. ALG의 pH 조건을 다르게 한 이유는 ALG에 붙어있는 카르복실기의 이온화 정도에 따라서 분자 간의 상호작용이 달라지기 때문인데, pH8에서는 높은 이온화 정도를 보여 직선 형태의 구조를 띠는 반면, pH4에서는 카르복실기의 protonation이 일어나 코일 형태의 고르지 않은 구조를 가지게 된다[34] (Fig. 7a).

이렇게 두 가지 다른 형태의 나노 필름 구조를 만들고 난 후에는, 산화질소 방출이 어떤 패턴으로 일어나는지 화학 발광 분석기를 통해 확인하였다. Fig. 7(b)와 (c)에서 확인할 수 있듯이(BPEI9/ALG8)_n을 이용한 Film1은 이중층의 개수에 비례하여 산화질소의 농도가 증가하는 추세를 보인 반면, (BPEI9/ALG4)_n을 이용한 Film2의 경우에는 별다른 경향성을 찾아볼 수 없었다. 이처럼 구조에 따라서 산화질소 방출 양상이 다르게 나타나는 이유는 필름 형태에 따라서 NONOate가 생성되는 양이 달라지기 때문이다. Film1은 높은 이온화 수준으로 인해 BPEI와 ALG 간의 안정적인 흡착 작용이 일어나 층과층 사이의 평평한 구조가 유지되기 때문에 필름 표면 및 내부에도 NONOate가 형성될 수 있다. 반면, Film2는 BPEI와 ALG 간의 정전기적 상호작용이 약하게 일어나 NONOate가 내부가 아닌 표면에 제한적으로 생성되고, 이에 따라서 산화질소 방출도 더 빠르게 일어나게 된다.

산화질소 방출에 있어서 11-30시간의 지속기간을 보인 Film1은 상처 드레싱에 효과적으로 적용시킬 수 있을 것으로 보인다. 드레

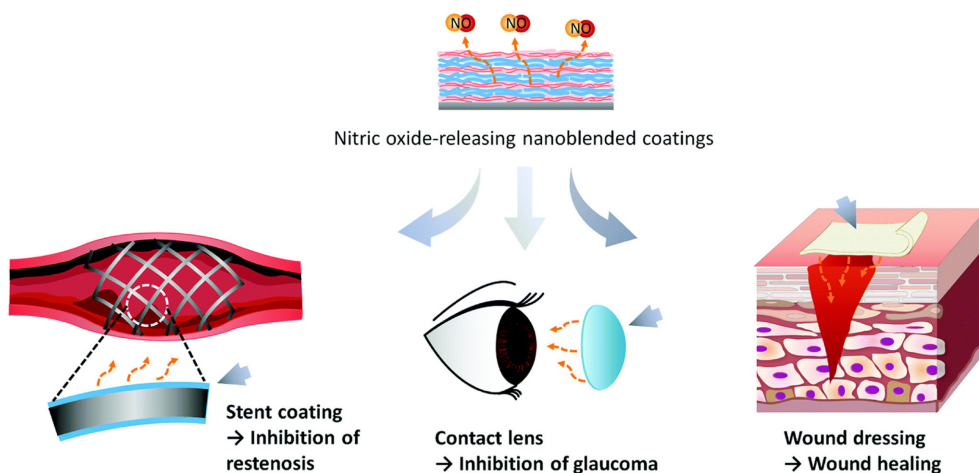


Fig. 6. Biomedical applications of nitric oxide releasing nanofilm.

