



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

농학석사 학위논문

대식세포 표적화 및 분극화를 위한

보리 베타글루칸/

CpG 올리고뉴클레오타이드/

은나노입자 복합체

Barley β -glucan/CpG ODN/Ag

nanocomplexes for macrophage

targeting and polarization

2022년 2월

서울대학교 대학원

농림생물자원학부

바이오소재공학전공

이 미 겸

대식세포 표적화 및 분극화를 위한
보리 베타글루칸/CpG 올리고뉴클레오타이드
/은나노입자 복합체

지도 교수 김 태 일

이 논문을 농학석사 학위논문으로 제출함

2021년 11월

서울대학교 대학원

농림생물자원학부

바이오소재공학전공

이 미 겸

이미겸의 농학석사 학위논문을 인준함

2021년 12월

위 원 장 _____ 기 창 석 _____ (인)

부위원장 _____ 김 태 일 _____ (인)

위 원 _____ 현 진 호 _____ (인)

초 록

본 연구에서는 면역 보조제로 사용되고 있는 CpG 올리고뉴클레오타이드(Unmethylated cytosine-phosphate-guanine, CpG ODN)와 면역 원성이 있어 다양한 면역 질환의 치료에 활용되고 있는 보리 베타글루칸을 전달할 수 있는 보리 베타글루칸/CpG 올리고뉴클레오타이드/은나노입자 삼중 복합체를 개발하여 대식세포에 대한 뛰어난 친화성과 M1 표현형으로의 분극화 효과를 확인하였다. 산화 베타글루칸(Ox- β -glucan)의 수평균 분자량과 중량 평균 분자량은 OXBG 0.5X가 각각 4.2 kDa, 22.9 kDa였으며, 1X가 3.0 kDa, 13.9 kDa, 2X가 2.0 kDa, 9.2 kDa로 나타났다. 또, OXBG의 알데히드기는 0.5X가 1.07 mmole/g, 1X가 2.39 mmole/g, 2X가 3.81 mmole/g으로, 각각 14.14, 31.66, 50.35%의 산화도를 갖는 것으로 계산되었다. 베타글루칸의 산화도와 분자량은 제조된 나노입자의 안정성과 대식세포에 대한 친화도에 영향을 미쳐, β G_{1X}-CpG-Ag NP는 낮은 안정성을 보였다. 은나노입자의 크기와 형태는 Ag 이온을 방출할 수 있는 표면적의 넓이를 결정하여, 작은 크기일수록 더 많은 활성산소종을 유도하며 높은 세포 독성을 갖는다. Ag NP와 CpG-Ag NP는 가장 고농도에서도 각각 80%와 90% 이상의 세포 활성을 가졌으며, β G_{0.5X}-CpG-Ag NP 또한 가장 높은 농도를 처리했을 때를 제외하고 80% 이상의 세포 활성을 보였다. Ag가 노출되지 않은 CpG-Ag NP와 β G_{0.5X}-CpG-Ag NP는 세포 내에서 표면이 노출된 Ag NP만큼의 활성 산소종을 발생시키기까지 더 많은 시간이 필요하였다. β G_{0.5X}-CpG-Ag NP를 처리했을 때, 4시간이

경과해서는 DCF 형광이 증가하지 않았다. 그러나 8시간이 경과했을 때는 세포 대비 1.74배까지 형광 세기가 증가하여 1.88배 증가한 Ag NP와 유사한 수준을 보였다. 유세포 분석 실험에서 베타 글루칸을 포함하는 나노 입자의 암세포인 HeLa 세포 대비 면역세포인 RAW264.7 세포에 대한 높은 친화도를 확인할 수 있었으며, 특히 RAW264.7 세포에서 β G_{0.5X}-CpG-Ag NP의 세포 투과율이 85.0%로 CpG-Ag NP의 33.9%에 비해 월등히 높았다. Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR (qRT-PCR)에서는 M1 분극화에 대한 지표로 iNOS, COX-2의 발현 수준을 보았을 때, RAW264.7 세포에서 iNOS와 COX-2의 발현 수준이 증가하였으며, 특히 COX-2가 β G_{0.5X}-CpG-Ag NP를 처리했을 때 CpG-Ag NP보다 통계적으로 유의한 수준으로 증가하였다. 본 연구에서는 베타글루칸을 활용하여 대식세포에 대한 높은 친화도를 갖는 삼중 나노 입자를 제작하였으며, 이를 이용하여 대식세포의 M1 분극화 가능성을 확인하였다.

주요어 : 보리 베타글루칸, CpG 올리고뉴클레오타이드, 은나노입자, 면역 보조제, 유전자 전달, 대식세포, M1 분극화
학 번 : 2020-29435

목 차

초 록	i
목 차	iii
List of Tables	vi
List of Figures	vii
제 1 장 서 론	1
제 2 장 문헌 연구.....	6
2.1 베타 글루칸을 활용한 유전자 및 약물 전달 시스템	6
2.1.1 베타 글루칸의 면역 조절 (immunomodulation) 효과	8
2.1.2 베타 글루칸을 활용한 대식세포 표적 전달 시스템.....	11
2.2 면역 보조제 (immune adjuvant)로서의 CpG ODN의 활용	12
2.2.1 CpG ODN에 의한 면역 반응의 분자적 메커니즘	13
2.2.2 나노 입자를 활용한 CpG ODN의 전달 시스템	14
제 3 장 재료 및 방법.....	17
3.1 재료	17
3.2 실험 방법	19
3.2.1 산화 베타글루칸 (Ox- β -glucan)의 합성	19
3.2.1.1 ¹ H NMR과 FT-IR을 활용한 OXBG의 구조 분석	19
3.2.1.2 OXBG의 분자량 및 산화도의 측정.....	20
3.2.2 나노입자의 합성	21
3.2.2.1 DLS를 이용한 나노입자의 평균 입자 크기 및 표면 전하	

측정	22
3.2.2.2 TEM-EDS를 이용한 입자 형태 확인 및 원소 조성의 확인	22
3.2.2.3 DLS를 이용한 표면 개질에 따른 안정성 (colloidal stability) 확인	23
3.2.2.4 Nanosight (NTA)를 이용한 나노파티클의 입자 크기 분포 측정	23
3.2.2.5 산화 베타글루칸(OXBG)의 결합에 따른 이민 결합 생성의 확인	24
3.2.2.6 나노입자의 CpG 흡착 효율 (loading efficiency)의 확인 ..	24
3.2.2.7 아가로스 젤 전기영동을 통한 나노입자의 환원성 환경에서의 CpG 방출 능력의 확인	25
3.2.3 세포실험	26
3.2.3.1 세포 배양	26
3.2.3.2. MTT assay를 이용한 세포 대사 활성 확인	26
3.2.3.3. 유세포 분석법을 이용한 세포 투과율 확인	27
3.2.3.4. 공초점 현미경을 이용한 세포내 이미징	28
3.2.3.5. 세포 내 활성 산소종 (reactive oxygen species, ROS) 수준의 확인	29
3.2.3.6. 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)과 실시간 중합효소 연쇄반응 (Real Time-PCR, qPCR)을 이용한 대식세포 M1 분극화 효능의 확인	30
3.2.4. 통계 검정	32

제 4 장 결과 및 고찰..... 34

4.1 산화 베타글루칸의 합성 및 특성 분석.....	34
4.1.1 OXBG의 합성	34
4.1.2 ¹ H NMR과 FT-IR을 활용한 OXBG의 구조 분석	34

4.1.3 OXBG의 분자량 및 산화도의 측정.....	39
4.2 나노입자의 특성 분석.....	43
4.2.1 나노입자의 평균 입자 크기 및 표면전하 측정.....	43
4.2.2 나노입자의 입자 형태 및 원소 조성 확인	47
4.2.3 나노입자의 안정성 확인	50
4.2.4 OXBG 결합에 따른 이민 결합 형성의 확인.....	51
4.2.5 CpG-Ag NP 나노입자의 CpG 흡착 효율(loading efficiency)의 확인.....	57
4.2.6 나노입자의 형성 확인 및 CpG의 방출 확인	57
4.3 CpG-Ag NP와 β G-CpG-Ag NP 나노입자의 생물학적 평가..	
.....	61
4.3.1 나노입자의 세포 대사 활성 확인	61
4.3.2 유세포 분석법을 이용한 세포 투과율 평가	63
4.3.3 공초점 현미경을 이용한 세포내 거동 확인.....	65
4.3.4 세포 내 활성 산소종 (reactive oxygen species, ROS) 수준의 확인	69
4.3.5 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)과 실시간 중합효소 연쇄반응 (Real Time-PCR, qPCR)을 이용한 대식세포 M1 분극화 효능의 확인	71
제 5 장 결론.....	75
참고문헌.....	77
Abstract.....	87

List of Tables

Table 1. Sequence of CpG-dC ₁₂ oligonucleotide	18
Table 2. Final concentration, functional group, and molar ratio of amine to aldehyde of reactants	22
Table 3. Primer sequence used in qPCR.....	32
Table 4. Calculated molar ratio of periodate to glucose unit and reacted amount of OXBG 0.5X, OXBG 1X, and OXBG 2X during periodate oxidation of beta glucan.....	36
Table 5. Molecular weight of beta glucan, and ox-β-glucan of different oxidation degree (OXBG 0.5X, OXBG 1X, and OXBG 2X) determined by GPC.....	41
Table 6. Oxidation degree of OXBG 0.5X, OXBG 1X, and OXBG 2X determined by Amplite™ Fluorimetric Aldehyde Quantitation Kit	42
Table 7. Size and zeta potential of Ag nanoparticles measured by Zeta-Sizer	46
Table 8. UV absorbance of 100K filtrate and calculated CpG mole and loading efficiency	59
Table 9. Bound rate (%) of YOYO-1 iodide to CpG in various CpG-Ag NP samples after ultrafiltration at 3000 rpm for 30 min using Amicon® Ultra Centrifugal Filter (MWCO 3 kDa)	66
Table 10. FACS results of CpG-Ag NP and βG _{0.5X} -CpG-Ag NP in HeLa and RAW264.7 cells	67

List of Figures

Figure 1. Schematic diagram of synthesis and macrophage activation of CpG–Ag nanoparticles.....	5
Figure 2. Formation of (A) CpG–Ag NP (CpG can interact with Ag via binding site of PS, C, and G) and (B) β G–CpG–Ag NP.....	33
Figure 3. Oxidation of beta glucan.....	36
Figure 4. ^1H NMR spectra of (A) β –glucan and (B) Ox– β –glucan.....	37
Figure 5. FT–IR spectra of beta glucan and ox– β –glucan....	38
Figure 6. GPC results of intact beta glucan, OXBG 0.5X, OXBG 1X and OXBG 2X.....	41
Figure 7. Fluorescence of aldehyde according to its dose (μM)	42
Figure 8. Size distribution of (A) CpG–Ag NP, (B) β G _{0.5X} –CpG–Ag NP, and (C) β G _{1X} –CpG–Ag NP measured by Zeta–sizer	45
Figure 9. FE–TEM images of (A), (D) CpG–Ag NP, (B), (E) β G _{0.5X} –CpG–Ag NP, and (C), (F) β G _{1X} –CpG–Ag NP . ..	48
Figure 10. TEM–EDS image of (A) CpG–Ag NP and (B) β G _{0.5X} –CpG–Ag NP.....	49
Figure 11. Size distribution of Ag NP, CpG–Ag NP, β G _{0.5X} –CpG–Ag NP, and β G _{1X} –CpG–Ag NP in deionized water and SF media in overlays of different time points (0h, 2h, 4h)	53
Figure 12. Size distribution of (A) CpG–Ag NP and (B) β	

	$G_{0.5X}$ -CpG-Ag in 4°C, deionized water at different time points (0 day, 2 day)	54
Figure 13.	FT-IR spectra of OXBG 0.5X, OXBG 1X, OXBG 0.5X+CpG and OXBG1X+CpG.....	55
Figure 14.	FT-IR spectra of CpG, OXBG 0.5X and OXBG 0.5X+CpG-Ag NP	56
Figure 15.	UV absorbance of CpG according to its dose (μ M)	59
Figure 16.	Agarose gel electrophoresis of (A) CpG-Ag NP and (B) $\beta G_{0.5X}$ -CpG-Ag NP with or without 5 mM DTT using 2% (w/v) agarose gel.....	60
Figure 17.	MTT cell viability assay of Ag NP, CpG-Ag NP, and $\beta G_{0.5X}$ -CpG-Ag NP with RAW 264.7	62
Figure 18.	Fluorescence intensity of YOYO-1 iodide according to its dose(nM) (ex. 458 nm, em. 560 nm)	66
Figure 19.	Flow cytometry results of CpG-Ag NP and $\beta G_{0.5X}$ -CpG-Ag NP in serum-free condition in (A) HeLa cells and (B) RAW264.7 cells	67
Figure 20.	Confocal microscopic images of YOYO-1 iodide labelled (a) CpG-Ag NP and (b) $\beta G_{0.5X}$ -CpG-Ag NP in (A) HeLa cells (40X, zoom factor 2) and (B) RAW264.7 cells (63X, zoom factor 4) nucleus stained with Hoeschst 33342	68
Figure 21.	Measurement of intracellular ROS level after 4h and 8h treatment of 50 μ M TBHP, Ag NP, CpG-Ag NP and $\beta G_{0.5X}$ -CpG-Ag NP (1.0×10^7 particles/mL). Intracellular ROS levels presented in terms of DCF fluorescence intensity relative to the value of untreated cells.....	73

Figure 22. Relative mRNA expression levels of (A) iNOS, (B) COX-2, (C) Arg-1, and (D) TGF- β by CpG-Ag NP and β G_{0.5X}-CpG-Ag NP treatments on RAW264.7 cells..... **74**

제 1 장 서 론

대식세포는 종양 미세환경에서 M1형과 M2형의 두가지의 표현형으로 분극화가 가능하다. 먼저, M1형의 대식세포는 미생물 유래의 지질 다당류(lipopolysaccharide, LPS)나 IFN- γ , IL-2 등의 Th1 사이토카인에 의해서 분극화된 형태로, 염증 유발, 항미생물, 항암의 특성을 갖는다. M2형의 대식세포는 IL-4, IL-13 등의 Th2 사이토카인에 의해서 분극화된 형태로, 항염증, 조직 재생, 암 전이, 혈관 신생의 특성을 갖는다 [1]. 종양 미세환경 상에서 면역 반응을 억제하는 특성을 갖는 종양 관련 대식세포(tumor associated macrophages, TAM)은 M2 표현형의 특성을 가지며, T 세포 활성을 저해하는 사이토카인을 분비함으로써 암의 생성, 증식 및 전이에 관여한다. 항암 면역 치료는 이러한 TAM 세포를 M1 표현형으로 재분극시킴으로써 항암 특성을 갖도록 하는 치료법이다 [2].

베타 글루칸은 면역 자극 및 항종양 활성이 보고되어 왔지만, 자세한 메커니즘은 이제 막 시작한 연구이다. 곰팡이 유래의 입자 형태 베타 글루칸은 큰 크기에도 불구하고 파이어스 패치(Peyer's patches)의 M세포 내부로 유입될 수 있으며 [3], 대식세포나 수지상세포(dendritic cells, DC)와 상호작용하며 전신 면역반응을 활성화시켜 곰팡이 감염에 대응할 수 있게 한다 [4]. 또한 베타 글루칸은 병원체 관련 분자 패턴 (pathogen-associated molecular patterns, PAMP)으로 기능하며 선천 면역 세포에 대한 패턴 인식 수용체(pattern recognition receptors, PRRs)에 의해 인식된다 [5].

PRR 신호 경로는 감염성 병원균에 대한 선천적 숙주 방어의 중요한 메커니즘이다. 특히 Human dectin-1/CLEC7A는 골수 유도 세포(myeloid-derive cells)에 주로 발현되는 C형 렉틴 수용체군(C-type lectin family of receptors)에 속하는 PRR로 균류 및 세균 세포벽에 존재하는 노출된 β -1,3 글루칸을 인식한다 [6]. Dectin-1에 대한 리간드의 결합은 면역수용체 타이로신 기반 활성화 모티프 (hemITAM)을 활성화하고, 이어서 다운스트림의 Syk 의존형과 비의존형 신호 전달에 관여한다 [7]. 결과적으로는 면역세포의 식세포작용, 활성화 산소종의 생성, 염증성 사이토카인의 방출을 포함한 다량의 면역학적 방어 메커니즘을 개시하는 것으로 알려져 있다 [8]. 정리하면, dectin-1 수용체 시스템은 균 감염에 맞서 최전선에서 기능하는 고등동물계 선천면역세포에서 베타 글루칸의 PRR로서 기능하며, 암치료에 활용되어 전신면역기능을 강화할 수 있다.

CpG 올리고뉴클레오타이드(Unmethylated cytosine-phosphate-guanine, CpG ODN)는 박테리아나 바이러스 유래의 DNA로 포유류의 면역세포에서 Toll-like receptor 9 (TLR9)에 의해 인식되며, 사이토카인의 분비를 촉진하여 선천성 및 후천성 면역 반응을 유도한다 [9]. CpG ODN은 TLR9에 인식되어 MyD88 의존형 nuclear factor- κ B (NF- κ B)와 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 신호전달을 통해 TNF- α , IL-6, IL-12 등의 사이토카인을 생성함으로써 강력한 면역 반응을 유도한다 [10]. 따라서 CpG ODN은 TLR9의 자극을 통해 면역 반응을 유도하는 특성으로 인해 감염성 질환, 알레르기, 암 등의 치료에 활용되어 왔다. 그러나 CpG ODN 자체만으로는 세포막의 투과성이

좋지 않고 세포질 내의 뉴클레아제 (nuclease) 등에 의해 빠르게 분해되는 특성이 있어, 면역 활성화를 위해서는 표적 세포로의 적절한 전달체의 개발이 필요하게 되었다.

본 연구는 보리 베타 글루칸, CpG 올리고뉴클레오타이드, 은나노입자를 활용한 복합체를 제조하여 대식세포에 전달하고, 대식세포의 분극화를 유도하여 항암특성을 갖도록 하는 것이 목표이다. 대식세포의 M1과 M2 비율의 불균형은 면역 반응을 약화하거나 과도한 염증 반응으로 이어지므로, 대식세포는 감염, 염증성 질환 및 각종 암의 치료를 위한 수단으로써 중요하게 작용한다. 대식세포의 표면에 높은 수준으로 발현되는 수용체인 TLR과 C형 렉틴 수용체(C-type lectin receptor, CLR)는 나노입자 기반의 전달 시스템의 주요한 타겟이 된다 [11].

다당류를 이용한 나노입자 표면의 관능화는 이러한 대식세포 수용체에 대한 나노입자의 표적 전달을 가능하게 하므로 많은 연구가 진행되었다. 나노입자의 관능화가 갖는 이점으로 나노입자의 독성, 면역 원성 및 분포(biodistribution)가 표면의 화학 구조를 통해 조절 가능하며, 향상된 약동학, 약력학적 특성, 표적 세포로의 효과적인 이입, 적은 부작용을 동반하는 표적 전달 시스템의 구축이 있다. 반면 한계점으로는 나노입자의 관능화를 위한 복잡한 반응 과정, 스케일업의 문제를 비롯해서 이종의 화학종이 합성될 확률, 보관 과정에서의 나노입자의 안정성 및 혈액 성분과의 반응 등이 있다 [12].

CpG 올리고뉴클레오타이드는 면역 보조제로써 활용되고 있지만, 세포에 도달하기까지 안전하게 유전자를 보호하고 세포 내 환경에서 효과적으로 유전자를 방출할 수 있는 운반체의 개발이

필요하다. 보리 베타글루칸은 Figure 1의 ③과 같이 대식세포의 CLR인 dectin-1 수용체에 대해서 상호작용이 가능하다. 또한 은나노입자는 세포 내에서 활성 산소종을 발생시킬 수 있는 능력이 있어 세포 사멸을 유도할 수 있지만, 한편으로는 Figure 1의 ②와 같이 활성 산소종이 면역 반응의 활성화 과정에서 신호 전달의 역할을 하므로 면역 보조제인 CpG ODN의 전달체로서 적합하다.