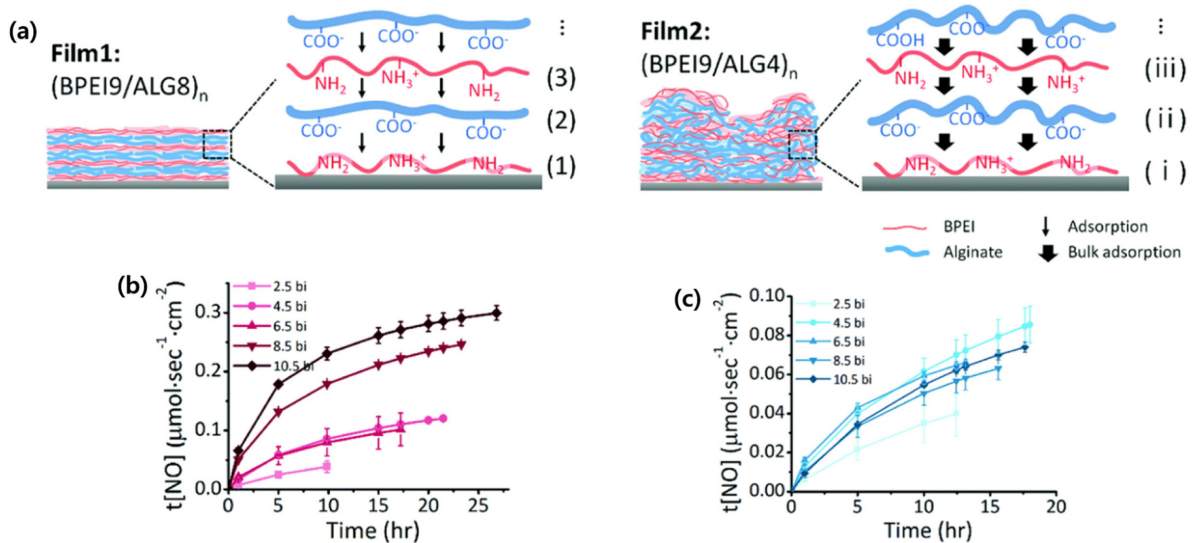


Fig. 7. (a) pH-dependent structural difference of two nanofilms: Film1-(BPEI9/ALG8)_n and Film2-(BPEI/ALG4)_n, (b) Nitric oxide release profile of Film1, (c) Nitric oxide release profile of Film2.

상은 48시간마다 교체할 수 있기 때문에 산화질소의 항균 효과를 이용한다면 드레싱을 부착함과 동시에 상처를 치료하는 두 가지 효과를 얻을 수 있다[36]. 뿐만 아니라 두께에 따라서 산화질소가 방출되는 정도를 조절할 수 있다는 것을 확인했으므로 세포 독성을 보이지 않는 범위 내에서의 치료 또한 가능할 것으로 보인다.

나노 필름의 구조 차이를 이용한 연구 외에도 필름의 두께를 조절하여 산화질소 방출의 지속성을 높인 연구 사례가 있다[37]. 이 연구는 poly-L-lysine(PLL)과 poly-L-glutamic acid(PGA)의 두 가지 고분자 물질을 정전기적 상호작용을 바탕으로 필름 위에 코팅하여 그 두께를 조절하였다[38]. PLL과 PGA를 사용한 이유는 두 고분자 물질이 각각 양전하와 음전하를 띠고 있어 필름 합성에 용이할 뿐만 아니라 생체에 적합하면서도 생체 내에서 분해가 가능하기 때문이다[39]. 필름의 두께는 프로파일로미터(profilometer)로 측정되었고, 표면의 형태는 SEM과 AFM으로 관찰되었다.

이 연구에서는 세 가지 두께의 필름을 형성하였는데, 2.5bi, 6.5bi, 10.5bi가 그것이고, 각각 5.2 nm, 320 nm, 866 nm의 두께를 가진다. (PLL/PGA)_{6.5} 필름의 경우 Fig. 8(b)에서 볼 수 있는 바와 같이 대략 45시간 동안 산화질소가 방출되는 것으로 나타나, 다른 두 필름에서 보다 산화질소가 더 천천히 지속적으로 방출된다는 사

실을 알 수 있었다. 이와 달리, 2.5bi와 10.5bi의 경우에는 그 방출 양상이 현저히 달라지는 모습을 볼 수 있었는데(Fig. 8a), 2.5bi 필름은 지속 기간이 21.6시간 동안만 유지되는 비교적 짧은 방출 양상을 보였다. 그 이유는 기판 위에 코팅된 고분자 물질의 양이 적어서 NONOate 또한 적은 양만이 탑재되었기 때문이다[41].

그 이후의 6.5bi 필름까지는 두께가 증가할수록 산화질소 방출량도 증가하는 모습을 보였으나, 10.5bi 필름에서는 34.1시간 동안만 방출이 지속되면서 그 방출 지속기간이 예상과 달리 감소하는 것을 확인할 수 있었다[40]. 이는 10.5bi 필름의 표면 형태가 거칠고 외부 공기에 노출되는 부분이 증가함에 따라 NONOate가 더 빠르게 방출되었기 때문이다. 또한, 이중층의 수가 늘어남에 따라 늘어난 필름의 두께가 합성 용액 내에서의 구조적 특성을 변형시켰을 가능성도 있다[41]. 따라서 필름의 두께가 늘어나면서 맞닿아 있는 층간의 상호작용이 증가하여 NONOate가 필름 내부에 합성되는 환경 조건을 저해한 것이다.

PLL/PGA를 이용한 나노 필름은 이차원적인 산화질소 전달체를 제작하였다는 것에서 의미가 있을 뿐만 아니라 그 두께를 조절하여 산화질소 방출 양상을 지속적으로 조절하였다는 점에서 중요성을 가진다. 이를 응용하면 산화질소가 방출되는 지속기간을 최대한으

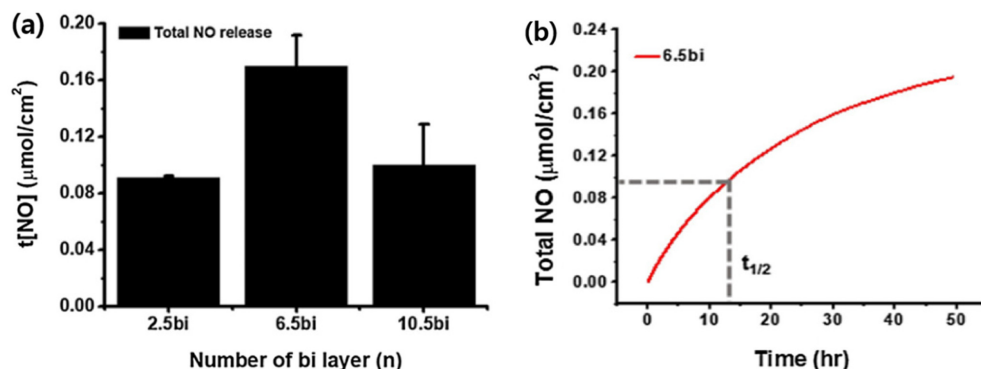


Fig. 8. (a) Total nitric oxide release amount of each film (n=2.5, 6.5, 10.5 bilayers), (b) Nitric oxide release profile of 6.5 bilayer nanofilm.

로 유지할 수 있는 적합한 필름의 두께를 이용하여 다양한 바이오메디컬 분야에 적용시킬 수 있을 것으로 예상된다.

3. 결 론

산화질소의 쓰임과 응용분야가 넓어짐에 따라 산화질소를 효과적으로 전달할 수 있는 전달체에 대한 연구가 급증하고 있으며 다양한 형태의 산화질소 전달체가 개발되고 있다. 그 중에서도 인체에 적용이 가능한 이상적인 전달체는 산화질소 방출 조절 요인들을 정확하게 파악함으로써 산화질소 방출을 조절할 수 있는 전달체이다. 산화질소 탑재량, 반감기, 방출 거동, 지속시간 등의 산화질소 방출 조절 요인들을 정확하게 파악할 수 있는 전달체를 개발해야 in vitro/in vivo 상에서 원하는 효과를 나타낼 수 있는 산화질소의 양을 정확하게 예상할 수 있고, 이를 토대로 효과적인 치료가 이루어질 수 있을 것이다.