따라서 본 연구에서는 Figure 1의 ①과 같이 은나노입자와의 CpG ODN 사이의 반데르발스 인력 및 CpG와 산화 보리 베타글루칸 사이의 이민 결합을 이용하여 CpG를 대식세포에 높은 친화도로 전달하고, CpG가 유도하는 면역 반응의 활성화를 도우며, 세포 내 환원성 환경에서 CpG를 효과적으로 방출할 수 있는 보리 베타글루칸/CpG 올리고뉴클레오타이드/은나노입자 삼중 복합체를 개발하였다.

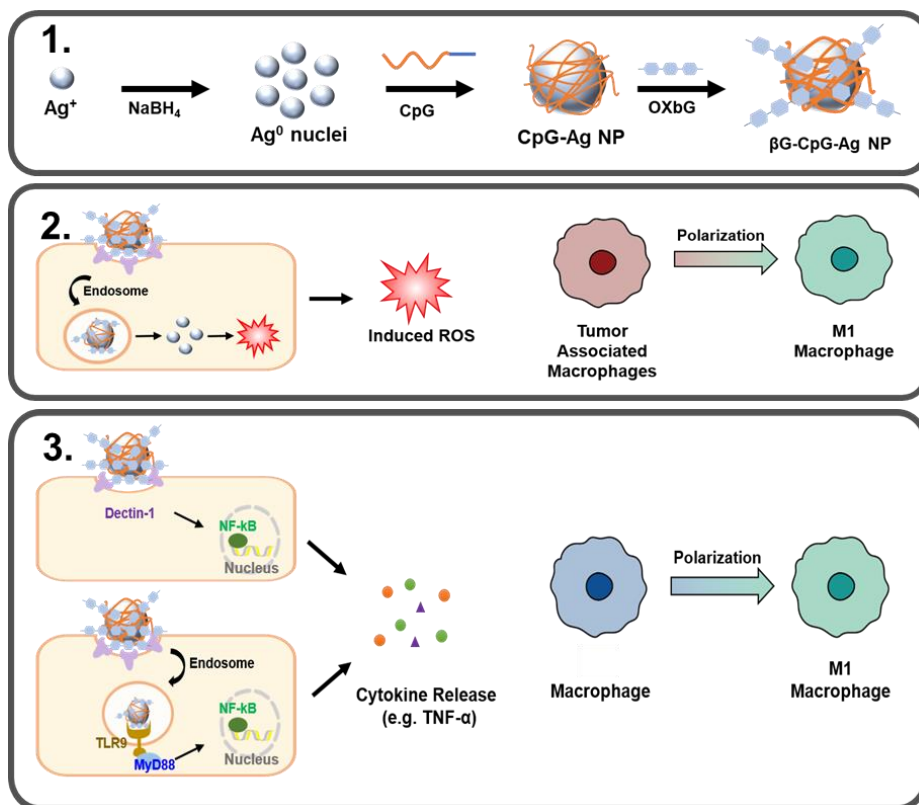


Figure 1. Schematic diagram of synthesis and macrophage activation of CpG–Ag nanoparticles. ① Formation of CpG–Ag nanoparticles via reduction of Ag ion, van der Waals interaction between Ag and CpG, and imine bond between CpG and oxidized beta glucan. ② ROS release by silver NP polarizes tumor associated macrophages toward an M1 antitumor phenotype. ③ Dectin–1 mediated endocytosis followed by multiple signal transduction cascades to polarize macrophage to M1 phenotype involves the role of β –glucan and CpG ODN.

제 2 장 문헌 연구

2.1 베타 글루칸을 활용한 유전자 및 약물 전달 시스템

베타 글루칸은 곡물, 박테리아 및 곰팡이의 세포벽에서 발견되는 β -D-글루코스 다당류의 그룹으로 구성되며, 공급원에 따라서 매우 상이한 물리화학적 특성을 갖는다. 일반적으로 베타 글루칸은 1,3- β -D-글리코시드 결합을 가지는 선형의 주쇄를 형성하지만, 분자량, 용해성, 점도, 가지 구조 및 젤화 특성에 따라 상이한 구조를 가지며, 특히 생분해성과 뛰어난 생체적합성 및 점막접착성으로 인해 유전자 또는 약물 전달체로 응용하기 위한 연구가 다수 이루어지고 있다.

베타 글루칸의 일종인 커들란(curdlan)은 뛰어난 젤 형성 능력으로 인해서 자가 조립 하이드로젤 나노입자를 형성할 수 있어, 소수성 코어와 친수성 쉘 구조를 갖는다 [13]. Cai 등의 연구진은 이러한 커들란 하이드로젤을 이용하여 치료 부위로 약물을 전달하였다 [14]. 양친매성의 커들란 유도체는 항암제인 독소루비신(doxorubicin)을 전달하는 나노 운반체로 활용되었으며, 이 때 커들란은 디옥시콜산(deoxycholic acid)으로 개질되어 소수성을 띠며 구형의 나노입자로 자가조립(self-aggregate)이 가능하였으며, pH와 용량(dose)에 따른 약물 방출이 가능하였다 [15]. 양친매성의 커들란에 약물을 담지하는 방식과 달리, 항암제인 독소루비신을 pH 감응성의 아마이드 결합을 통해서 커들란에 결합하여 전달한 사례도 있다. 이 경우 화학적으로 결합되지 않은

독소루비신에 비해 더욱 효과적인 방출 제어가 가능하였다 [16].

β -글루칸 입자(GP)는 고분자 탄수화물로 주로 세포벽 곰팡이, 효모, 박테리아 및 보리, 귀리 등의 곡물에서 발견되며, 최근 대식세포 표적 약물 전달 연구에 활발하게 사용되고 있다. Tarun 등이 진행한 연구의 목적은 다제내성결핵(multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB)에 효과적인 다량의 결핵방지제인 리파부틴(Ribabutin, RB)이 함유된 GP를 준비하고 물리화학적 특성을 분석하는 것이었다. GP는 RB 담지 전에 효모 세포로부터 산성과 알칼리 조건에서 추출되어 스프레이 건조(spray dried) 또는 동결건조 되었다. 담지된 약물은 확산에 의해 서서히 방출되었으며, 스프레이 건조 GP 기반의 제형 기술은 결핵 치료에 적용했을 때 대식세포에 대한 항TB 약물의 향상된 표적 전달 가능성을 시사하였다 [17].

또다른 사례에서 베타글루칸 나노입자는 타겟 세포로 유전물질인 siRNA를 전달하기 위해 Lee 등에 의해 제조되었다. 베타 글루칸 분자는 유전자 전달 시스템을 구축하기 위해 siRNA와 직경이 300-400 nm인 나노입자로 자가조립되었다. siRNA 전달을 위해 제조된 GluNP는 리포펙타민(lipofectamine)에 버금가는 효능으로 유전자 전달 성능이 우수한 것으로 나타났다. 또한 siRNA를 담지한 GluNP가 인공 피부 조직 표면에 침투할 수 있는지 여부를 평가하였을 때 그 효능이 우수하였다 [18].

렌티난(Lentinan, LNT)은 나선형의 구조를 갖는 베타 글루칸으로 선형의 다섯 개의 1,3- β -글리코시드 결합 마다 두 개의 1,6- β 가지를 갖고, 물에 대한 용해도가 높다. CpG ODN과 poly(dA) 사이의 공유 결합을 활용한 기존의 CpG/SPG

복합체와는 달리 CpG/LNT 전달 시스템에서는 가역적인 이황화결합이 활용된 사례가 있다. 이 같은 시스템에서는 치료용 ODN의 방출이 환원성의 중양 미세 환경에서 정교하게 조절이 가능하기 때문에 더욱 뛰어난 유전자 전달 효율로 이어졌다 [19]. Liu 등의 연구진은 LNT를 유전자 치료제를 운반하는 캐리어로 사용하였으며, Jia 등의 연구진은 금속 나노입자의 전달 효율을 높이기 위한 목적으로 LNT를 사용하였다 [20].

2.1.1 베타 글루칸의 면역 조절(immunomodulation) 효과

베타 글루칸의 면역 조절 효과는 분자량의 영향을 받으며, 일반적으로 5,000–10,000 MW 이하의 작은 분자량을 갖는 경우 면역 활성화에 기여하지 못하는 것으로 알려져 있다 [21]. Brown과 Gordon에 의하면 지모산(zymosan)과 같이 높은 분자량을 갖는 베타 글루칸에 의해서 면역 세포가 활성화되며, 식세포성, 세포독성, 항미생물의 특성을 갖게 되지만, 낮은 분자량을 갖는 베타 글루칸은 이와 동등한 특성을 나타내기 위해서 사이토카인 등의 도움이 필요하다 [22]. 그리폴라(*Grifola frandosa*)로부터 분리된 β -1,3 구조를 갖는 베타 글루칸은 다양한 분자량을 가졌으며, 가장 높은 분자량을 갖는 것부터 강한 면역 원성을 보였다 [23]. 단백질이 결합된 형태의 다당류인 polysaccharide-K (PSK)를 활용한 연구에서도 200 kDa 이상의 PSK에서 가장 강력한 면역 조절 효과가 나타났다 [24].

베타 글루칸의 구조 복잡도가 높을수록 면역 조절 및 항암 효과가 더 강해진다고 보고된 바 있다. 그리폴라 베타 글루칸에 의해 유도된 TNF- α 분비에 관한 연구에서 분자량이 높은 (450

kDa 이상) 베타 글루칸은 분자량이 낮은 (450 kDa 이하) 글루칸보다 더욱 강력한 효과를 보였다 [25]. Ishibashi 외 연구진들은 열처리된 그리폴란이 분자량뿐만 아니라 TNF- α 의 분비 또한 감소된 경향을 보이는 것을 확인하였다 [26]. 베타 글루칸은 다양한 이차 구조를 형성할 수 있으며, 다양한 구조를 갖는 특성은 면역 조절 효과가 나타나는 것에 대한 설명이 될 수 있다 [27].

선형의 β -1,3-글리코시드 결합과 β -1,6의 가지 구조를 갖는 이스트(yeast) 유래 베타 글루칸은 병원체 관련 분자 패턴(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)로써 갖는 면역 조절(immunomodulatory) 활성화에 관해서 가장 많이 연구된 베타 글루칸 종류이다 [28]. 이 과정에서 β -1,3 글루칸은 대식세포, 수지상 세포 및 다른 식세포 표면에 많이 발현되는 Dectin-1 및 톨 유사 수용체(toll-like receptor)에 특이적인 결합을 보였으며, dectin-1 매개의 세포 내 이입을 통해 대식세포 내로 쉽게 유입되었다. Matthew 등은 효모 유래 베타 글루칸 입자(yeast-derived β -glucan particles, YGP)의 항암 효능을 입증하였으며, 이는 후천성 면역과는 무관하며 염증성 단핵구(monocyte)가 관여하는 것으로 알려졌다. YGP에 의해 활성화된 단핵구는 *in vitro* 상에서 암세포에 대해 직접 세포 독성을 매개하였으며, YGP의 전신적인 투여에 있어서도 폐조직에서 TNF- α , M-CSF, CCL2 등을 포함한 염증 매개 물질이 과발현되었다 [29].

수용성 및 입자형 베타 글루칸의 생물학적 효능에 관해서는 상반된 연구 사례가 있어 왔다. 최근 입자형의 베타글루칸이 수용성

베타 글루칸보다 강한 면역 자극 활동을 보인다는 사실이 밝혀졌다. 수용성 및 입자형 베타 글루칸을 비교한 해당 논문에서는 골수 유래 대식세포 (bone marrow-derived macrophage)와 수지상세포와 같은 선천성 면역세포에서 TNF- α , IL-6, 활성산소종(ROS)의 유도 와 식세포 작용 등은 whole glucan particle(WGP)이나 지모산(zymosan)과 같은 입자형 베타 글루칸이 더욱 월등하며, dectin-1 수용체에 의존하여 면역 반응을 활성화할 수 있었다. Qi 등은 쥐에서 경구 투여된 효모 유래의 입자형 베타 글루칸이 C-type lectin (CTL) 수용체인 dectin-1의 자극을 통해 수지상세포(DC) 및 대식세포를 활성화하였다고 보고했다. 그들은 또한 수용성 베타 글루칸이 DC와 대식세포에 결합하지만 활성화시키지는 않았다고 보고했다 [30]. 이 외에도, *Saccharomyces cerevisiae*에서 유래한 β -1,3-glucan 입자는 담지한 항원을 쥐로 전달하였을 때 강한 체액 및 세포 면역 반응을 유도하는 것으로 보고되어 백신 전달 도구로서의 가능한 효용성을 입증하였다 [31].

상반되게 수용성의 베타 글루칸의 면역 원성에 대한 보고들이 있다. Fang 외 연구진은 그리폴라(*Grifola frondose*)의 수용성 베타 글루칸이 분자량 300 kDa로 TNF- α 와 IL-6 생성, 복막 대식세포(peritoneal macrophage)에서 Syk와 NF- κ B 신호 활성화, 생쥐에서 sarcoma-180의 성장 억제 등을 강하게 유발한 것을 발견하였다 [32]. Masuda 외 연구진 역시 그리폴라에서 얻은 고도로 정제된 수용성의 β -(1,3), (1,6) 글루칸이 dectin-1과 독립적인 경로로 ERK와 p38 MAPK 활성화를 통해 GM-CSF의 생성을 빠르게 유도하는 것을 발견하였다. 이후, 베타 글루칸은

GM-CSF 과발현을 통한 대식세포의 증식과 dectin-1 발현에 관여하였고, 이는 Syk 경로를 통한 dectin-1 매개의 TNF- α 유도로 이어졌다 [33].

2.1.2 베타 글루칸을 활용한 대식세포 표적 전달 시스템

베타 글루칸은 글루코스가 1,3-, 1,4- 또는 1,6- β -글리코시드 결합으로 연결된 고분자로서, 박테리아나 균계 세포벽에서 발견이 되기 때문에 면역 세포에 그에 대한 수용체가 존재한다. Dectin-1은 폐포 대식세포(alveolar macrophage) 등에서 발견되는 43 kDa의 분자량을 갖는 제2형 막관통 단백질 수용체 (type 2 transmembrane protein receptor)로, 단일의 세포질의 면역수용체 타이로신 기반 활성 모티프 (ITAM)를 가지고 있어 β -1,3-D-glucan과 상호작용한다. 이를 활용한 대식세포 표적 전달 시스템을 통해 선천성 면역반응(innate immune response)와 후천성 면역반응(adaptive immune response)이 활성화된다 [34].

Noriko 등의 연구진은 시조필란 (schizophyllan, SPG)와 같은 β -1,3-D-glucan을 통해 CpG ODN과 수소 결합 및 소수성 결합을 통해서 복합체를 형성했으며, 항원제시세포(antigen presenting cell, APC)에 대한 표적화 효과를 확인하였다. 세포 투과의 주된 경로는 dectin-1을 통한 것으로 밝혀졌으며, CpG-ODN/SPG 복합체는 원숭이에 인플루엔자 백신의 면역 보조제로 투여했을 때 높은 항체 형성 반응을 보였다 [35].

Minari 등은 시조필란과 CpG 올리고뉴클레오티드 사이의 복합체를 제조하고, 이 복합체를 티오글리콜산(thioglycolate)

전처리를 통해 dectin-1 수용체가 발현된 복막 대식세포(peritoneal macrophage)에 처리하였다. 유세포 분석법과 현미경을 통한 관측에서 SPG/CpG DNA 복합체는 dectin-1 수용체를 매개로하는 세포 내 이입을 통해 대식세포에 전달되었다. 또한 ELISA를 통해 SPG 대 CpG DNA의 비율이 증가함에 따라 IL-12 발현이 S상으로 증가하였으며, SPG가 최대인 조성에서 사이토카인의 발현이 최대치에 도달하는 것을 확인하였다 [36].

지모산(Zymosan)은 베타 글루칸이 풍부하고 효모에서 유래한 입자로, 이 지모산과 베타 글루칸을 포함하는 균류인 *C. albicans*와 *P. carinii*는 dectin-1 베타 글루칸 수용체에 결합하여 식세포증 및 염증성 사이토카인의 생성을 유발하는 것으로 알려져 있다 [37]. Chad Steele 등의 연구진은 *A. fumigatus*가 갖는 베타 글루칸 성분의 세포벽으로 인해 대식세포와 상호작용이 가능한지를 실험하였다. 폐포 대식세포의 dectin-1 수용체가 *A. fumigatus*의 노출된 베타 글루칸 부분과 결합하는 과정에서 염증성 사이토카인 및 케모카인이 잠재적으로 유도되었으며, 호중구의 염증 부위로의 모집에 관여하였다 [38]. 이러한 결과로부터 지모산과 그와 유사한 구조의 베타 글루칸이 dectin-1 수용체에 대한 리간드로 작용할 수 있음이 밝혀졌다.

2.2 면역 보조제 (immune adjuvant)로서의 CpG ODN의 활용

합성 CpG ODN은 세균 및 바이러스 DNA에서 일반적인 올리고뉴클레오티드 서열을 모방하며, pDC를 매개로 IFN- α 의 생성을 유도하고, 직접적인 항바이러스 효과와 후천 면역성 항바이러스 면

역 반응을 촉진하는 강력한 TLR9 작용제(agonist)이다 [39].

CpG ODN의 작용은 대체로 염기서열과 구조에 의존한다. HIV-1⁻ 개체에서 클래스 A CpG ODN은 pDC를 자극하여 많은 양의 IFN- α 를 생성하고, 항원제시세포의 성숙을 유도하며, 간접적으로 자연살상세포(NK cell)를 활성화한다 [40]. 클래스 B CpG-ODN은 B 세포와 NK 세포를 활성화하지만 IFN- α 분비를 거의 자극하지 않는다 [41]. 클래스 C CpG-ODN은 pDC 매개로 IFN- α 생성, APC 활성화 및 성숙, 간접적으로 NK 세포 활성화, 직접적으로 B 세포 자극을 유도함으로써 클래스 A와 B CpG-ODN의 특성을 모두 갖는다 [42].

2.2.1 CpG ODN에 의한 면역 반응의 분자적 메커니즘

면역 보조제(immune adjuvant)란 항원 반응을 강화시킬 수 있는 분자, 화합물 또는 거대분자 복합체를 총칭한다. 면역 보조제는 병원체 연관 분자유형(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)의 면역 원성(immunogenicity)를 증진시키기 위해 사용된다. 아단위 백신(subunit vaccine)은 순수하게 분리된 항원만을 포함하므로 안전하지만, 면역 보조제 없이는 낮은 면역 원성을 나타내며, 효과적인 면역 반응을 유도하지 못한다. 면역 보조제의 역할은 따라서 백신이 높은 수준으로 장기간 항원에 특이적인 면역력을 이끌어 낼 수 있도록 하는 것이다 [43].

톨 유사 수용체(toll-like receptor, TLR)는 면역 보조제의 일종인 CpG ODN을 인식하는 과정에서 중요한 역할을 수행한다. 아키라 외 연구진은 생쥐의 TLR9이 면역 세포에 의한 CpG 모티프의 인식에 역할을 하는 것을 확인했다 [44]. B세포와 골수

수지상세포(plasmacytoid dendritic cells, pDC)는 TLR9을 발현하는 지배적인 인간 면역 세포 유형이다. 다케시타 외 연구진에 따르면 hTLR9 수용체는 CpG 반응에 의해 발현되는 인간 면역 세포 표면의 수용체이며, hTLR9 유전자의 전달은 평소 반응하지 않는 세포가 CpG에 대해서 반응하도록 하였다. hTLR9은 CpG의 세포 내 이입을 도왔으나, 대조군으로 사용된 ODN의 세포 내 이입은 낮은 수준이었다. 일부 세포에서는 TLR9과 CpG ODN이 함께 위치하는 것이 발견되었다 [45]. TLR9과 CpG ODN의 상호작용은 세포의 부풀어오름과 산성화, 활성 산소종의 생성을 유발하였으며, 이런 일련의 작용은 CpG가 매개하는 신호 전달 과정에서 중요하였다. 엔도솜의 성숙과 산성화를 방해하는 클로로퀸 등을 처리했을 때 면역 활성화가 나타나지 않았다 [46]. TLR9과 MyD88이 상호작용하면 IL-1 수용체 관련 키네이스 4(IRAK4)를 모집하여 TNF 수용체 관련 인자 6(TRAF6)를 활성화한다. TRAF6는 성장 인자- β 관련 키네이스-1 결합 단백질 1 및 2(TAB-1, TAB-2)의 변환과 관련 있으며, NF- κ B를 포함한 여러 전사인자의 활성화로 다양한 사이토카인 및 케모카인의 발현량을 증가시켰다 [47].