본 논문에서는 나노 입자 및 나노 필름의 특성을 이용하여 산화질소의 방출 양상을 조절한 전달체 연구에 대하여 살펴보았다. 산화질소 전달체 연구의 궁극적인 목표는 지속적이면서도 체내에서 약물 효과를 보이는 산화질소 전달 시스템을 개발하는 것이다. 나노 입자 형태의 산화질소 전달체는 체내의 여러 경로를 통해 투여될 수 있다는 이점이 있고, 사용하는 고분자 물질에 따라서 그 방출 양상을 효과적으로 조절할 수 있으며, 나노 필름 형태의 산화질소 전달체는 LbL assembly 기법을 이용하여 제작될 수 있고 그 구성과 구조, 두께 등을 조절함으로써 방출 양상을 조절할 수 있다는 이점이 있다. 이러한 나노 입자 및 나노 필름 형태의 나노 구조체의 여러가지 이점을 기반으로 차후 산화질소 전달 연구에서도 나노 구조체를 이용한 연구가 부상할 것으로 보이고, 이에 따라 더욱 많은 바이오메디컬 분야에서 관심과 주목을 받을 것으로 기대한다.

References

- Walford, G. and Loscalzo, J., "Nitric Oxide in Vascular Biology," *Journal of Thrombosis Haemostasis*, **1**(10), 2112(2003).
- Fang, F. C., "Perspectives Series: Host/pathogen Interactions. Mechanisms of Nitric Oxide-related Antimicrobial Activity," *The Journal of Clinical Investigation*, **99**(12), 2818(1997).
- Luo, J.-D. and Chen, A. F., "Nitric Oxide: a Newly Discovered Function on Wound Healing," *Acta Pharmacologica Sinica*, **26**(3), 259(2005).
- Mocellin, S., Bronte, V. and Nitti, D., "Nitric Oxide, a Double Edged Sword in Cancer Biology: Searching for Therapeutic Opportunities," *Medicinal Research Reviews*, **27**(3), 317(2007).
- Napoli, C., Paolisso, G., Casamassimi, A., Al-Omran, M., Barbieri, M., Sommesse, L., Infante, T. and Ignarro, L. J., "Effects of Nitric Oxide on Cell Proliferation: Novel Insights," *Journal of the American College of Cardiology*, **62**(2), 89(2013).
- Hetrick, E. M., Shin, J. H., Stasko, N. A., Johnson, C. B., Wespe, D. A., Holmuhamedov, E. and Schoenfisch, M. H., "Bactericidal Efficacy of Nitric Oxide-releasing Silica Nanoparticles," *ACS Nano*, **2**(2), 235(2008).
- Suchyta, D. J. and Schoenfisch, M. H., "Controlled Release of Nitric Oxide from Liposomes," *ACS Biomaterials Science & Engineering*, **3**(9), 2136(2017).
- Reighard, K. P., Ehre, C., Rushton, Z. L., Ahonen, M. J. R., Hill, D. B. and Schoenfisch, M. H., "Role of Nitric Oxide-releasing Chitosan Oligosaccharides on Mucus Viscoelasticity," *ACS Biomaterials Science & Engineering*, **3**(6), 1017(2017).
- Hrabie, J. A. and Keefer, L. K., "Chemistry of the Nitric Oxide-releasing Diazeniumdiolate ("nitrosohydroxylamine") Functional Group and Its Oxygen-substituted Derivatives," *Chemical Reviews*, **102**(4), 1135(2002).
- Friedman, A. J., Han, G., Navati, M. S., Chacko, M., Gunther, L., Alfieri, A. and Friedman, J. M., "Sustained Release Nitric Oxide Releasing Nanoparticles: Characterization of a Novel Delivery Platform Based on Nitrite Containing Hydrogel/glass Composites," *Nitric Oxide*, **19**(1), 12(2008).
- Gelperina, S., Kisich, K., Iseman, M. D. and Heifets, L., "The Potential Advantages of Nanoparticle Drug Delivery Systems in Chemotherapy of Tuberculosis," *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, **172**(12), 1487(2005).
- Gupta, R. and Kumar, A., "Bioactive Materials for Biomedical Applications Using Sol-gel Technology," *Biomedical Materials*, **3**(3), 034005(2008).
- Rosenholm, J. M., Sahlgren, C. and Lindén, M., "Towards Multifunctional, Targeted Drug Delivery Systems Using Mesoporous Silica Nanoparticles-opportunities & Challenges," *Nanoscale*, **2**(10), 1870(2010).
- Slowing, I. I., Vivero-Escoto, J. L., Wu, C.-W. and Lin, V. S.-Y., "Mesoporous Silica Nanoparticles as Controlled Release Drug Delivery and Gene Transfection Carriers," *Advanced Drug Delivery Reviews*, **60**(11), 1278(2008).
- Vivero-Escoto, J. L., Slowing, I. I., Trewyn, B. G. and Lin, V. S. Y., "Mesoporous Silica Nanoparticles for Intracellular Controlled Drug Delivery," *Small*, **6**(18), 1952(2010).
- Jeong, H., Park, J.-H., Shin, J. H., Yoo, J.-C., Park, C. Y. and Hong, J., "Prolonged Release Period of Nitric Oxide Gas for Treatment of Bacterial Keratitis by Amine-Rich Polymer Decoration of Nanoparticles," *Chemistry of Materials*, **30**(23), 8528(2018).
- Jeong, H., Hwang, J., Lee, H., Hammond, P. T., Choi, J., Hong, J., "In Vitro Blood Cell Viability Profiling of Polymers Used in Molecular Assembly," *Scientific reports*, **7**(1), 9481(2017).
- Choi, D., Son, B., Park, T. H. and Hong, J., "Controlled Surface Functionality of Magnetic Nanoparticles by Layer-by-layer Assembled Nano-films," *Nanoscale*, **7**(15), 6703(2015).
- Jeong, H., Heo, J., Son, B., Choi, D., Park, T. H., Chang, M. and Hong, J., "Intrinsic Hydrophobic Cairnlike Multilayer Films for Antibacterial Effect with Enhanced Durability," *ACS Applied Materials Interfaces*, **7**(47), 26117(2015).
- Park, S., Choi, D., Jeong, H., Heo, J. and Hong, J., "Drug Loading and Release Behavior Depending on the Induced Porosity of Chitosan/cellulose Multilayer Nanofilms," *Molecular Pharmaceutics*, **14**(10), 3322(2017).
- Choi, M., Park, S., Park, K., Jeong, H. and Hong, J., "Nitric Oxide Delivery Using Biocompatible Perfluorocarbon Microemulsion for Antibacterial Effect," *ACS Biomaterials Science and Engineering*, **5**(3), 1378(2019).
- O'Hagan, D., "Understanding Organofluorine Chemistry. An Introduction to the C-F Bond," *Chemical Society Reviews*, **37**(2), 308(2008).
- Riess, J. G., "Understanding the Fundamentals of Perfluorocarbons and Perfluorocarbon Emulsions Relevant to in vivo Oxy-