2.2.2 나노 입자를 활용한 CpG ODN의 전달 시스템

최근 나노 입자(NP)를 이용한 CpG ODN의 전달 시스템에 대한 연구가 수행되고 있다. NP 기반 CpG ODN 전달의 장점은 (1) DNase로부터 CpG ODN을 보호할 수 있고, (2) CpG ODN을 장기간에 걸쳐 체내에 보유할 수 있으며, (3) CpG ODN의 세포 내 이입 효율을 향상시킬 수 있으며, (4) 표적이 되는 조직으로의

전달이 가능하다. CpG ODN의 표적은 면역 세포의 엔도리소좀 내의 수용체이므로, CpG ODN의 전달 시스템은 안티센스 DNA나 siRNA와 같은 핵산 약물과는 다른 특성을 지닌다 [48].

CpG ODN이 NP에 흡착된 상태에서 유리된 CpG 보다 TLR9 활성이 더 높은 이유 중 하나는 CpG의 세포 내 이입 효율이 향상되기 때문이다. 배양된 239XL-TLR9 세포에 유리된 CpG를 형광 라벨링하여 전달했을 때 세포 내부에서 형광이 관찰되지 않은 것과 대조적으로, 메조기공을 갖는 실리카 나노입자와 질화 붕소 나노입자에 흡착된 CpG를 전달했을 때 강한 형광이 관찰되었다 [49]. Pan 외 연구진은 CG 염기서열을 갖는 18mer의 안티센스 ODN을 사용하여 Bcl-2 유전자 발현 조절을 시도하였고, 89 ± 45 nm 크기의 $3-\beta$ -[N,N-(dimethylaminoethane)carbamoyl] cholesterol (DC-Chol)을 포함하는 지질 나노 입자를 통해 전달했을 때 24시간이 경과하여도 혈장 내에서 25%의 ODN이 남아 있는 것을 확인하였다 [50]. Chen 외 연구진은 CpG를 흡착시키기 위해 폴리스티렌 나노 입자를 폴리에틸렌이민, 키토산, 폴리(2-디메틸-아미노)에틸 메타크릴레이트, 폴리(L-라이신)의 네 가지의 양이온성 고분자로 표면 개질하였다. 그 결과, 폴리(L-라이신)을 활용했을 때 가장 적은 양의 나노 입자가 엔도리소좀을 탈출하였다 [51]. 이는 양이온성 고분자의 종류에 따라서 엔도좀 내부에 나노 입자가 머무르는 시간이 달라지기 때문이다. Zhi 외 연구진은 293XL-TLR9 세포에 질화 붕소 나노입자를 전달하였고, 24시간이 경과하여서도 리소좀에 머물렀으며, 세포 분열 이후에도 남아 있는 것이 확인되었다 [52].

Sokolova 외 연구진은 CpG ODN이 인산 칼슘에 흡착되도록

하는 다중 셸 NP를 준비했다. 다중 셸 구조를 사용하여 CpG를 DNase로부터 보호할 수 있다. 동시에 인산 칼슘은 리소솜 내부의 산성 환경에서 점차 용해되기 때문에 CpG의 느린 방출이 관찰되었다 [53]. Zhu 등은 CpG의 효소에 의한 지속 가능한 방출에 대해 보고했다. 자연적인 CpG는 적층 표면을 가진 메조기공을 갖는 실리카 나노 입자에 의해 흡착되며, 표면을 폴리(L-라이신)으로 코팅하였다. CpG와 폴리(L-라이신)의 흡착을 반복함으로써 층별 흡착(layer-by-layer adsorption)을 형성할 수 있었다. 폴리(L-라이신)이 노출된 NP 표면을 α -키모트립신으로 용해시켰을 때 CpG가 NP에 적재된 저분자량의 화합물과 함께 서서히 방출되었다 [54]. Demento 외 연구진은 아비딘-팔미테이트(avidin-palmitate)로 개질된 PLGA 나노 입자의 표면에 바이오티닐화(biotinylated) CpG를 부착함으로써 나노 입자로부터의 CpG의 방출 속도를 제어하였다. 이때 일반적으로 마우스 당 100 μ g의 CpG ODN이 투여되지만, 나노 입자에 부착했을 때 0.5 μ g의 투여로 효과가 관찰되었다 [55].

제 3 장 재료 및 방법

3.1 재료

보리 베타글루칸 (beta glucan from barley, β -glucan, ~ 95%)은 Megazyme (Ireland)에서 구입하였고, 과요오드산나트륨 (NaIO_4)은 Alfa Aesar (U.S.A.), 수소화붕소나트륨 (NaBH_4)은 Junsei (Japan), 질산 은 (AgNO_3)은 Sigma-Aldrich (U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), penicillin/streptomycin, fetal bovine serum (FBS), dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS), 0.25% trypsin-EDTA, YOYO-1 iodide는 Invitrogen (U.S.A.)에서 구입하였다. Dimethylsulfoxide (DMSO), methanol, ethanol은 Merck (Germany)에서 구입하였고, 산화중수소 (D_2O)는 Cambridge Isotope Laboratories (U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. HPLC grade water는 Duksan (Korea)에서 구입하였고, sodium azide는 Sigma-Aldrich (U.S.A.)에서 구입하였다.

PrimeScriptTM RT Reagent kit, TB Green[®] Premix Ex TaqTM II는 TaKaRa (Japan)에서 구입하였다. Nucleospin RNA extraction kit와 Nucleospin DNA extraction kit는 Macherey Nagel (Germany)에서 구입하였다.

CpG ODN 1826, 5' -TCCATGACGTTTCCTGACGTT-3' 은 nuclease에 대한 저항성을 가지는 phosphorothioate backbone으로 모두 치환된 것을 사용하였으며, 최종적으로

실험에는 3' 쪽에 12개의 cytosine을 추가로 갖는 아래 CpG-dC₁₂ 형태를 사용하였다 (Bioneer, Korea).

Table 1. Sequence of CpG-dC₁₂ oligonucleotide

Name	Sequence (5'->3')
CpG-dC ₁₂	5'-T*C*C*A*T*G*A*C*G*T*T*C*C*T*G*A*C*G*T*TCCCCCCCCCCCC-3'

*phosphorothioate

3.2 실험 방법

3.2.1 산화 베타글루칸 (Ox- β -glucan)의 합성

Ox- β -glucan의 합성을 위해 먼저 β -glucan을 1 mg/mL의 농도로 80°C oil bath에 30분간 두어 물에 완전히 분산시켰다. 이후 베타 글루칸의 산화 반응을 위해 각각 베타 글루칸 단위 글루코스 대비 각각 0.5배, 1배, 2배 당량에 해당하는 양의 과요오드산나트륨(NaIO₄)이 녹아있는 수용액을 넣어 18°C에서 24시간 동안 반응을 시켰다. 과요오드산나트륨을 넣어준 양에 따라 각각 OXBG 0.5X, 1X, 2X로 명명하였다. 이후 MWCO 6-8 kDa의 투석막에서 3일간 투석하여 정제하였고, 동결건조를 거쳐 산화된 베타글루칸(OXBG)을 얻었다.

3.2.1.1 ¹H NMR과 FT-IR을 이용한 구조분석

베타 글루칸의 산화 반응에는 베타 글루칸의 단위 글루코스 대비 1배 당량에 해당하는 양의 과요오드산나트륨(NaIO₄)을 사용하였다. OXBG의 구조는 양성자 핵자기공명분광기(¹H NMR)를 이용해 확인하였다. 용매는 D₂O(Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)를 사용하였으며, 600 MHz AVANCE 600(Bruker, Germany)을 이용하여 분석하였다.

베타 글루칸의 산화 반응에는 베타 글루칸의 단위 글루코스 대비 1배 당량에 해당하는 양의 과요오드산나트륨(NaIO₄)을 사용하였다. OXBG의 구조 분석은 푸리에변환-적외선 분광 분석기(Fourier Transform Infrared Spectrometry; FT-IR)을 이용하여 분석하였다. 기기는 ATR(Attenuated Total Reflectance) FT-IR

(Nicolet 6700, Thermo Scientific, USA)를 이용하였다. 4000–600 cm^{-1} 의 파장 대에서 32번 반복 및 8 cm^{-1} 의 파장간격으로 측정하였다.

3.2.1.2 OXBG의 분자량 및 산화도의 측정

합성된 고분자의 분자량은 gel permeation chromatography (GPC)를 이용하여 측정하였다. 표준물질로는 pullulan을 사용하였으며, sodium azide 0.1M을 용매로 10 mg/mL의 샘플을 제조하였다. Thermo Dionex HPLC Ultimate 3000 RI System(Thermo Scientific, U.S.A) 기기를 이용하여 sodium azide 0.1 M의 용리액(eluent)으로 분자량을 측정하였으며, 유속은 1 mL/min이었다. 모든 분자량의 측정은 서울대학교 농생명과학공동기기원(NICEM)에 의뢰하였다.

OXBG의 산화도 측정은 Amplite™ fluorimetric aldehyde quantitation kit를 활용하였다. 제조사의 메뉴얼을 따라 실험하였고, 사슬상의 알데하이드가 단분자 알데하이드에 비해 반응성이 떨어지는 것을 고려하여 반응시간을 제조사 메뉴얼의 30분에서 2시간으로 늘려 진행하였다. Oxidation degree(%)의 계산은 anhydroglucose unit (AGU)의 이웃한 알코올 기(vicinal alcohol)가 모두 산화되었을 때 OXBG 1 g 당 알데하이드 몰수인 17.6 mmole 대비 측정된 몰수의 비율로 계산하였으며, true oxidation degree(%)의 경우 베타글루칸의 1,4- β -글리코시드 결합을 이루는 anhydroglucose unit (AGU)이 산화 반응에 참여한다는 것을 고려하여 1,3- β -글리코시드 결합과 1,4- β -

글리코시드 결합의 비율인 3:7을 반영하여 계산하였다.

3.2.2 나노입자의 합성

나노입자의 합성은 Ag 이온의 환원과 CpG의 흡착(loading), 그리고 베타 글루칸의 결합(conjugation)의 두 단계로 진행되었다. 먼저 50 μ M 농도의 Ag 이온은 동일한 농도의 수소화붕소나트륨(sodium borohydride)과 상온에서 호모게나이저를 이용하여 6500 rpm에서 3분동안 교반하여 반응시켰고, 환원된 상태로 만들었다. 이후 10분간 얼음 위에서 안정화를 거친 후, CpG ODN을 넣어주었다. CpG ODN을 넣기 전의 나노입자는 Ag NP로 명명하였다. 이 때 Ag와 CpG의 몰 비는 6:1로 맞춰주었고, 상온에서 호모게나이저를 이용하여 6500 rpm에서 3분간 교반하여 반응시킨 후, 10분간 얼음 위에서 안정화하였다. 이후 초순수 증류수(deionized water)에서 MWCO 12-14 kDa 투석막을 이용하여 6시간동안 정제를 거쳐 얻은 나노입자를 CpG-Ag NP로 명명하였다. CpG 흡착의 메커니즘은 Figure 2A에 표현하였다.

다음으로 CpG와 산화 베타글루칸 사이에 이민 결합 형성을 통한 베타 글루칸의 결합을 위해서 CpG (30 μ g/mL)와 OXBG (1.67 mg/mL)을 18°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. (Table 2) 이후 초순수 증류수에서 MWCO 12-14 kDa 투석막을 이용하여 6시간 투석하여 β G-CpG-Ag NP 나노입자를 얻었다. 이때 OXBG 0.5X를 사용한 것은 β G_{0.5X}-CpG-Ag NP로, OXBG 1X를 사용한 것은 β G_{1X}-CpG-Ag NP으로 명명하였다. (Figure 2)

Table 2. Final concentration, functional group, and molar ratio of amine to aldehyde of reactants

Reactant	Final Concentration	Amine or aldehyde	Molar ratio of amine to aldehyde
CpG	30 µg/mL	66 nmole/mL	-
OXBG 0.5X	1.67 mg/mL	1.787 µmole/mL	1:27
OXBG 1X	1.67 mg/mL	3.991 µmole/mL	1:60

3.2.2.1 DLS를 이용한 나노입자의 평균 입자 크기 및 표면 전하 측정

Zeta-sizer Nano ZS(Malvern Instruments, UK)를 이용하여 Ag NP, CpG-Ag NP 및 βG-CpG-Ag NP 나노입자의 평균 입자 크기 및 표면 전하를 측정하였다. 입자의 크기 분포는 number와 intensity 두가지 분포를 참고하였다. 실험은 3배수로 진행하여 평균 직경(mean diameter)과 제타 전위(zeta potential)의 평균값과 표준편차를 구하였다.

3.2.2.2 TEM-EDS를 이용한 입자 형태 확인 및 원소 조성의 확인

전계방사 투과전자현미경 (Field Emission Transmission Electron Microscope, FE-TEM, JEM-F200, JEOL Ltd, Japan)을 이용하여 CpG-Ag NP 및 βG-CpG-Ag NP 나노입자의 입자 형태를 관찰하였다. 나노입자의 제조는 3.2.2의 방식을

따랐으며, 이후 나노입자를 TEM 구리 격자판(grid) 위에 10 μ L씩 올려 완전히 건조시킨 후 별도의 염색 과정 없이 시료를 제작하였다. 시료의 관찰은 200 kV의 가속 전압(accelerating voltage) 조건에서 이루어졌다.

EDS 분석은 JEOL Dual SDD Type (Φ : 100 mm², Solid angle: 1.7 sr)을 통해 이루어졌다.

3.2.2.3 DLS를 이용한 표면 개질에 따른 안정성(colloidal stability) 확인

3.2.2의 방식으로 제조한 나노입자(Ag NP, CpG-Ag NP, β G-CpG-Ag NP)을 각각 초순수 증류수(deionized water)와 serum-free DMEM 두가지 미디어 상에서 37°C 조건으로 0시간, 2시간, 4시간동안 배양하였다. 이후 Zeta-sizer Nano ZS(Malvern Instruments, UK)를 이용하여 시간대별의 나노입자의 입자 크기를 측정하였다. 보다 장시간의 안정성을 확인할 때는 이들 간의 크기 변화를 보았다. 입자의 크기 분포는 number 분포를 참조하였다.

3.2.2.4 Nanosight(NTA)를 이용한 나노파티클의 입자 크기 분포 측정

640-nm laser가 구비된 Nanoparticle Tracking Analyzer(Nanosight LM10; Malvern Panalytical)을 이용하여 CpG-Ag NP 및 β G-CpG-Ag NP의 입자의 크기 분포 및 입자 밀도를 측정하였다.

3.2.2.5 산화 베타글루칸(OXBG)의 결합에 따른 이민 결합 생성의 확인

산화 베타글루칸과 CpG 사이에 반응 조건이 충분히 이민 결합 생성을 할 수 있는 조건인지 확인하기 위해서 CpG-Ag NP에 OXBG를 결합하는 조건과 동일한 조건에서 CpG와 OXBG를 반응하여 FT-IR을 통해 이민 결합이 생성되었는지 확인하였다. CpG 10 μ M 1 mL을 교반하면서 각각 OXBG 0.5X와 OXBG 1X를 초순수 증류수 1 mL에 녹인 것을 1 mL 시린지 팁을 이용하여 넣어주었다. OXBG 0.5X를 기준으로 아민 대 알데하이드의 몰 비는 1:2에 해당한다. 구조 분석은 푸리에변환-적외선 분광 분석기 (Fourier Transform Infrared Spectrometry; FT-IR)을 이용하여 분석하였다. 기기는 ATR(Attenuated Total Reflectance) FT-IR (Nicolet 6700, Thermo Scientific, USA)를 이용하였다. 4000-600 cm^{-1} 의 파장 대에서 32번 반복 및 8 cm^{-1} 의 파장간격으로 측정하였다.

동결건조한 입자 역시 동일한 조건에서 측정하였다.

3.2.2.6 나노입자의 CpG 흡착 효율 (loading efficiency)의 확인

3.2.2에서 제조한 나노입자를 Amicon® Ultra Centrifugal Filter (MWCO 100 kDa)를 이용하여 4000 rpm, 2 min 조건으로 필터시켜 흡착되지 않은 CpG를 분리시켰다. 1회 elution 후에 빠져나간 만큼 초순수 증류수를 더 넣어주어 3회까지 반복하여 대부분의 CpG를 분리해냈다. Filtrate의 흡광도를 270 nm에서 측정함으로써 CpG의 농도를 구하였다. CpG의 검량선은 270

nm에서 CpG의 흡광도를 microplate reader (Synergy H1, BioTek, U.S.A)로 측정하여 그릴 수 있었다. 일반적으로 DNA의 최대 흡광 파장은 260 nm이지만, 해당 CpG 샘플의 경우에는 270 nm에서 최대 흡광 파장을 나타냈기 때문에 270 nm에서 검량선을 그리게 되었고, R^2 값이 0.9998로서 사용하게 되었다. CpG 샘플이 270 nm에서 최대 흡광 파장을 나타내는 이유로는 용액 상에 함께 존재하는 Ag 이온과의 상호작용의 영향이 있을 것으로 생각된다 [56]. CpG 흡착 효율 (loading efficiency)은 Loading efficiency (%) = $(T-C)/T \times 100$ (T: total CpG, C: amount of free CpG)의 식을 사용하여 계산하였다.

3.2.2.7 아가로스 젤 전기영동을 통한 나노입자의 환원성 환경에서의 CpG 방출 능력의 확인

Ag-S 상호작용 및 강한 반데르발스 힘에 의해서 CpG가 Ag NP에 흡착된 것을 확인하기 위해 아가로오스 젤 전기영동을 진행하였다. ssDNA의 염색을 위해 아가로오스 젤 (2% w/v)에 ethidium bromide를 최종 농도 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 이 되도록 넣었고, 아가로오스 젤은 Tris-Acetate-EDTA (TAE) buffer 상에서 제조하였다. EtBr은 보통 dsDNA의 염색에 사용되는 염료이지만, 일부 선행 연구에서 CpG와 같은 ssDNA가 분자내 인력에 의해서 이중 나선구조를 형성함에 따라 EtBr과 상호작용이 가능하여 염색에 사용한 사례가 있어 해당 실험에서도 CpG의 염색에 EtBr을 사용할 수 있었다 [57].

3.2.2의 방식으로 제조한 나노입자(CpG-Ag NP, $\beta\text{G}_{0.5\text{X}}$ -CpG-Ag NP)은 1.5 μM 과 0.75 μM CpG의 농도로 희석한 10

μL 와 초순수 증류수 또는 DTT 30 mM 2 μL 와 30분간 37°C에서 배양하여 젤에 로딩해주었다. 전기영동장치는 Mupid-2plus® (OPTIMA, Japan)를 사용하였고, 80 V에서 15분동안 진행하였다. 전기영동이 완료된 다음 CpG 밴드의 확인은 Gel Doc™ XRS+ gel documentation system (BIO-RAD, U.S.A.) 기기를 이용하였다.

3.2.3 세포실험

3.2.3.1 세포 배양

비대식세포주인 인간 자궁경부암세포(human cervical adenocarcinoma cells, HeLa)와 대식세포주인 마우스 백혈성 단핵구 대식세포계통세포(Mouse Leukemic monocyte-macrophage cells, RAW264.7) 두 종류의 세포주를 사용하였다. 세포의 배양은 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin을 함유한 배지에서 이루어졌으며, HeLa 세포는 DMEM+GlutaMAX™-1, RAW264.7 세포는 DMEM을 각각 배지로 사용하였다. 배양 과정 중에는 항상 37°C, 이산화탄소 5%의 조건을 유지하였다.

3.2.3.2 MTT assay를 이용한 세포 대사 활성 확인

나노입자(CpG-Ag NP, β G-CpG-Ag NP)가 세포 대사 활성에 끼치는 영향을 확인하기 위해 MTT assay를 진행하였다. RAW264.7 세포는 96-well cell culture plate에 1.5×10^4 cells/well의 밀도로, HeLa 세포는 1.0×10^4 cells/well의 밀도로 90 μL 씩 분주한 후 24시간 동안 배양하였다. Well당 70-80%의 밀도로 증식한 것을 확인한 후, 이튿날 배지를 제거하지 않고 well당 혈청이 포함된 배지 90 μL 에 최종 particle density($\times 10^7$

particles/mL)가 16.4, 8.20, 4.10, 2.05, 1.03, 0.512가 되도록 나노입자(Ag NP, CpG-Ag NP, β G_{0.5X}-CpG-Ag NP) 10 μ L씩을 처리하여 4시간동안 배양하였다. 다음날, 각 well에 2 mg/mL의 MTT/DPBS 용액을 각 well당 25 μ L씩 처리하여 추가로 2시간 배양하였고, 배지를 모두 제거한 후 형성된 formazan 결정을 well당 150 μ L의 DMSO로 녹여주었다. 세포의 대사 활성은 570 nm에서 Microplate reader (Synergy H1, BioTek, U.S.A)를 이용하여 흡광도를 측정함으로써 확인하였다. 상대적 세포 생존율(Relative cell viability, %)는 나노입자를 처리하지 않은 세포에서의 흡광도에 대한 처리한 세포에서의 상대적인 흡광도로 표현하였다. 실험은 3배수로 진행하였다.

3.2.3.3 유세포 분석법을 이용한 세포 투과율 확인

나노입자(CpG-Ag NP, β G-CpG-Ag NP)의 세포 투과율을 확인하기 위해 유세포 분석기를 이용하였다. RAW264.7 세포는 6-well cell culture plate에 3.0×10^5 cells/well의 밀도로, HeLa 세포는 2.5×10^5 cells/well의 밀도로 2 mL씩 분주한 후 24시간 동안 배양하여 well당 70-80%의 밀도로 증식시켰다. 이 때 CpG는 3.2.2의 방법으로 나노입자를 제조할 때 YOYO-1 iodide를 사용하여 300 base 당 1분자의 염료 분자가 들어가도록 먼저 30분간 표지시킨 뒤 사용하였다. 나노입자(CpG-Ag NP, β G_{0.5X}-CpG-Ag NP)는 well당 500 μ L을 처리하였는데, 이때 well당 1 μ g의 CpG가 처리되도록 희석하여 준비하였다. CpG 자체의 세포 투과율을 확인할 때는 1 μ g의 CpG를 YOYO-1 iodide를 사용하여 30분간 동일한 방법으로 표지시킨 것을 사용하였다. 배양된 세포는

배지를 제거하고 신선한 배지 1.5 mL, 준비한 나노입자 용액 500 μ L을 각 well에 4시간동안 처리하였다. 이때 신선한 배지는 혈청이 없는 조건의 것을 사용하였다. 4시간 배양 후 DPBS를 well당 1 mL씩 사용하여 세척하였고, well당 500 μ L씩의 트립신 처리를 한 후 2분간 배양하였다. 이후 RAW264.7 세포는 well당 1.5 mL의 FBS를 포함하는 DMEM으로, HeLa 세포는 well당 1.5 mL의 FBS를 포함하는 DMEM+GlutaMAXTM-1로 떼어주었다. 떼어낸 세포를 원심분리를 통해 가라앉힌 후 상등액을 제거하고, 세포 표면에 붙어있는 형광을 제거하기 위해 1 mL의 DPBS를 사용하여 워싱하는 과정을 2회 반복하였다. 마지막에는 300 μ L의 DPBS를 사용하여 세포를 분산시켜 시료를 준비하였다. BD Accuri C6 flow cytometer(Becton Dickinson Biosciences, U.S.A.)를 사용하여 well 당 1.0×10^4 개의 세포 내에 투과된 나노입자의 형광을 확인하였으며, BD Accuri C6 software로 세포 내 투과율을 분석하였다.

3.2.3.4 공초점 현미경을 이용한 세포내 이미징

나노입자(CpG-Ag NP, β G-CpG-Ag NP)의 세포 투과를 이미지로 확인하기 위해 공초점 현미경을 사용하였다. RAW264.7 세포는 5.0×10^4 cells/well HeLa 세포는 3.0×10^4 cells/well의 밀도로 공초점 현미경용 dish에 300 μ L씩 분주하여 배양하였다. 37° C에서 24시간 배양하여 70-80%의 밀도가 될 때까지 키운 후 샘플을 처리하였다. 이 때 CpG는 3.2.2의 방법으로 나노입자를 제조할 때 YOYO-1 iodide를 사용하여 300 base 당 1분자의 염료 분자가 들어가도록 먼저 30분간 표지시킨 뒤 사용하였다.

나노입자(CpG-Ag NP, β G_{0.5X}-CpG-Ag NP)는 well당 30 μ L을 처리하였는데, 이때 CpG의 최종농도가 100 nM이 처리되도록 희석하여 준비하였다. 샘플을 처리하기 전에 DPBS를 이용하여 세포를 1회 세척하였다. 이후 혈청이 없는 배지 270 μ L과 샘플 30 μ L을 처리해 주었다. 37° C에서 4시간동안 배양한 후, 혈청 없는 배지 5 mL에 Hoechst 33342 5 mg/mL stock solution을 5 μ L 넣어 최종 농도 5 μ g/mL의 staining 용액을 제조하여 well당 280 μ L씩 처리해주었다. 10분간 37° C incubator에서 염색한 후, 260 μ L의 혈청 없는 배지로 세포를 2회 세척하였다. 마지막으로 260 μ L의 혈청 없는 배지를 넣고 Confocal Laser Scanning Microscope (SP8 X STED, Leica, Germany)를 이용하여 측정하였고, LAS X software를 이용하여 이미지를 분석하였다.

3.2.3.5 세포 내 활성 산소종 (reactive oxygen species, ROS) 수준의 확인

나노입자에 의한 세포 내 ROS 수준이 RAW264.7 세포에서 확인되었다. 세포내 ROS 수준을 확인하는 방법은 Abcam 사의 DCFDA / H2DCFDA - Cellular ROS Assay Kit (ab113851)에 제공되는 매뉴얼을 따랐다. RAW264.7 세포는 96-well black plate에 3.0×10^4 cells/well의 밀도로 분주하였다. 24시간동안 배양하여 well당 70-80%의 밀도로 증식되었을 때, kit의 1X buffer를 사용하여 cell debris 등을 씻어주었다. 이후 1X buffer로 희석한 25 μ M의 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) 용액을 well당 100 μ L씩 처리하고 45분간 빛 없이 배양하였다. 다시 1X buffer로 워싱한 후, well당 180 μ L의

DPBS와 최종 particle density ($\times 10^7$ particles/mL)가 1.0이 되도록 나노입자(Ag NP, CpG-Ag NP, β G_{0.5X}-CpG-Ag NP) 20 μ L씩을 4시간, 8시간동안 처리해주었다. DCFDA가 산화된 형태인 DCF의 형광의 측정은 microplate reader (Synergy H1, BioTek)을 사용하여 이루어졌다 (excitation: 485 nm, emission: 535 nm). 최종적으로 세포 내 ROS 수준은 어떠한 것도 처리하지 않고 염색된 세포에 대한 relative DCF fluorescence intensity (RFI) 값으로 표현하였다. 대조군으로 TBHP 50 μ M을 처리한 세포와 비교하였다. 실험은 3배수로 진행되었다.

3.2.3.6 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)과 실시간 중합효소 연쇄반응 (Real Time-PCR, qPCR)을 이용한 대식세포 M1 분극화 효능의 확인

나노입자의 CpG ODN 전달 능력 및 *in vitro* 상에서의 대식세포의 M1 분극화 효능을 알아보기 위해서 RAW264.7 세포에 나노입자 (CpG-Ag NP, β G_{0.5X}-CpG-Ag NP)을 처리하고 M1 분극화 지표 및 M2 분극화 지표에 대한 mRNA의 양을 qPCR을 통해 정량하였다. 먼저 RAW264.7 세포를 6-well culture plate에 1.5×10^5 cells/well의 밀도로 분주하였다. 세포배양은 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin DMEM 배지를 사용하였다. 하루 뒤 혈청이 없는 신선한 배지로 교체해주고, 최종 CpG 농도가 100 nM이 되도록 나노입자 용액을 희석하여 처리해 주었다. 24 h 뒤 아래의 방법으로 유전자 발현 정도를 측정하여 M1 분극화 효능을 확인하였다.

RNA의 추출은 NucleoSpin RNA kit (Machery-Nagel,

Germany)를 이용하였으며, 제조사의 매뉴얼을 따랐다. DPBS로 세포를 2회 세척하고, DPBS가 있는 상태로 2분간 incubation 후 세포를 harvest 하였다. 추출한 mRNA의 양은 Take3 micro-volume plate (Synergy H1, BioTek, U.S.A)를 사용하여 측정하였다. 추출한 mRNA를 cDNA로 역전사하기 위해 TaKaRa, Japan의 PrimeScript RT reagent kit RT-PCR kit를 이용하였다. 실시간 중합효소 연쇄반응 과정에서 target mRNA의 정량 분석을 위해 cDNA와 보고자 하는 M1 또는 M2 marker의 프라이머, 그리고 SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa, Japan)의 mixture를 제조하였다. 프라이머는 Table 3에 나와있는 sequence를 사용하였다. (Bioneer, Korea) cDNA 샘플은 StepOne real-time PCR machine (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 95°C에서 30초동안 denaturation 과정을 거쳐 denaturation (95°C, 5초), annealing (55°C, 30초), polymerization (72°C, 30초)가 반복되는 PCR cycle을 40회 진행하였다. 하우스키핑 유전자인 GAPDH의 발현량을 기준으로 정규화하였고, 이때 $2^{-\Delta\Delta CT}$ method를 이용하였다.

Table 3. Primer sequence used in qPCR

Genes	Primer sequence (5'->3')	Ref.
GAPDH	F-TCA ACG GCA CAG TCA AGG	[58]
	R- ACT CCA CGA CAT ACT CAG C	
iNOS	F-TCC TAC ACC ACA CCA AAC	[59]
	F-TCC TAC ACC ACA CCA AAC	
COX2	F-CCT CTG CGA TGC TCT TCC	[59]
	R-TCA CAC TTA TAC TGG T	
Arg-1	F-AAC ACG GCA GTG GCT TTA ACC	[60]
	R-GGT TTT CAT GTG GCG CAT TC	
TGF-β	F-TGG TGG ACC GCA ACA ACG CC	[61]
	R-GGG GGT TCG GGC ACT GCT TC	

3.2.4 통계 검정

통계 검정이 필요한 모든 실험들은 3배수로 진행하였고, 평균값과 표준편차를 나타내었다. 통계검정은 one-way ANOVA와 Bonferroni post-hoc test를 통해 진행하였다. 통계적 유의성은 다음과 같이 표시하였다. (P<0.05 *, P<0.01 **, P<0.001 ***)

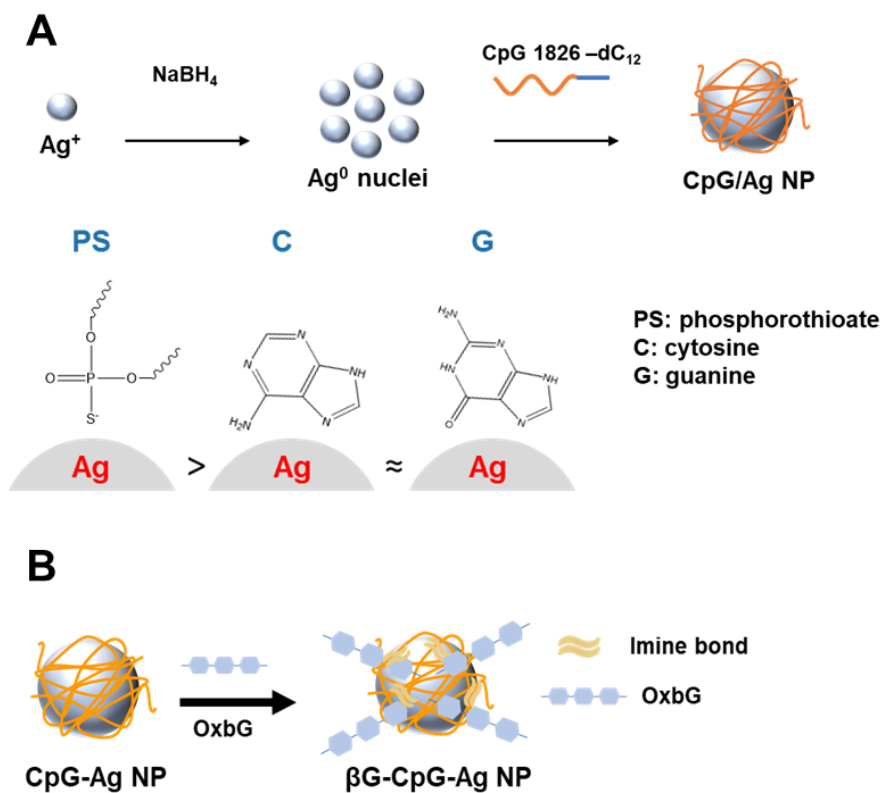


Figure 2. Formation of (A) CpG–Ag NP and (B) β G–CpG–Ag NP. CpG can interact with Ag via binding site of PS, C, and G.

제 4 장 결과 및 고찰

4.1 산화 베타글루칸의 합성 및 특성 분석

4.1.1 OXBG의 합성

베타글루칸을 80°C oil bath에 30분 이상 두어 물에 균질하게 용해시킨 후 베타글루칸의 단위 글루코스 대비 0.5배, 1배, 2배의 과요오드산나트륨(NaIO_4)을 베타글루칸과 반응시켰다. (Table 4) 과요오드산 이온은 다당류 내의 2번, 3번 탄소의 인접한 다이올과 반응하여 알데하이드를 형성하므로, 본 연구에서도 과요오드산 이온을 사용하여 베타글루칸의 2번과 3번 탄소 사이의 결합을 끊는 산화 반응 및 투석과 동결건조 과정을 거쳐 산화된 베타글루칸 (ox- β -glucan, OXBG)을 얻었다. (Figure 3)

4.1.2 ^1H NMR과 FT-IR을 활용한 OXBG의 구조 분석

세 가지 산화도로 합성된 OXBG는 구조의 확인은 양성자 핵자기공명분광기(^1H NMR)를 통해 이루어졌다. (Figure 4)

베타글루칸의 스펙트럼인 (A)를 살펴보면, 4.53 ppm 부근에서 글루코스 단위체의 1번 탄소가 갖는 β -1,4-글리코시드 결합에 대응하는 양성자 피크(proton peak)가 나타났다 [62]. β -1,3-글리코시드 결합을 갖는 1번 탄소에 대응하는 양성자 피크의 경우 4.78 ppm 부근에서 관찰되지만, 용매에 의한 양성자 피크와 겹쳐 정확한 피크 영역은 확인이 어렵다. 선행 연구에 따르면 보리 베타글루칸은 1,4-글리코시드 결합과 1,3-글리코시드 결합의 비율이 약 7:3이다 [63]. 산화된 베타글루칸의 스펙트럼인 (B)를

살펴보면, δ 9–11 ppm 부근에서 알데히드에 해당하는 피크가 검출되지 않았다. 하지만 이는 알데히드가 물에 의해서 수화된 상태인 아세탈 또는 헤미아세탈 상태로 존재한다는 선행 연구에 부합하는 결과이다 [64]. 또한 δ 4.8–5.7 ppm 구간에서 베타글루칸의 스펙트럼에서는 검출되지 않았던 아세탈 또는 헤미아세탈에 해당하는 피크가 검출되었으므로 이 또한 알데히드가 수화된 상태로 존재한다는 것을 뒷받침한다 [65].

베타글루칸의 산화에 따른 구조적 특성은 FT-IR을 통해 확인하고자 하였다. 다당류의 경우 1020 cm^{-1} 부근에서 알코올기의 C-O stretching 피크와 2860 cm^{-1} 부근에서 C-H stretching 피크, 그리고 3330 cm^{-1} 부근에서 O-H stretching 피크를 나타내는 특징적인 피크를 갖고 있다. Figure 5의 스펙트럼을 살펴보면, 분석한 두 가지 고분자에서 모두 이러한 특징적인 피크가 관찰되었다. 또한 두 고분자에서 공통적으로 1635 cm^{-1} 부근에서 카르보닐 그룹의 stretching 피크와 894 cm^{-1} 부근에서 헤미아세탈의 피크가 발생하였다 [66]. 베타글루칸의 카르보닐 피크는 베타글루칸의 추출 과정에서 제거되지 않은 단백질 등으로부터 유래한 것으로 생각된다.

베타글루칸과 OXBG 두 고분자의 스펙트럼을 비교하였을 때, $1740\text{--}1720\text{ cm}^{-1}$ 부근에서 알데히드기의 C=O stretching에 해당하는 피크가 나올 것으로 예상하였으나, $^1\text{H-NMR}$ 과 같은 이유로 알데히드기가 수화되어 아세탈 또는 헤미아세탈 상태로 존재하기 때문에 피크를 확인하기 어려웠다.

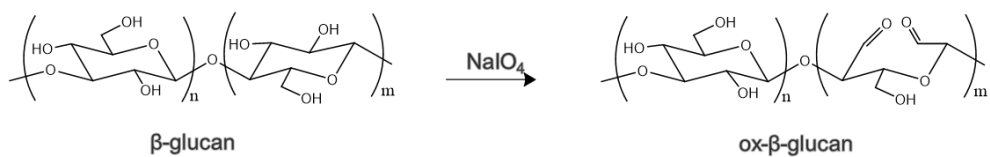


Figure 3. Oxidation of beta glucan.

Table 4. Calculated molar ratio of periodate to glucose unit and reacted amount of OXBG 0.5X, OXBG 1X, and OXBG 2X during periodate oxidation of beta glucan

	Molar ratio of periodate/ glucose unit	Beta glucan	Periodate
OXBG 0.5X	1:2	100 mg (1 mg/mL)	65.7 mg (21.9 mg/mL)
OXBG 1X	1:1	100 mg (1 mg/mL)	131.4 mg (43.8 mg/mL)
OXBG 2X	2:1	100 mg (1 mg/mL)	262.8 mg (87.6 mg/mL)

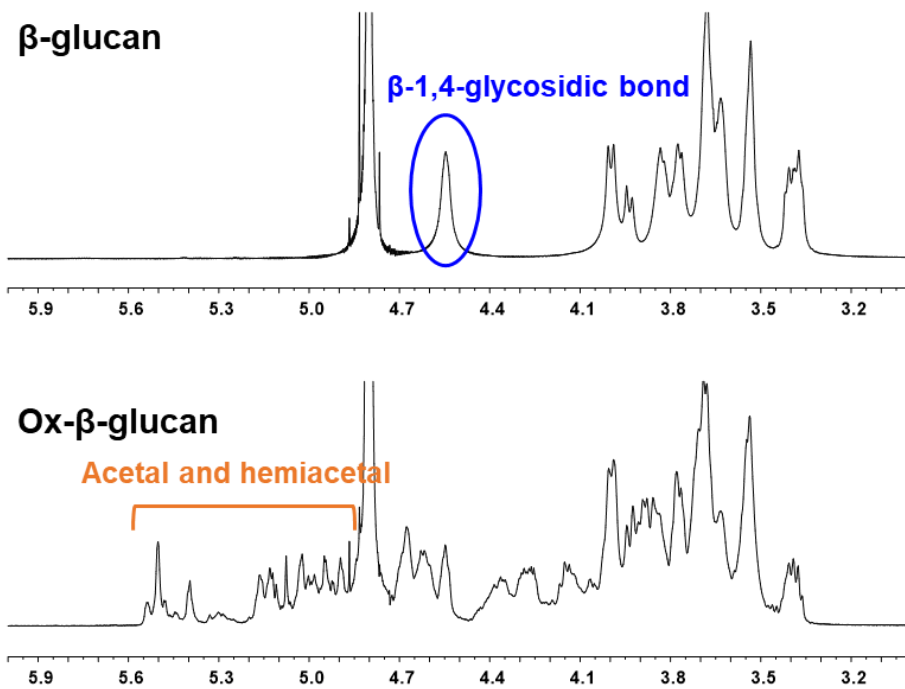


Figure 4. ^1H NMR spectra of (A) β -glucan and (B) Ox- β -glucan.