- gen Delivery,” *Artificial Cells, Blood Substitutes, Biotechnology*, **33**(1), 47(2005).
24. Kerwin Jr, J. F., Lancaster, J. R. and Feldman, P. L., “Nitric Oxide: a New Paradigm for Second Messengers,” *Journal of medicinal chemistry*, **38**(22), 4343(1995).
 25. Welch, G. and Loscalto, J., “Nitric Oxide and the Cardiovascular System,” *Journal of cardiac surgery*, **9**(3), 361(1994).
 26. Jones, M. L., Ganopolsky, J. G., Labbé, A., Wahl, C. and Prakash, S., “Antimicrobial Properties of Nitric Oxide and Its Application in Antimicrobial Formulations and Medical Devices,” *Applied Microbiology Biotechnology*, **88**(2), 401(2010).
 27. Decher, G., “Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites,” *Science*, **277**(5330), 1232(1997).
 28. Heo, J., Choi, M., Chang, J., Ji, D., Kang, S. W. and Hong, J., “Highly Permeable Graphene Oxide/polyelectrolytes Hybrid Thin Films for Enhanced CO₂/N₂ Separation Performance,” *Scientific Reports*, **7**(1), 456(2017).
 29. Han, U., Seo, Y. and Hong, J., “Effect of pH on the Structure and Drug Release Profiles of Layer-by-layer Assembled Films Containing Polyelectrolyte, Micelles, and Graphene Oxide,” *Scientific Reports*, **6**24158(2016).
 30. Hwangbo, S., Heo, J., Lin, X., Choi, M. and Hong, J., “Transparent Superwetting Nanofilms with Enhanced Durability at Model Physiological Condition,” *Scientific reports*, **6**19178(2016).
 31. Choi, M., Park, H. H., Choi, D., Han, U., Park, T. H., Lee, H., Park, J. and Hong, J., “Multilayer Nanofilms via Inkjet Printing for Stabilizing Growth Factor and Designing Desired Cell Developments,” *Advanced healthcare materials*, **6**(14), 1700216(2017).
 32. Han, U., Park, H. H., Kim, Y. J., Park, T. H., Park, J. H. and Hong, J., “Efficient Encapsulation and Sustained Release of Basic Fibroblast Growth Factor in Nanofilm: Extension of the Feeding Cycle of Human Induced Pluripotent Stem Cell Culture,” *ACS Applied Materials Interfaces*, **9**(30), 25087(2017).
 33. Jeong, H., Ranallo, S., Rossetti, M., Heo, J., Shin, J., Park, K., Ricci, F. and Hong, J., “Electronic Activation of a DNA Nanodevice Using a Multilayer Nanofilm,” *Small*, **12**(40), 5572(2016).
 34. Jeong, H., Park, K., Yoo, J.-C. and Hong, J., “Structural Heterogeneity in Polymeric Nitric Oxide Donor Nanoblended Coatings for Controlled Release Behaviors,” *RSC Advances*, **8**(68), 38792(2018).
 35. Silva, J. M., Caridade, S. G., Costa, R. R., Alves, N. L. M., Groth, T., Picart, C., Reis, R. L. and Mano, J. O. F., “pH Responsiveness of Multilayered Films and Membranes Made of Polysaccharides,” *Langmuir*, **31**(41), 11318(2015).
 36. Rizk, M., Witte, M. B. and Barbul, A., “Nitric Oxide and Wound Healing,” *World journal of surgery*, **28**(3), 301(2004).
 37. Park, K., Jeong, H., Tanum, J., Yoo, J.-C. and Hong, J., “Poly-L-lysine/poly-L-glutamic Acid-based Layer-by-layer Self-assembled Multilayer Film for Nitric Oxide Gas Delivery,” *Journal of industrial engineering chemistry*, **69**263(2019).
 38. Burke, S. E. and Barrett, C. J., “pH-responsive Properties of Multilayered Poly(L-lysine)/hyaluronic Acid Surfaces,” *Biomacromolecules*, **4**(6), 1773(2003).
 39. Zhou, J., Wang, B., Tong, W., Maltseva, E., Zhang, G., Krastev, R., Gao, C., Möhwald, H. and Shen, J., “Influence of Assembling pH on the Stability of Poly(L-glutamic acid) and Poly(L-lysine) Multilayers Against Urea Treatment,” *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, **62**(2), 250(2008).
 40. Kim, J., Saravanakumar, G., Choi, H. W., Park, D., Kim, W. J., “A Platform for Nitric Oxide Delivery,” *Journal of Materials Chemistry B*, **2**(4), 341(2014).
 41. Haynie, D. T., Balkundi, S., Palath, N., Chakravarthula, K. and Dave, K., “Polypeptide Multilayer Films: Role of Molecular Structure and Charge,” *Langmuir*, **20**(11), 4540(2004).