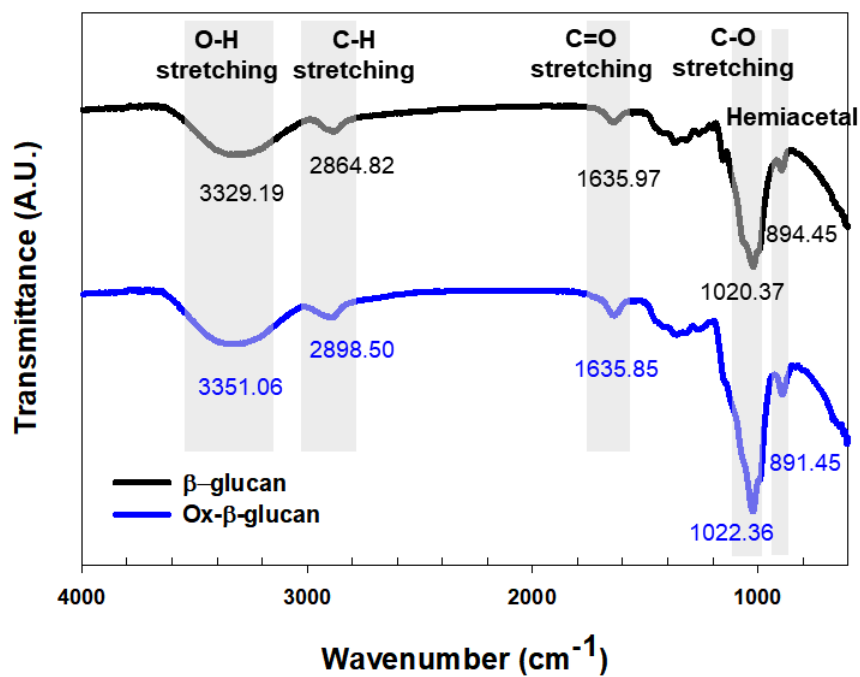


Figure 5. FT-IR spectra of beta glucan and ox- β -glucan.

4.1.3 OXBG의 분자량 및 산화도의 측정

다음으로 합성한 고분자의 분자량을 gel permeation chromatography (GPC)를 이용하여 확인하였다. Figure 6와 Table 5에서 알 수 있듯이 OXBG의 분자량은 그 산화 정도에 따라 음의 상관관계를 보였다. 베타글루칸의 분자량은 베타 글루칸의 반복단위 몰 수 대비 과요오드산나트륨을 넣어준 양에 따라 명명하는데로 0.5X의 경우 GPC로 확인한 수 평균 분자량은 4.2 kDa, 중량 평균 분자량은 22.9 kDa였으며, 1X의 경우 수 평균 분자량은 3.0 kDa, 중량 평균 분자량은 13.9 kDa, 가장 많은 양의 과요오드산나트륨과 반응한 2X의 경우 수 평균 분자량은 2.0 kDa, 중량 평균 분자량은 9.1 kDa로 나타나, 산화도가 클수록 작은 분자량을 갖는다는 가설을 세울 수 있었다.

실제로 산화도가 과요오드산나트륨을 넣어준 양에 비례하여 증가하는지 알아보기 위해서 Amplitude™ Fluorimetric Aldehyde Quantitation Kit를 활용하여 OXBG의 산화도를 측정하였다. 키트에 제공된 AldeLight™ Blue stock solution은 assay 직전에 working solution으로 활성화되었으며, 이는 OXBG의 알데히드기와 반응하여 형광물질(fluorophore)을 형성하였다. 반응이 끝난 직후 형성된 형광물질의 정량을 위해서 BioTek Synergy H1을 이용하여 형광 세기가 측정되었다. (ex. 365 nm, em. 435 nm) 알데히드기의 양에 따른 형광 세기는 키트에 제공된 알데히드 표준 물질을 사용하여 미리 검량선의 형태로 그려졌다. (Figure 7) 알데히드기는 형광물질과 1:1의 몰 비를 가지므로, OXBG 고분자 1g 당 알데히드기의 몰수가 계산되었다. (Table 6)

그 결과, OXBG 0.5X의 경우 1g 당 1.07 mmole, 1X의 경우 1g

당 2.39 mmole, 2X의 경우 1g 당 3.81 mmole의 알데히드기를 가져 각각 14.14, 31.66, 50.35%의 true oxidation degree를 갖는 것으로 계산되었다. 분자량의 감소로부터 예측되었던 것처럼, 반응한 과요오드산나트륨의 양에 비례하여 산화도가 증가하는 것이 확인되었다.

이러한 현상은 과량의 산화제 존재 하에 약산성의 반응 조건이 형성됨에 따라서 베타글루칸의 글리코시드 결합이 끊어지기 때문으로 생각된다 [67].

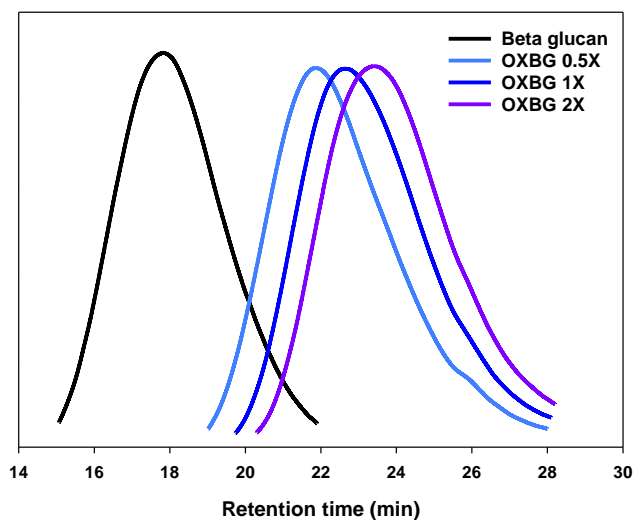


Figure 6. GPC results of intact beta glucan, OXBG 0.5X, OXBG 1X and OXBG 2X.

Table 5. Molecular weight of beta glucan, and ox- β -glucan (OXBG 0.5X, OXBG 1X, and OXBG 2X) determined by GPC

Sample	Max RT	M _n (kDa)	M _w (kDa)	PDI	Eluent
Beta glucan	17.82	121.0	288.7	2.39	0.1M azide
OXBG 0.5X	21.84	4.2	22.9	5.50	
OXBG 1X	22.63	3.0	13.9	4.60	
OXBG 2X	23.38	2.0	9.2	4.61	

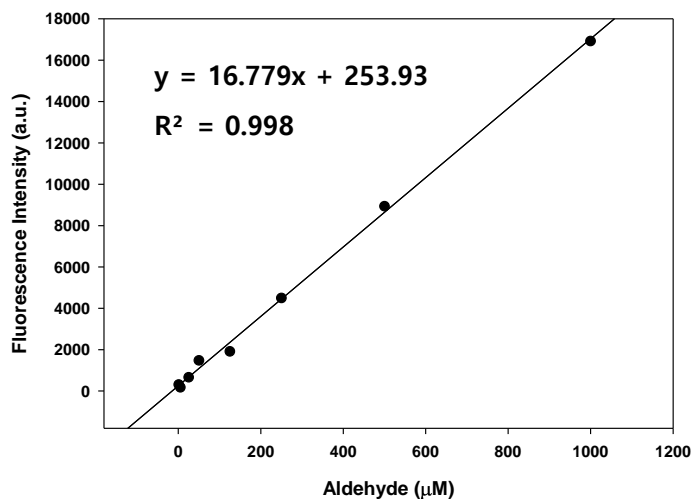


Figure 7. Fluorescence of aldehyde according to its dose (μM).

Table 6. Oxidation degree of OXBG 0.5X, OXBG 1X, and OXBG 2X determined by Amplite™ Fluorimetric Aldehyde Quantitation Kit

Ox-β-glucan	Aldehyde (mmole/g)	Oxidation degree (%)	True oxidation degree (%)
OXBG 0.5X	1.07	6.06	14.14
OXBG 1X	2.39	13.57	31.66
OXBG 2X	3.81	21.58	50.35

4.2 CpG-Ag NP와 β G-CpG-Ag NP 나노입자의 특성 분석

4.2.1 나노입자의 평균 입자 크기 및 표면전하 측정

Nanosight와 Zeta-sizer를 이용하여 Ag NP, CpG-Ag NP 및 β G_{0.5X}-CpG-Ag NP와 β G_{1X}-CpG-Ag NP의 입자 크기의 number 분포를 Figure 8과 같이 나타낼 수 있었다. NTA와 Zeta-sizer는 유사한 분포를 보였으며, CpG-Ag NP의 경우 100-200 nm 사이의 크기 분포를 보였으며, β G_{0.5X}-CpG-Ag NP와 β G_{1X}-CpG-Ag NP는 이보다 큰 200 nm 부근의 크기 분포를 보이는 것을 확인하였다.

Zeta-sizer를 통해 측정한 나노입자의 평균 직경과 표면 전하의 평균과 표준편차 값을 Table 7와 같이 정리할 수 있었다. 표면이 CpG로 개질된 이후에는 나노입자의 표면 전하가 음의 값으로 떨어졌으며, 베타글루칸의 결합 이후에는 음전하의 절댓값이 줄어드는 것을 확인하였다.

나노입자의 크기는 세포 내 전달 효율에 영향을 미치는 요인 중 하나이며, 200 nm 내외의 크기를 가져야 한다 [68]. 그보다 큰 크기를 갖는 경우나 작은 크기를 갖는 경우 모두 체내에서 제거될 확률이 높고 표적 세포로 전달될 확률이 낮다. 크기에 따라 세포 내로 전달되는 경로 또한 영향을 받는다 [69]. 세포내 이입(endocytosis) 과정에서 소포에 들어갈 수 있는 수준이 되기 위해서는 입자의 크기가 10 nm에서 500 nm까지이며, 최대 5 μ m까지 제한된다. 비교적 크기가 큰 입자들은 대음세포작용(micropinocytosis)을 통해 유입될 확률이 높다. 반면 100 nm 전후의 크기를 갖는 입자들은 클라트린 매개 세포 내 이입(clathrin

mediated endocytosis)을 통해 유입될 확률이 높으며, 카베올 매개 세포 내 이입(caveolae mediate endocytosis)으로 유입되는 입자 크기는 60-80 nm 수준이다. 따라서 제조된 나노입자는 모두 200 nm 내외의 크기를 가지므로 세포 내 이입을 통해 효과적인 세포 내 전달이 가능할 것이고, 그 경로는 클라트린 매개 세포 내 이입(clathrin mediated endocytosis)을 포함할 것이다.

또한, 세포에 전달된 은나노입자는 세포 내에서 활성산소종을 발생시키는 역할을 하는데, 이 때 은나노입자의 크기는 은 이온을 방출할 수 있는 표면적의 넓이를 결정하여, 작은 크기일수록 더 많은 활성산소종을 유도할 수 있다. 따라서 적정 수준의 활성산소종을 발생시키면서도 세포 독성은 크지 않은 수준으로 150-200 nm 사이로 제조된 나노입자의 크기는 적절할 것으로 선행 연구 결과를 통해 확인하였다 [70].

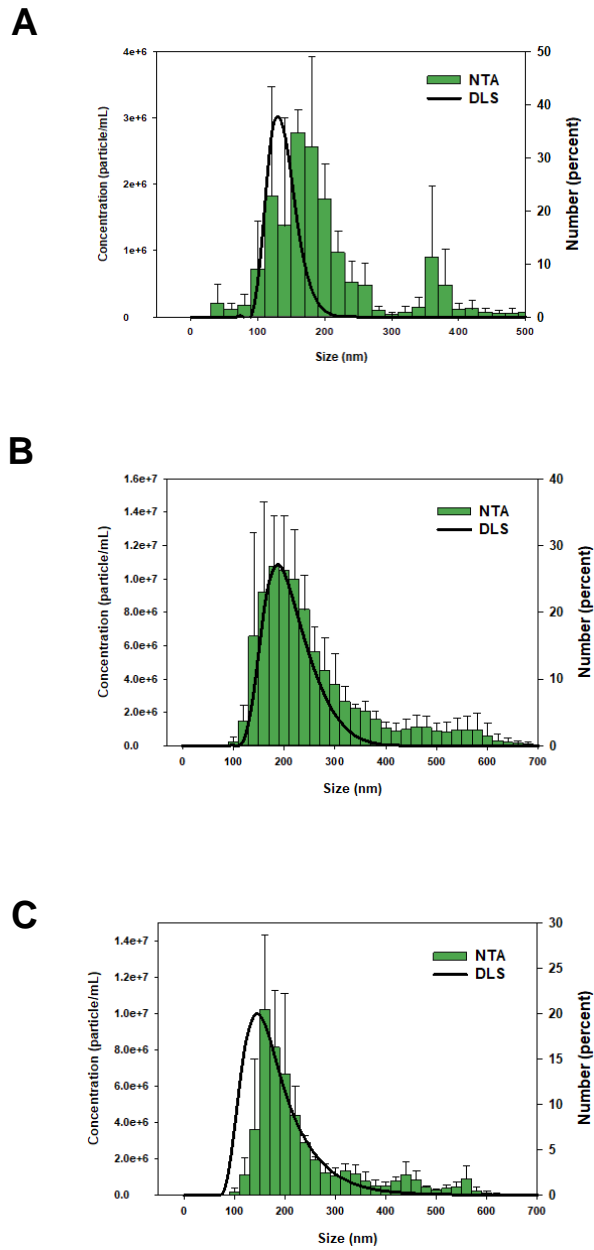


Figure 8. Size distribution of (A) CpG-Ag NP, (B) $\beta G_{0.5x}$ -CpG-Ag NP, and (C) βG_{1x} -CpG-Ag NP measured by Nanosight and Zeta-sizer.

Table 7. Size and zeta potential of Ag nanoparticles measured by Zeta-Sizer

Sample	Mean diameter \pm SD (nm)		Zeta Potential \pm SD (mV)
	Number	Intensity	
Ag NP	108.88 \pm 13.71	111.975 \pm 14.725	5.35 \pm 0.252
CpG-Ag NP	134 \pm 3.2	142.05 \pm 4.55	-29.2 \pm 1.31
β G _{0.5X} -CpG-Ag NP	201.65 \pm 7.35	226.1 \pm 8.2	-13.1 \pm 0.876
β G _{1X} -CpG-Ag NP	163.47 \pm 12.7	235.3 \pm 18.98	-15.46 \pm 2.257

4.2.2 나노입자의 입자 형태 및 원소 조성 확인

FE-TEM을 통해 CpG-Ag NP와 β G-CpG-Ag NP 나노입자 입자의 크기와 형태를 확인할 수 있었다. (Figure 9) 특히 나노입자의 모폴로지를 확인할 수 있는 고배율 이미지에서 보는 것처럼 CpG-Ag NP의 경우 일반적인 은나노입자와 같이 명암이 뚜렷하고 컴팩트한 구형의 입자 형태를 가지고 있고, β G-CpG-Ag NP의 경우 표면이 다당류 고분자로 둘러싸여 CpG-Ag NP보다 경계가 명확하지 않은 것을 알 수 있다.

입자의 크기는 CpG-Ag NP와 β G_{0.5X}-CpG-Ag NP의 경우 Zetasizer와 Nanosight로 확인한 것처럼 150-200 nm 부근의 크기를 나타내었다. 고배율 이미지 상에서는 이보다 큰 사이즈의 입자 또한 관찰되었다. β G_{1X}-CpG-Ag NP의 경우 저배율 이미지에서도 큰 사이즈의 입자가 관찰되었는데, 이는 샘플이 polydisperse한 상태이거나, 입자의 안정성이 좋지 않아서 전처리 과정에서 용매가 증발됨에 따라 입자가 응집(aggregation)되었기 때문으로 생각된다.

원소의 조성은 TEM-EDS를 통해 확인할 수 있었다. Figure 10의 A와 B에서 모두 CpG의 흡착에 따라 초록색으로 표현된 P 원소가 빨간색으로 표현된 Ag 원소의 테두리를 따라 집중적으로 나타났다. 베타글루칸의 결합에 따라 Figure 10B에서는 CpG에 있는 O 외에도 베타글루칸이 표면에 존재함에 따라 Figure 10A보다 더욱 강한 세기로 파란색으로 표현되는 O 원소가 나타났으며, 나타나는 영역 또한 더욱 넓은 범위를 보였다.

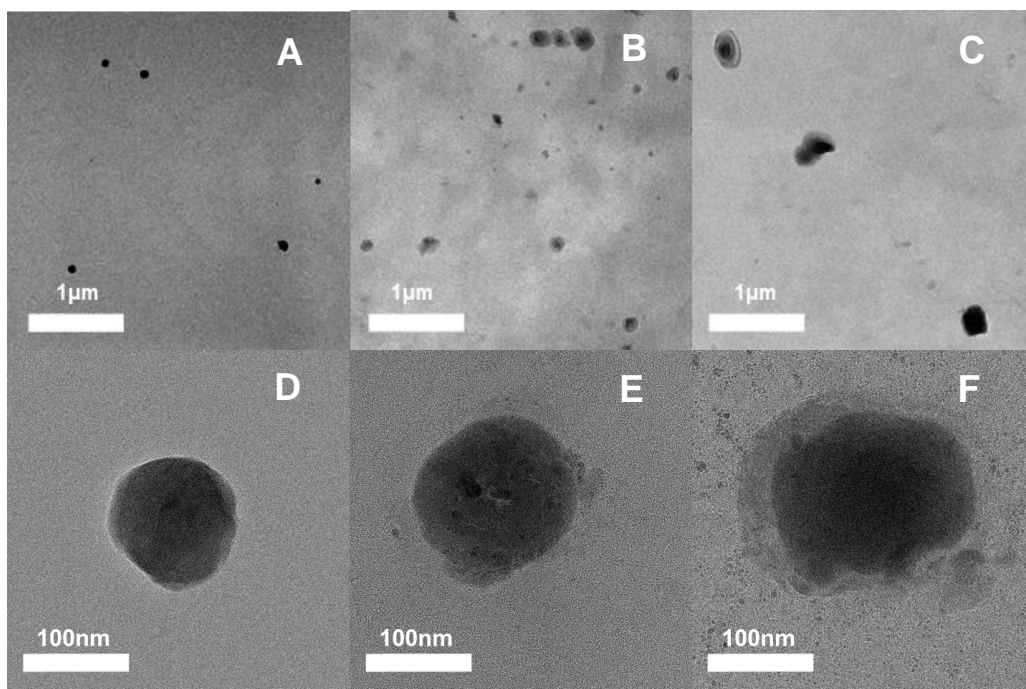


Figure 9. FE-TEM images of (A), (D) CpG-Ag NP, (B), (E) β G_{0.5X}-CpG-Ag NP, and (C), (F) β G_{1X}-CpG-Ag NP.

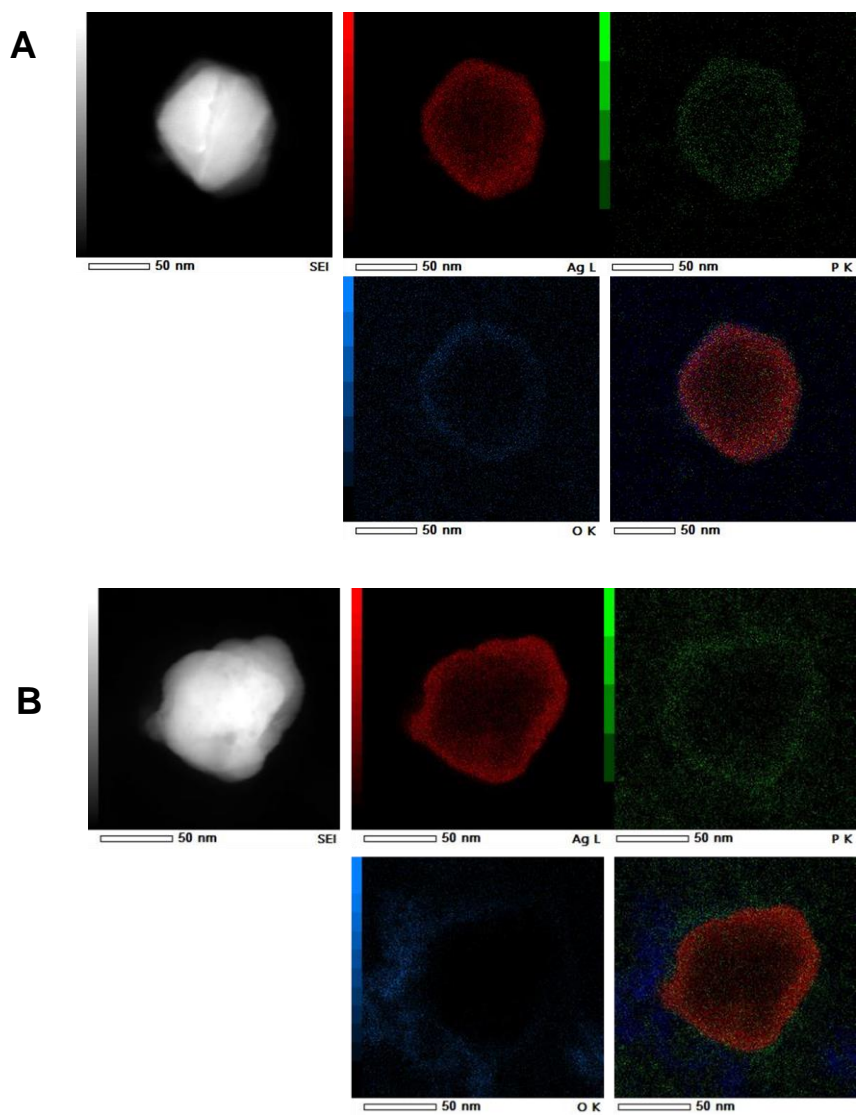


Figure 10. TEM-EDS image of (A) CpG-Ag NP and (B) β G_{0.5X}-CpG-Ag NP.

4.2.3 나노입자의 안정성 확인

나노 입자의 표면 개질에 따른 차이가 용매에 따른 안정성에서 나타나는지 여부를 보기 위해서 초순수 증류수와 serum free DMEM 두 가지 용매 상에서 크기 변화가 있는지를 살펴보았다.

나노 입자의 응집 정도는 표면 개질 상태의 영향을 크게 받기 때문에, 두 용매 상에서 Ag 나노 입자가 오랜 시간동안 크기를 유지하는 것을 통해서 나노 입자의 표면이 개질된 상태임을 간접적으로 확인할 수 있었다.

Zetasizer를 사용하여 입자 크기의 number 분포를 보았을 때, Ag NP는 물과 serum free DMEM 모두에서 37°C, 4시간 배양했을 때 2시간부터 입자 크기가 커지기 시작하여 4시간 경과하였을 때는 두 배 가까이 커진 것을 알 수 있었으며, 반면에 CpG-Ag NP와 $\beta G_{0.5X}$ -CpG-Ag NP는 두 용매 모두에서 37°C, 4시간 배양했을 때 4시간이 경과하여서도 입자 크기에 변화가 없어 각각 150 nm, 200 nm 대로 유지되었으며, 입자 크기의 분포 또한 넓어지지 않고 유지되는 것을 알 수 있었다. (Figure 11) Figure 12에서는 4°C, 초순수 증류수의 보관 조건에서 보다 장시간 안정성을 확인하였다.

βG_{1X} -CpG-Ag NP의 경우 예상보다 안정성이 좋지 않았으며, 특히 serum free media에서 0시간에는 160 nm 대에서 4시간 후 230 nm 대로 증가한 것을 알 수 있었다. 이 결과에 대한 해석으로는 CpG와 반응한 OXBG는 동일한 질량인데, Table 2에서 알 수 있는 것처럼 질량이 동일할 때 OXBG 0.5X는 CpG와의 amine to aldehyde의 몰비가 1:27인 반면, OXBG 1X는 CpG와의 amine to aldehyde의 몰비가 1:60으로 훨씬 과량이 들어갔음을 알 수 있다. 따라서 반응에 참여하고 남은 알데히드가 정제 과정

이후에도 남아 있으면서 CpG 사이의 추가적인 가교 반응을 일으켰고, 이러한 이유로 나노 입자가 쉽게 응집되는 것으로 생각된다. 또한 4.1.3의 분자량 측정 결과에서 OXBG 1X는 OXBG 0.5X 대비 분자량이 작아 이 연구에서 의도하는 대식세포에 대한 친화도를 보기에 충분하지 않을 것이라 판단하였다. 따라서 낮은 안정성과 충분하지 않은 분자량의 이유로 이후 실험에서는 β G_{1X}-CpG-Ag NP는 사용하지 않았다.

4.2.4 OXBG 결합에 따른 이민 결합 형성의 확인

CpG에 베타글루칸의 결합에 따른 구조적 특성은 FT-IR을 통해 확인하고자 하였다. Figure 13의 스펙트럼을 살펴보면, OXBG 0.5X와 1X는 Figure 5에서 분석한 것과 같이 2890 cm^{-1} 부근에서 C-H stretching 피크, 3330 cm^{-1} 부근에서 O-H stretching 피크를 나타내는 특징적인 피크를 갖고 있다. 또한 두 고분자에서 공통적으로 1638 cm^{-1} 부근에서 카르보닐 그룹의 stretching 피크와 894 cm^{-1} 부근에서 헤미아세탈의 피크가 발생하였다.

CpG와 반응한 OXBG의 스펙트럼에서는 각각 1652.68 cm^{-1} 와 1652.29 cm^{-1} 에서 피크가 증가한 것을 알 수 있다. (Figure 13) 이는 CpG의 피크일 수도 있지만, OXBG의 알데히드와 CpG의 cytosine이나 guanine에 존재하는 아민이 반응하여 형성된 이민 결합의 피크 또한 1690-1640 cm^{-1} 에서 생긴다. 또한 동량의 CpG에 동일한 질량의 OXBG가 반응한 것임에도 불구하고 OXBG 1X와 CpG가 반응한 스펙트럼에서 1652.29 cm^{-1} 에서 피크가 더 강하게 나타난 것을 보면, 증가된 피크는 이민 결합일 가능성이 높다.

Figure 13에서 각각 786.73 cm^{-1} 와 785.24 cm^{-1} 에서 새로 나타난 피크는 CpG의 도입에 따른 N-H wagging 피크이다. OXBG 스펙트럼에서는 발견되었던 894 cm^{-1} 부근의 헤미아세탈의 피크가 CpG와 반응 이후에는 사라졌는데, 이는 주위의 하이드록시기나 물과 반응하여 헤미아세탈 상태로 존재하던 알데히드가 CpG의 아민과 반응하면서 아민알 형태로 되었다가 이민의 형태가 되기 때문으로 생각된다.

Figure 14에서도 파티클 상의 CpG에 OXBG0.5X가 결합되었음을 확인할 수 있었다. 먼저 CpG의 스펙트럼에서는 1653 cm^{-1} 부근에서 cytosine과 thymine 염기에 존재하는 C=O stretching 피크와 1057 cm^{-1} 부근에서 인산다이에스터 결합에 존재하는 P-O stretching 피크가 발생하였다. 또, Figure 13에서 1652 cm^{-1} 부근에서 C=N으로 추정되는 피크가 발생한 것처럼, Figure 14에서 1650.90 cm^{-1} 에서 C=N으로 추정되는 피크가 발생하였다. 또한 894 cm^{-1} 부근의 헤미아세탈 피크가 감소하고, 767 cm^{-1} 부근에 새로운 N-H wagging 피크가 발생한 것을 통해서도 헤미아세탈 상태로 존재하던 알데히드가 아민과 반응하였음을 알 수 있었다.

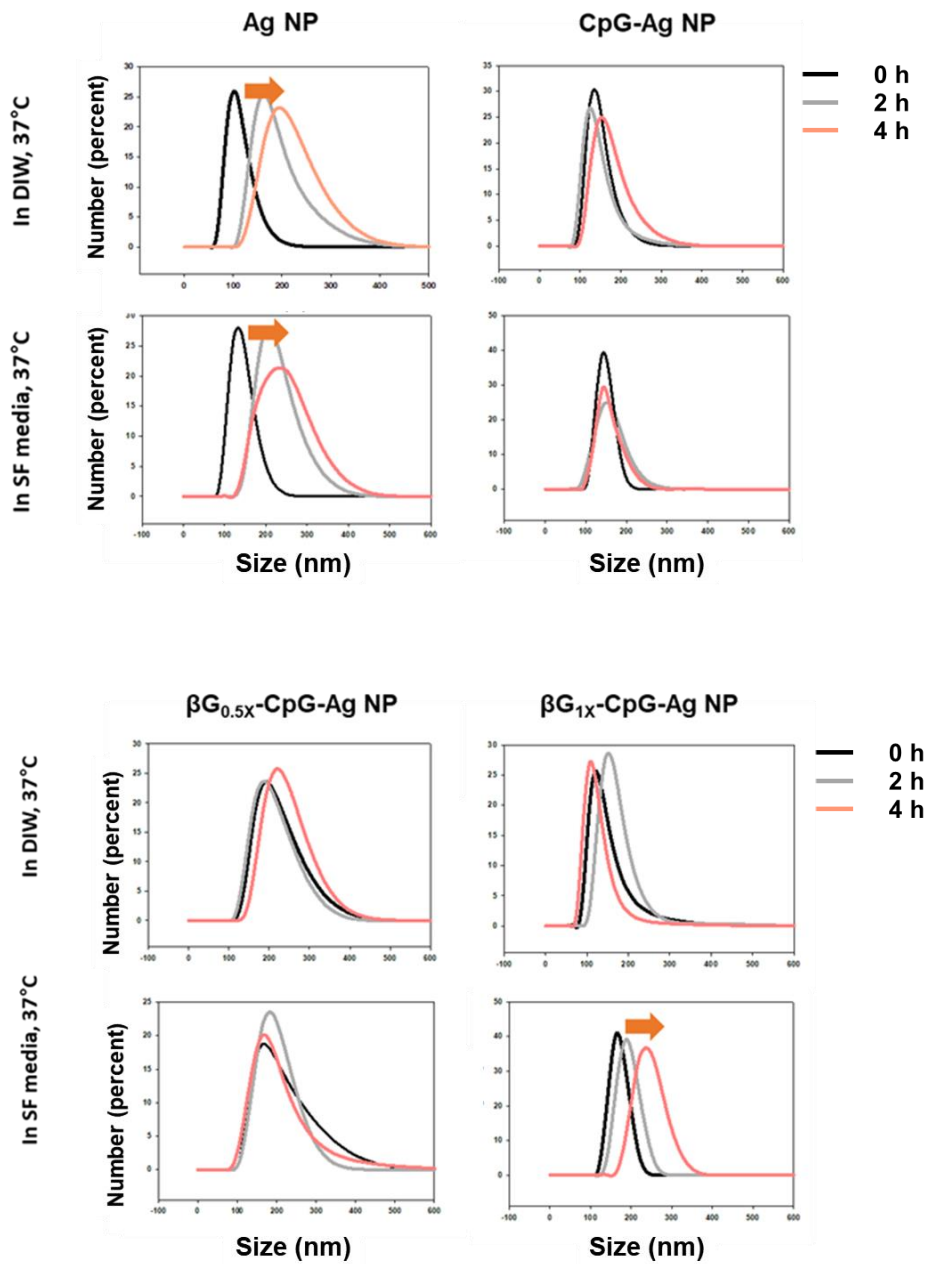


Figure 11. Size distribution of Ag NP, CpG-Ag NP, $\beta G_{0.5X}$ -CpG-Ag NP, and βG_{1X} -CpG-Ag NP in deionized water and SF media in overlays of different time points (0h, 2h, 4h).

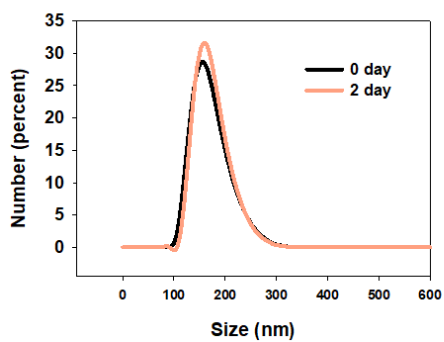
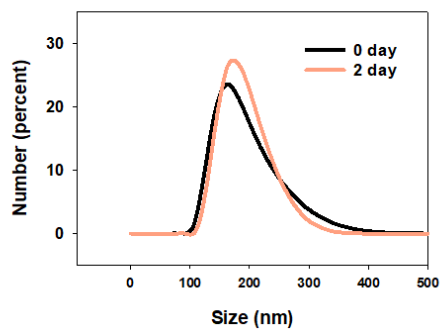
A**B**

Figure 12. Size distribution of (A) CpG-Ag NP and (B) β G_{0.5X}-CpG-Ag in 4°C, deionized water at different time points (0 day, 2 day).

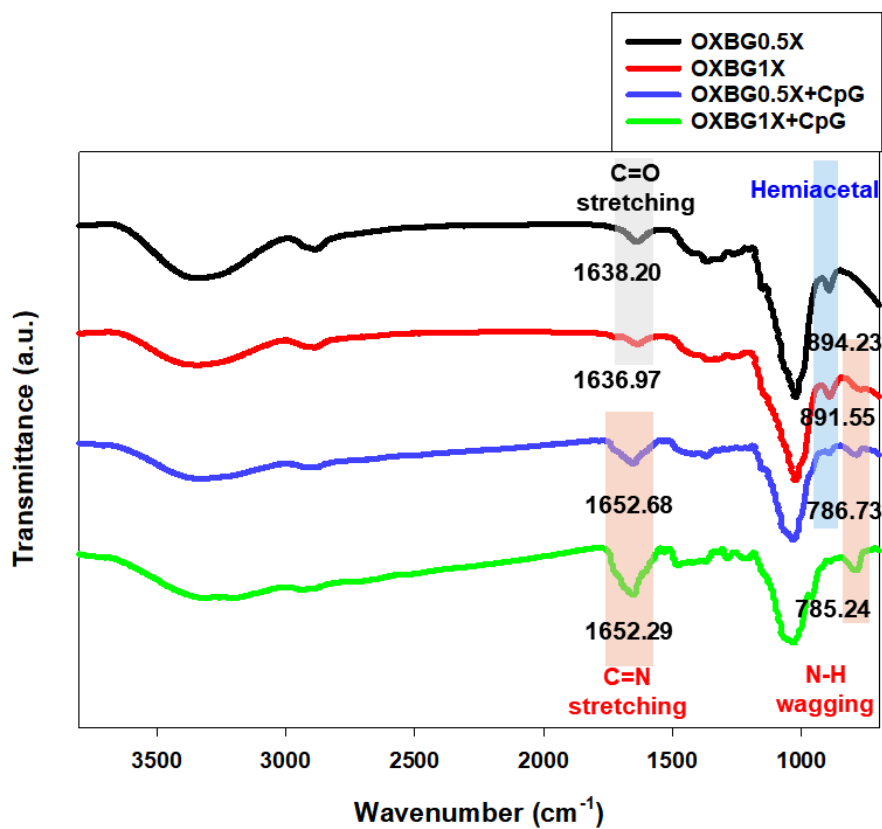


Figure 13. FT-IR spectra of OXBG 0.5X, OXBG 1X, OXBG 0.5X+CpG and OXBG 1X+CpG.

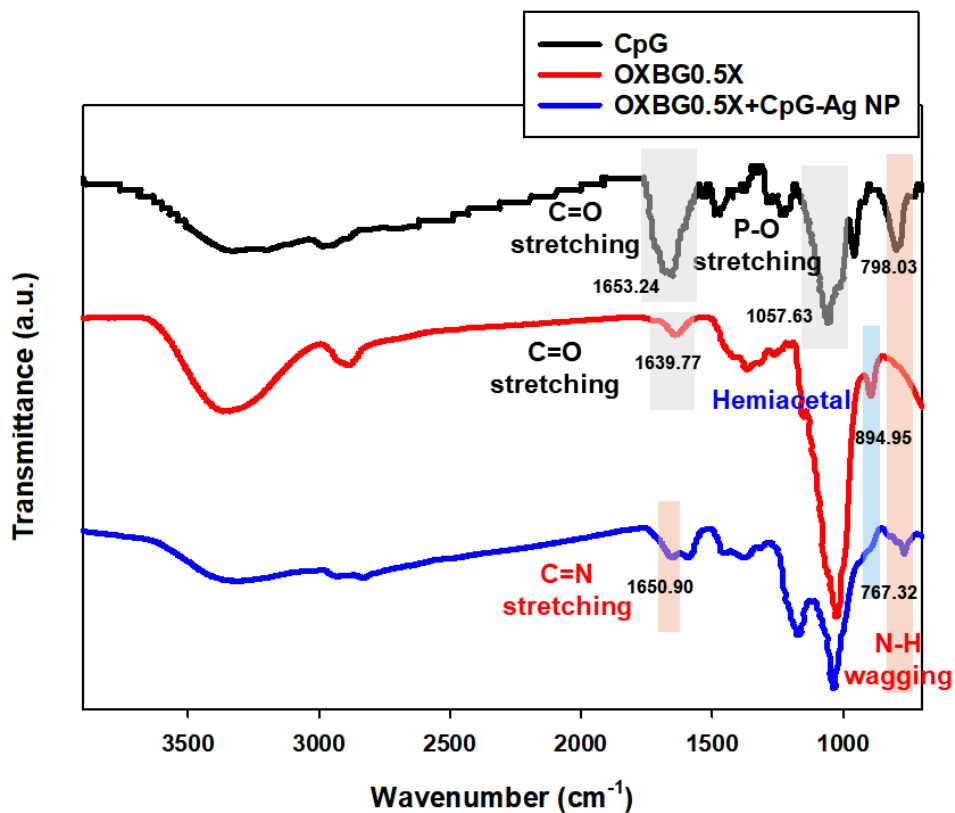


Figure 14. FT-IR spectra of CpG, OXBG 0.5X and OXBG 0.5X+CpG-Ag NP.

4.2.5 CpG-Ag NP 나노입자의 CpG 흡착 효율 (loading efficiency)의 확인

3.2.2에서 제조한 나노입자를 Amicon® Ultra Centrifugal Filter (MWCO 100 kDa)를 이용하여 4000 rpm, 2 min 조건으로 3회 필터시켜 흡착되지 않은 CpG를 분리시켰다. Filtrate의 흡광도를 270 nm에서 측정함으로써 CpG의 농도를 구하였다. CpG의 검량선은 270 nm에서 CpG의 흡광도를 microplate reader (Synergy H1, BioTek, U.S.A)로 측정하여 Figure 15와 같이 나타냈다.

Filtrate의 흡광도로부터 나노입자에 흡착되지 않고 빠져나온 CpG의 몰수를 구하였고, 넣어준 CpG 몰수 대비 흡착된 CpG의 몰수를 흡착 효율 (loading efficiency)로 나타냈다. (Table 8) Nanosight를 통해 측정된 CpG-Ag NP의 입자 밀도는 $3.13 \times 10^8 \pm 3.13 \times 10^7$ particles/mL로, 입자 하나당 흡착된 CpG의 개수는 3.1×10^6 /particle로 계산되었다.

4.2.6 나노입자의 형성 확인 및 CpG의 방출 확인

아가로스 젤 전기영동을 통해서 CpG-Ag NP와 β G_{0.5X}-CpG-Ag NP 나노 입자가 형성된 것을 확인하였고, dithiothreitol 5 mM의 환원성 조건에서 CpG가 방출되는 것을 확인하였다.

Figure 16에서 DTT가 없는 조건에서 (A)와 (B) 모두에서 흐릿한 밴드만이 관찰되어 CpG가 안정하게 흡착된 상태로 존재하며, 반면 5 mM DTT를 처리하고 30분간 37°C에서 배양한 결과에서는 강한 CpG band가 관찰되었기 때문에 이로부터 CpG는

DTT라는 환원성 조건에서만 선택적으로 방출된다는 것을 알 수 있었다. DTT 처리에 의한 CpG의 방출은 두 가지 이유에서 설명될 수 있다. 먼저, CpG 올리고뉴클레오타이드가 phosphorothioate (PS) bond를 가지므로 은 입자와 상호작용하는 힘(Ag-S)이 존재하지만, DTT에 의한 싸이올 기 교환 반응(thiol exchange reaction)에 의해서 끊어지게 된다. 또한, cytosine 및 guanine 염기의 O와 N 원자와 Ag 이온 사이의 반데르발스 인력 또한 DTT에 의해서 끊어질 수 있다.

흡착이 잘 이루어졌다는 가정 하에 4.2.5에서 흡착 효율이 다소 낮게 측정된 것은 강한 원심력(centrifugal force)에 의해서 흡착된 CpG 일부가 방출되었기 때문으로 생각된다.

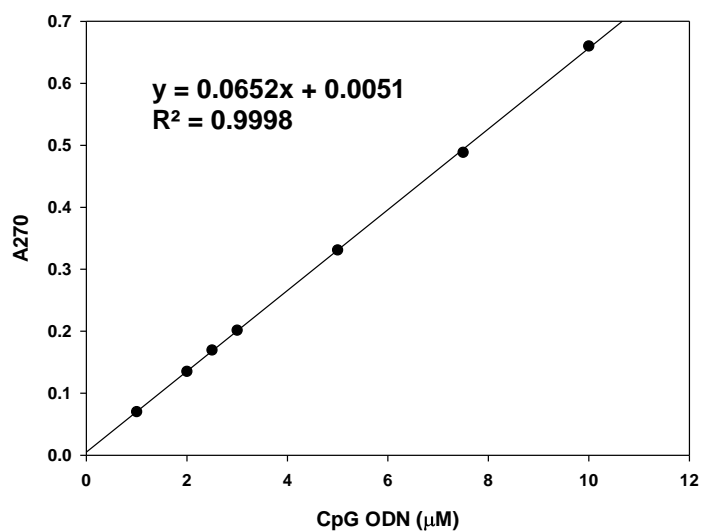


Figure 15. UV absorbance of CpG according to its dose (μM).

Table 8. UV absorbance of 100 K filtrate and calculated CpG mole and loading efficiency

	Loading	Filtrate
A ₂₇₀	—	0.042
CpG (μM)	—	0.566
CpG (nmole)	6.67	3.396
LE (%)	—	49.09

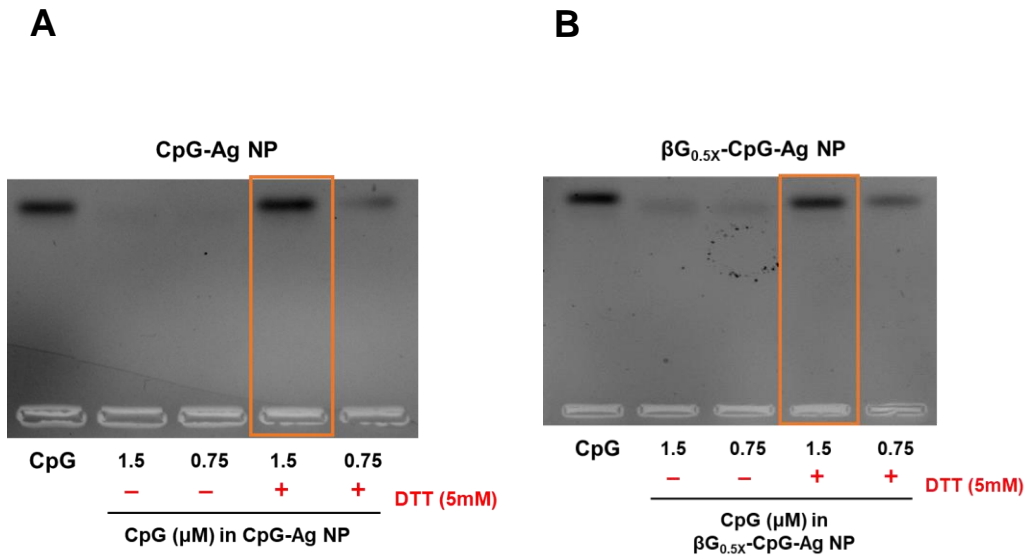


Figure 16. Agarose gel electrophoresis of (A) CpG–Ag NP and (B) β G_{0.5X}–CpG–Ag NP with or without 5mM DTT using 2% (w/v) agarose gel.

4.3 CpG-Ag NP와 β G-CpG-Ag NP 나노입자의 생물학적 평가

4.3.1 나노입자의 세포 대사 활성 확인

유전자 전달체의 독성을 확인하기 위해 세포에 처리하고 MTT 시약을 이용해 세포 활성을 측정하였다. 세포 독성 평가는 대식세포인 RAW264.7 세포를 사용하였고, 대조군으로는 Ag NP를 사용하였다. 아무것도 처리하지 않은 세포의 활성도를 100%로 하여 상대적 세포 활성도 (Relative cell viability, %)를 계산하였다.

Ag NP의 경우 4.1×10^7 particles/mL의 농도까지 90% 이상의 세포활성을 보였으며, 그 이상의 농도를 처리했을 때도 80% 이상의 상대적 세포 활성도를 유지하였다. (Figure 17) CpG-Ag NP는 8.2×10^7 particles/mL의 농도까지 100% 이상의 상대적 세포 활성도를 보이다가, 가장 높은 농도를 처리했을 때 세포 활성이 90% 수준으로 떨어졌다. β G_{0.5X}-CpG-Ag NP는 가장 낮은 수준의 세포 활성을 보였지만, 가장 높은 농도를 처리했을 때를 제외하고 모두 80% 이상의 세포 활성을 보였다. 가장 고농도는 이후 실험에서 처리하지 않았으므로, 모든 샘플에서 세포 독성은 크게 고려하지 않아도 되는 수준인 것으로 보인다.

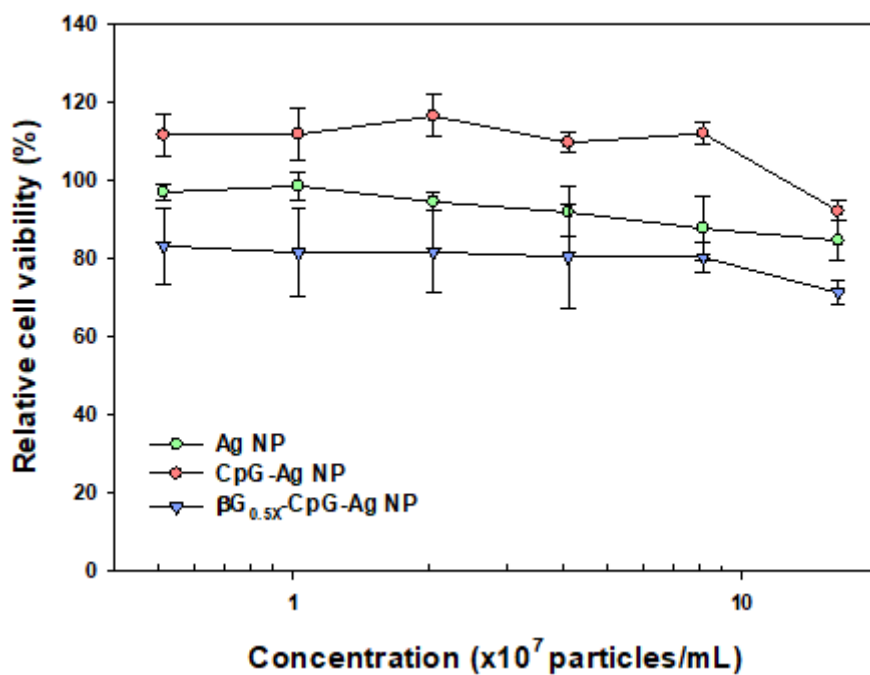


Figure 17. MTT cell viability assay of Ag NP, CpG-Ag NP, and $\beta G_{0.5X}$ -CpG-Ag NP with RAW 264.7.

4.3.2 유세포 분석법을 이용한 세포 투과율 평가

나노 입자가 암세포인 HeLa 세포와 대식세포인 RAW264.7 세포에서 서로 다른 세포 투과율을 보이는 것을 유세포 분석법을 통해 확인할 수 있었다. 먼저 CpG 300 base 당 1분자의 YOYO-1 iodide 수준으로 염색하여 ssDNA에 대한 intercalating ability를 확인하였다. (Table 9) 분자량이 큰 CpG는 통과하지 못하고 YOYO-1 iodide만 선택적으로 통과시키는 Amicon® Ultra Centrifugal Filter (MWCO 3 kDa)를 이용하여 3000 rpm, 30 min 조건으로 각각 CpG-Ag NP, CPG/YOYO-1-Ag NP, dialysed CpG-Ag NP, dialysed CPG/YOYO-1-Ag NP를 통과시켰을 때 빠져나오는 YOYO-1의 형광을 측정하여 CpG에 대한 bound rate를 계산하였다. 측정된 형광에 대한 YOYO-1의 농도는 Figure 18의 검량선을 통해 구하였다. 또한 CpG만을 전달체 없이 두 세포에 전달했을 때는 두 세포 모두 세포 투과율 수준이 1% 미만인 것을 실험을 통해 확인하였다.

Figure 19에서 A는 HeLa 세포에 대한 세포 투과율을 측정한 결과이고, B는 RAW264.7 세포에 대한 세포 투과율을 측정한 결과이다. Figure 19A에서 CpG-Ag NP와 β G_{0.5X}-CpG-Ag NP는 각각 세포 투과율이 20.2%와 24.7%였고, 베타글루칸의 유무에 따른 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. Figure 19B에서는 CpG-Ag NP와 β G_{0.5X}-CpG-Ag NP는 각각 세포 투과율이 33.9%와 85.0%로 β G_{0.5X}-CpG-Ag NP의 세포 투과율이 월등히 뛰어났다.

나노 입자의 세포 투과는 세포 내 이입(endocytosis)를 통해서 이루어진다. 세포 내 이입은 음세포작용(pinocytosis)과

식세포작용(phagocytosis)이라는 두 개념을 포괄한다. 음세포작용은 클라트린 매개 세포내 이입(clathrin-mediated endocytosis), 카베올 매개 세포내 이입(caveolin-mediated endocytosis) 그리고 클라트린 및 카베올 비매개 세포내 이입(clathrin- and caveolin-independent endocytosis)을 포함하며, 식세포작용은 미생물이나 세포 부스러기처럼 비교적 큰 입자의 세포 이입을 설명하는 메커니즘이다. 이 중 선행 연구 결과에 따르면 200 nm 이하의 크기를 가지며, 음의 표면 전하를 갖는 나노 입자는 리간드와 수용체 즉, dectin-1이 관여하는 클라트린 매개 세포내 이입의 메커니즘으로 세포 이입이 이루어진다 [71, 72]. 그러나, 해당 연구에서 나노 입자는 200 nm 전후의 크기를 갖기 때문에 거대음세포작용이나 식세포작용 역시 가능한 설명일 것이다. 따라서 HeLa 세포 대비 RAW264.7 세포에서 관찰된 높은 세포 투과율이 반드시 베타 글루칸의 면역세포가 갖는 특정 수용체에 대한 표적화 효과를 의미하지 않을 수 있다. 따라서 유세포 분석 실험을 통해서도 베타 글루칸을 포함하는 나노 입자의 면역세포에 대한 높은 친화도를 확인할 수 있었다.

4.3.3 공초점 현미경을 이용한 세포내 거동 확인

나노 입자의 세포 내 투과를 확인하기 위해 YOYO-1 iodide로 표지한 CpG로 CpG-Ag NP와 CpG-Ag NP와 β G_{0.5X}-CpG-Ag NP를 만들어 HeLa 세포와 RAW264.7 세포에 처리하고 공초점 현미경을 이용해 관찰하였다. 처리 시에 CpG의 최종 농도는 well당 일정하게 100 nM이 되도록 하였다. 핵은 Hoeschst 33342 (파랑색), CpG는 YOYO-1 (초록색)으로 염색하였다. 샘플을 하루간 처리한 후에 핵은 10분간 염색하여 고정하지 않고 바로 관찰하였다.

Figure 20에서 알 수 있는 것처럼 HeLa와 RAW264.7 세포 모두 대부분의 세포에서 세포내 투과가 일어났다. HeLa 세포에서는 CpG-Ag NP와 β G_{0.5X}-CpG-Ag NP를 처리한 세포에서 유의미한 차이가 발견되지 않았다. 또한 세포 내로 유입된 나노 입자는 세포 가장자리 영역(peripheral region)에 머무르는 것을 볼 수 있었다.

RAW264.7 세포에서는 좀 더 강한 형광을 관찰할 수 있었으며, 이는 유세포 분석법을 이용했을 때 RAW264.7 세포에서 더 높은 세포 투과율이 나타난 것에 상응하는 결과이다. 또한 세포 내로 유입된 나노 입자는 세포 내 운송(intracellular trafficking)의 결과 핵 주위에 위치하는 것을 관찰할 수 있다. β G_{0.5X}-CpG-Ag NP를 처리했을 때 대부분의 세포에서 강한 형광이 관찰되어 유세포 분석법에서 85%의 세포 투과율을 보인 것과 상응하는 것을 알 수 있다.

HeLa 세포에서 나노입자가 낮은 세포 투과율을 나타내는 것은 나노입자의 표면 전하가 음전하를 띠는 것과 연관이 있다 [73].

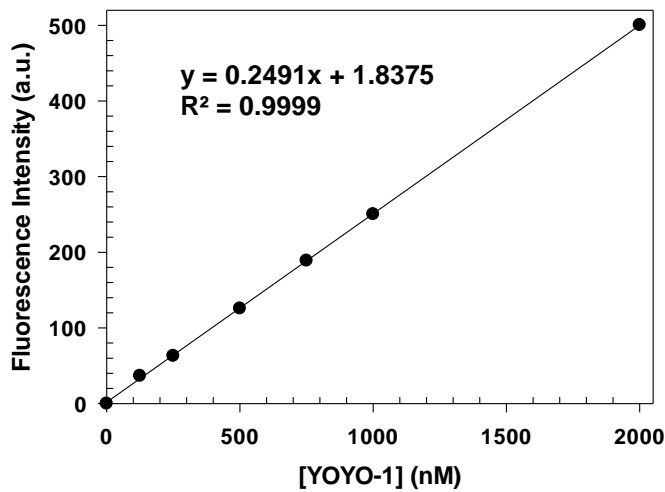


Figure 18. Fluorescence intensity of YOYO-1 iodide according to its dose (nM) (ex. 458 nm, em. 560 nm).

Table 9. Bound rate (%) of YOYO-1 iodide to CpG in various CpG-Ag NP samples after ultrafiltration at 3000 rpm for 30 min using Amicon® Ultra Centrifugal Filter (MWCO 3 kDa)

	Feed amount (nmole)	Filtrate (pmole)	Bound rate (%)
CpG-Ag NP	0	62.19	93.78
CpG/YOYO-1-Ag NP	1	30.03	97
CpG-Ag NP (dialysis)	0	42.10	95.79
CpG/YOYO-1-Ag NP (dialysis)	1	18.01	98.99

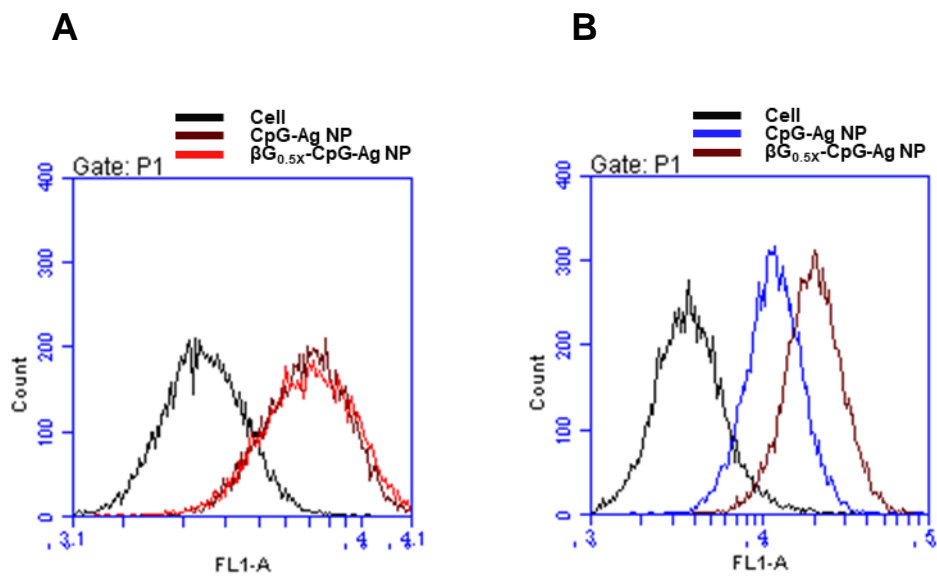
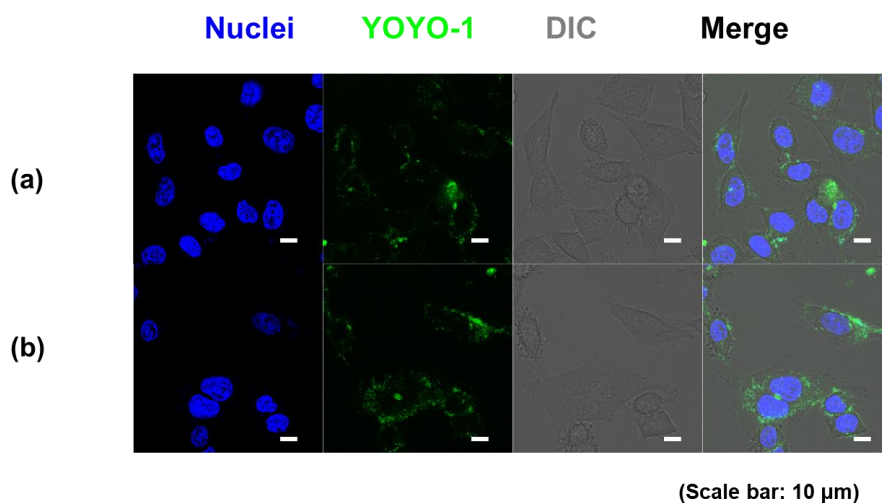


Figure 19. Flow cytometry results of CpG–Ag NP and $\beta G_{0.5X}$ –CpG–Ag NP in serum–free condition in (A) HeLa cells and (B) RAW264.7 cells.

Table 10. FACS results of CpG–Ag NP and $\beta G_{0.5X}$ –CpG–Ag NP in HeLa and RAW264.7 cells

		Cell	CpG-Ag NP	$\beta G_{0.5X}$ -CpG-Ag NP
Intensity (%)	HeLa	0.0	20.2	24.7
	RAW264.7	0.9	33.9	85.0

A



B

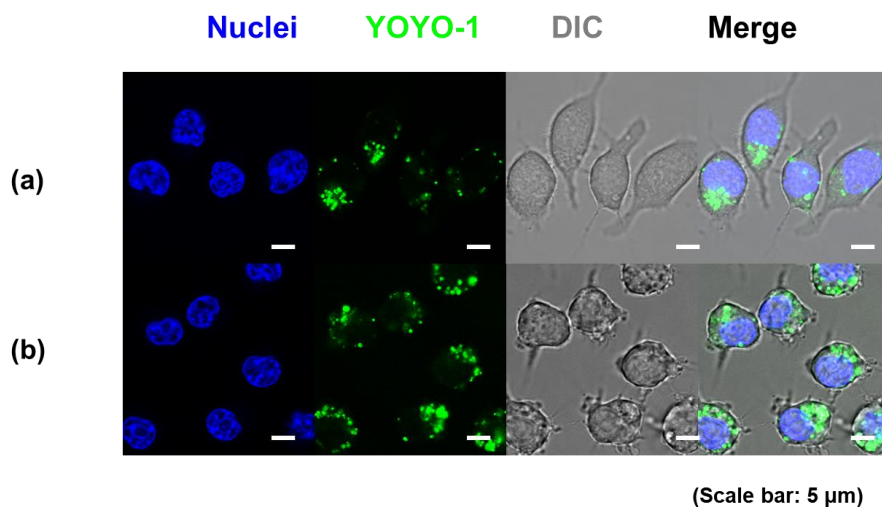


Figure 20. Confocal microscopic images of YOYO-1 iodide labelled (a) CpG-Ag NP and (b) β G_{0.5X}-CpG-Ag NP in (A) HeLa cells (40X, zoom factor 2) and (B) RAW264.7 cells (63X, zoom factor 4), nucleus stained with Hoeschst 33342.

4.3.4 세포 내 활성 산소종 (reactive oxygen species, ROS) 수준의 확인

은나노입자로 인한 세포 내 활성 산소종 수준의 증가를 확인하기 위해서 Abcam 사의 DCFDA / H₂DCFDA - Cellular ROS Assay Kit (ab113851)를 활용하였다. 25 μ M DCFDA, 45 min 조건으로 먼저 염색을 진행한 후, 최종 1.0×10^7 NP/mL 농도의 Ag NP, CpG-Ag NP, β G_{0.5X}-CpG-Ag NP를 RAW264.7에 각각 4시간, 8시간 처리했을 때의 결과를 Figure 21에 나타냈다.

먼저 대조군에 처리해준 TBHP의 경우 4시간 뒤에 세포 대비 3.6배의 DCF 형광을 보여 매우 높은 수준의 ROS 증가를 보여주었지만, 8시간 경과했을 때는 세포 대비 2.7배로 4시간에 비해 낮은 DCF 형광을 나타냈다. 이는 TBHP의 경우 세포 내 신호 전달 과정에 의해서가 아닌, 단순한 화학 반응에 의해 ROS를 생성하는 물질이기 때문으로 생각된다. Ag NP는 4시간이 경과했을 때와 8시간이 경과했을 때의 ROS 수준이 유사하였으며, 아무것도 처리하지 않은 세포 대비 최대 1.88배 증가하였다. CpG-Ag NP와 β G_{0.5X}-CpG-Ag NP를 처리한 경우에는 4시간이 경과해서는 DCF 형광이 증가하지 않았다. 그러나 8시간이 경과했을 때는 각각 세포 대비 1.43배, 1.74배까지 형광 세기가 증가하여 Ag NP와 유사한 수준을 보였다. 이는 표면이 개질되어 Ag가 노출되지 않은 CpG-Ag NP와 β G_{0.5X}-CpG-Ag NP의 경우 세포 내에서 표면이 노출된 Ag NP만큼의 활성 산소종을 발생시키기까지 더 많은 시간이 필요한 것으로 생각된다.

베타글루칸의 유무에 따라 ROS를 발생시키는 것에 큰 차이가

없었는데, 베타글루칸이 ROS 발생을 직접 유도하지 않는 것이 이유가 될 수 있다. 또한 ROS는 은나노입자 표면의 산화반응으로부터 발생하는데, CpG와 OXBG는 표면을 둘러싸고 있는 고분자 물질이므로 세포 내에서 완전히 dissociation되지 않는다면 ROS 생성을 늦출 수 있다. 표면이 코팅된 은나노입자와 표면이 노출된 은나노입자를 비교하였을 때, 고분자 코팅이 ROS 생성 및 세포 독성을 낮춘다는 선행 연구가 존재한다 [74]. 실험에서의 결과도 4시간과 8시간을 비교하면, 표면에 고분자 물질이 있는 경우 8시간으로 처리 시간을 늘려야만 ROS가 증가하는 것을 알 수 있다.

150-200 nm 사이로 제조된 은나노입자는 적정 수준의 활성 산소종을 발생시키면서도 세포 독성은 크지 않으므로, 해당 연구에서 사용된 은나노입자에 의해서 발생하는 활성 산소종은 세포 사멸을 유도하지 않으면서도 면역 반응을 유도할 수 있는 수준으로 생각된다.

4.3.5 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)과 실시간 중합효소 연쇄반응 (Real Time-PCR, qPCR)을 이용한 대식세포 M1 분극화 효능의 확인

In vitro 상에서 대식세포의 M1 분극화 능력을 보기 위해서 qRT-PCR을 시행하였다. 24시간 동안 배양하여 70-80%의 밀도를 보이는 세포에 CpG-Ag NP와 β G_{0.5X}-CpG-Ag NP를 24시간 동안 혈청이 없는 조건에서 처리하여 mRNA를 추출하였다.

M1 분극화에 대한 지표로는 iNOS, COX-2의 발현 수준을 보았고, M2 분극화에 대한 지표로는 Arg-1, TGF- β 의 발현 수준을 보았다. Figure 22에서와 같이 CpG-Ag NP와 β G_{0.5X}-CpG-Ag NP를 24시간 처리한 RAW264.7 세포에서 iNOS와 COX-2의 발현 수준이 증가하였으며, 특히 COX-2가 β G_{0.5X}-CpG-Ag NP를 처리했을 때 CpG-Ag NP보다 통계적으로 유의한 수준으로 증가하여 베타글루칸 사용에 따른 M1 분극화 유도 가능성을 확인하였다.

선행연구에 따르면, 대식세포인 RAW264.7 세포는 본 연구와 동일한 조건인 DMEM high glucose media (10% FBS, 1% penicillin/streptomycin), 5% CO₂, 37° C에서 배양되었을 때 passage number 10과 30 사이에서는 passage가 증가하더라도 M1 또는 M2 population에 급격한 변화가 나타나지 않는다 [75]. 또한, 3.2.3.6에서처럼 각 인자의 발현량은 하우스키핑 유전자인 GAPDH의 발현량을 기준으로 정규화하였고 이때 $2^{-\Delta\Delta CT}$ method를 이용하였기 때문에, Figure 22에서 M1 인자 발현의 증가는 passage 증가에 따른 것이 아닌, 나노 입자 처리에 따른 유의미한 결과로 생각된다.

한편, M2 분극화의 지표인 Arg-1, TGF- β 의 발현 수준에는 큰 변화가 없었다. 대식세포의 분극화 상태를 뚜렷하게 M1과 M2라는 두 집단으로 분류할 수 있다는 기존의 시각과 달리, M1과 M2의 특징이 반드시 서로를 배제하기 않고 종종 공존한다는 시각이 존재한다 [76]. 일례로 Arg-1이 조직 치유, T세포 반응의 감소, 그리고 NO의 발생에 관여할 가능성이 있다는 기존의 연구들은 대식세포에서 Arg-1이 상처 치유 및 항염증의 특성을 나타낸다는 견해를 갖도록 했다 [77]. 그러나, 다른 연구에서 Arg-1은 염증성 환경에서 오히려 증폭되었으며, Arg-1의 억제제는 마우스에서 상처 치유를 촉진하였다 [78, 79]. 따라서 일반적으로 M2 분극화 상태를 확인하는 마커로서 Arg-1과 TGF- β , CD206 등이 활용되지만, 이와 대조적인 견해도 존재하기 때문에 뚜렷한 감소 효과를 확인하지 못한 것으로 생각된다.

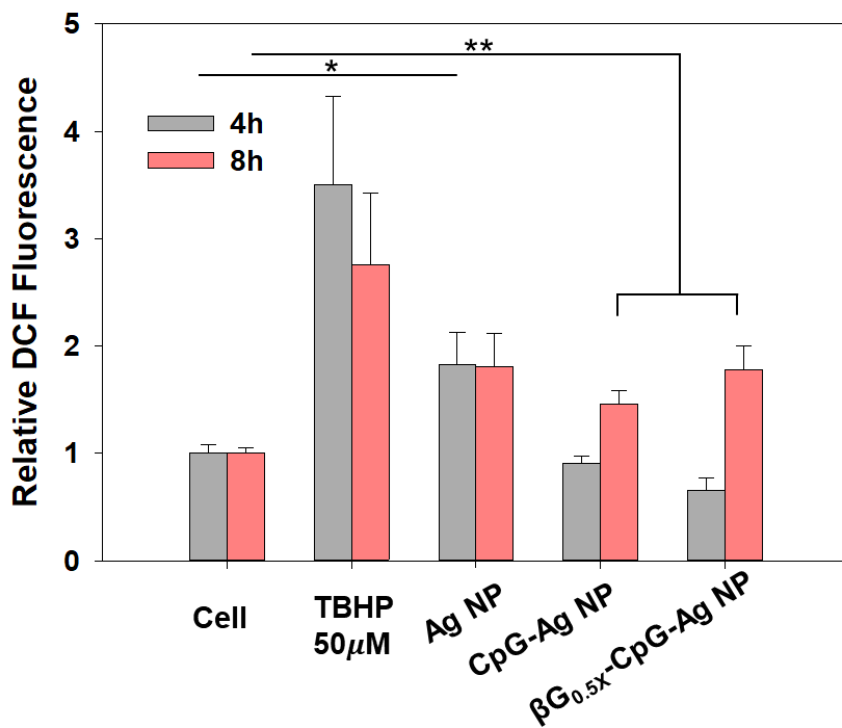


Figure 21. Measurement of intracellular ROS level after 4h and 8h treatment of 50 μ M TBHP, Ag NP, CpG-Ag NP and β G_{0.5X}-CpG-Ag NP (1.0×10^7 particles/mL). Intracellular ROS levels presented in terms of DCF fluorescence intensity relative to the value of untreated cells.

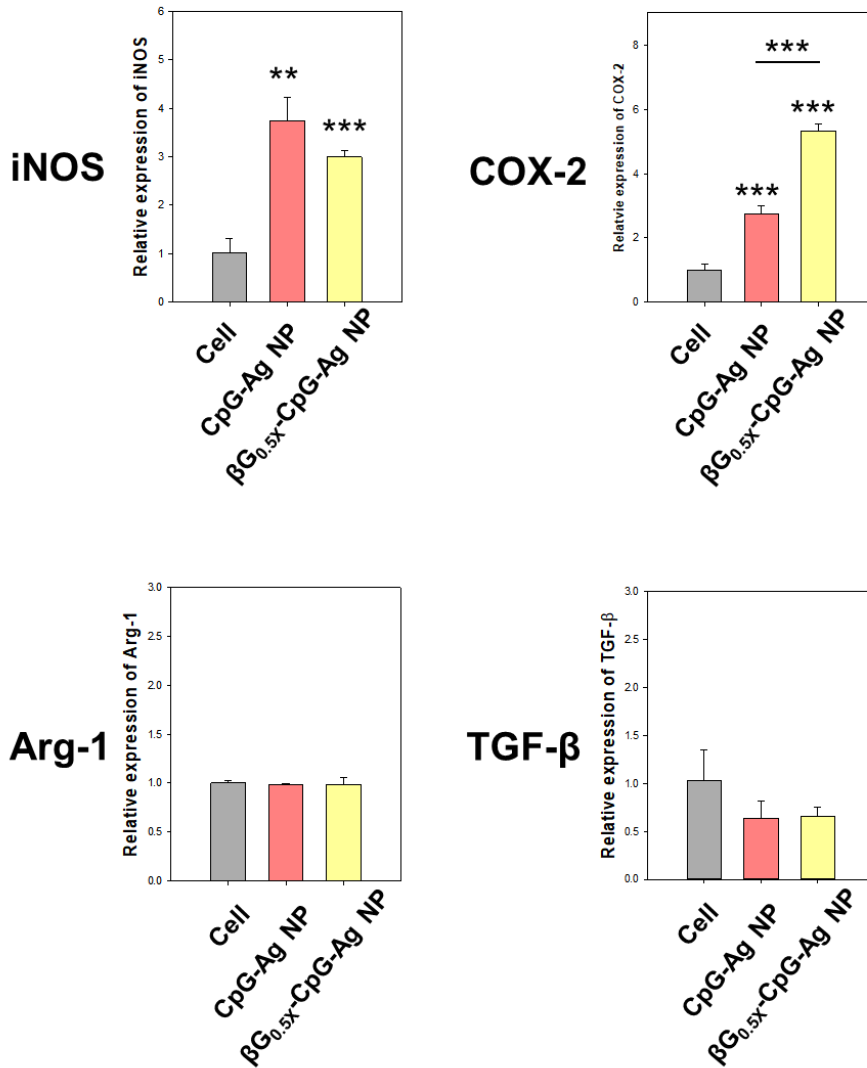


Figure 22. Relative mRNA expression levels of (A) iNOS, (B) COX-2, (C) Arg-1, and (D) TGF- β by CpG-Ag NP and $\beta G_{0.5x}$ -CpG-Ag NP treatments on RAW264.7 cells.

제 5 장 결 론

지금까지 대식세포의 항암 특성을 갖는 M1 표현형으로의 분극화에 효과가 있는 보리 베타글루칸/CpG 올리고뉴클레오타이드/은나노입자 복합체를 RAW264.7 세포에 전달하여 그 효능을 확인하는 연구를 진행하였다.

산화 베타글루칸의 분자량은 그 산화 정도와 음의 상관관계를 보였다. 분자량의 감소로부터 예측되었던 것처럼, 반응한 과요오드산나트륨의 양에 비례하여 산화도가 증가하는 것이 확인되었다. 산화도는 제조된 나노입자의 안정성에 영향을 미쳤으며, 가장 높은 분자량을 갖는 산화 베타글루칸인 OXBG0.5X의 결합을 통해 나노입자는 대식세포에 대한 높은 친화도를 보였다. 고분자로 개질된 표면의 상태는 FT-IR과 TEM-EDS로 확인이 가능하였으며, Zeta-sizer를 통해서 세포 내 이입에 적절한 크기와 표면 전하를 확인하였다.

제조된 나노입자가 적정 수준의 활성 산소종을 발생시키면서도 세포 독성은 크지 않은 수준이었다. 유세포 분석법을 통해서 베타글루칸을 포함하는 나노 입자의 암세포인 HeLa 세포 대비 면역세포인 RAW264.7 세포에 대한 높은 친화도를 확인할 수 있었다. qPCR 결과에서 COX-2가 β G_{0.5X}-CpG-Ag NP를 처리했을 때 CpG-Ag NP보다 통계적으로 유의한 수준으로 증가하여 베타글루칸 사용에 따른 M1 분극화 유도 가능성을 확인하였다.

CpG 올리고뉴클레오타이드는 면역 보조제로써 활용되고 있지만, 세포에 도달하기까지 안전하게 유전자를 보호하고 세포 내

환경에서 효과적으로 유전자를 방출할 수 있는 운반체의 개발이 필요하다. 따라서 은나노입자와 천연고분자를 활용하여 CpG를 대식세포에 높은 친화도로 전달하고, CpG가 유도하는 면역 반응의 활성화를 도우며, 세포 내 환원성 환경에서 CpG를 효과적으로 방출하는 삼중 나노입자가 그러한 운반체에 대한 연구에 기여할 것으로 기대한다.

또한, 이 연구에서 사용한 보리 베타글루칸과 CpG 올리고뉴클레오티드를 은나노입자의 형태로 대식세포에 전달한 것을 바탕으로 하여, 질산염을 환원시킨 나노 입자를 다른 여러 면역조절 효과를 나타내는 천연고분자와 조합하여 면역 보조제로 사용되는 올리고뉴클레오티드를 전달함으로써 더 나은 대식세포 분극화 연구가 이루어질 수 있을 것이다. 더 나아가 암이나 자가 면역 질환 등 체내 면역 기능 저하로 인한 다양한 질병에 대해서 관련 연구가 진행되어 효과적인 치료법이 개발될 수 있을 것이다.

참고 문헌

- [1] Wang, Nan, Hongwei Liang, and Ke Zen, Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance, *Frontiers in immunology*, 5, 614 (2014)
- [2] Noy, Roy, and Jeffrey W. Pollard, Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy, *Immunity*, 41(1), 49-61 (2014)
- [3] De Jesus, Magdia, *et al.*, A population of Langerin-positive dendritic cells in murine Peyer's patches involved in sampling β -glucan microparticles, *PLoS One*, 9(3), e91002 (2014)
- [4] Elder, Matthew J., *et al.*, β -Glucan size controls dectin-1-mediated immune responses in human dendritic cells by regulating IL-1 β production, *Frontiers in immunology*, 8, 791 (2017)
- [5] Kim, Yong-Sik, *et al.*, Gram-negative bacteria-binding protein, a pattern recognition receptor for lipopolysaccharide and β -1, 3-glucan that mediates the signaling for the induction of innate immune genes in *Drosophila melanogaster* cells, *Journal of Biological Chemistry*, 275(42), 32721-32727 (2000)
- [6] Taylor, Philip R., *et al.*, The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages, *The Journal of immunology*, 169(7), 3876-82 (2002)
- [7] Goodridge, Helen S., Andrea J. Wolf, and David M., Beta-glucan recognition by the innate immune system, *Immunological reviews*, 230(1), 38-50 (2009)
- [8] Gross, Olaf, *et al.*, Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence, *Nature*, 459(7245), 433-

6 (2009)

[9] Shirota, Hidekazu, and Dennis M. Klinman, Recent progress concerning CpG DNA and its use as a vaccine adjuvant, *Expert review of vaccines*, 13(2), 299–312 (2014)

[10] Lim, Eun–Jung, *et al.*, Toll–like receptor 9 dependent activation of MAPK and NF–kB is required for the CpG ODN–induced matrix metalloproteinase–9 expression, *Experimental & molecular medicine*, 39(2), 239–245 (2007)

[11] Mukhtar, Mahwash, *et al.*, Drug delivery to macrophages: A review of nano–therapeutics targeted approach for inflammatory disorders and cancer, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 17(9), 1239–1257 (2020)

[12] Andrade, Raquel GD, *et al.*, Modulation of Macrophages M1/M2 Polarization Using Carbohydrate– Functionalized Polymeric Nanoparticles, *Polymers*, 13(1), 88 (2021)

[13] Zhang, Lu, *et al.*, Single–molecule force spectroscopy on curdlan: Unwinding helical structures and random coils, *Nano Letters*, 3(8), 1119–1124 (2003)

[14] Cai, Zhixiang, and Hongbin Zhang, Recent progress on curdlan provided by functionalization strategies, *Food Hydrocolloids*, 68, 128–135 (2017)

[15] Yan, Jing–Kun, *et al.*, Self–aggregated nanoparticles of carboxylic curdlan–deoxycholic acid conjugates as a carrier of doxorubicin, *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 333–340 (2015)

[16] Nasrollahi, Zahra, *et al.*, Functionalized nanoscale β –1,3–glucan to improve Her2 + breast cancer therapy: In vitro and in vivo study, *Journal of Controlled Release*, 202, 49–56 (2015)

- [17] Upadhyay, Tarun K., *et al.*, Preparation and characterization of beta-glucan particles containing a payload of nanoembedded rifabutin for enhanced targeted delivery to macrophages, *EXCLI Journal*, 16, 210–228 (2017)
- [18] Kyungwoo Lee, *et al.*, Self-Assembling β -Glucan Nanomedicine for the Delivery of siRNA, *Biomedicines*, 8(11), 497 (2020)
- [19] Liu, Qingye, Xiaojuan Xu, and Lina Zhang, Variable chain conformations of renatured β -d-glucan in dimethylsulfoxide/water mixture, *Biopolymers*, 97(12), 988–997 (2012)
- [20] Liu, Qingye, *et al.*, A novel gene carrier prepared from triple helical β -d-glucan and polydeoxyadenylic acid, *Journal of Materials Chemistry B*, 2(8), 933–944 (2014)
- [21] Bohn, John A., and James N. BeMiller, (1, 3)-b-d-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships, *Carbohydrate Polymers*, 28(1), 3–14 (1995)
- [22] Brown, Gordon D., and Siamon Gordon, Fungal beta-glucans and mammalian immunity, *Immunity*, 19(3), 311–5 (2003)
- [23] Adachi Y, *et al.*, Change of biological activities of (1, 3)-b-D-glucan from *Grifola frondosa* upon molecular weight reduction by heat treatment, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 38(2), 477–81 (1990)
- [24] Kim F, *et al.*, Stimulation of interferon-gamma-induced human myelogenous leukemic cell differentiation by high molecular weight PSK subfraction, *Anticancer Research*, 10(1), 55–8 (1990)
- [25] Okazaki, M., *et al.*, Structure-activity relationship of (1 \rightarrow 3)-b-D-glucans in the induction of cytokine production from macrophages, in vitro, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 18(10), 1320–1327

(1995)

[26] Ishibashi, K., *et al.*, Relationship between solubility of grifolan, a fungal 1,3- β -D-glucan, and production of tumor necrosis factor by macrophages in vitro, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 65(9), 1993–2000 (2001)

[27] Biao Han, *et al.*, Structure–Functional Activity Relationship of β -Glucans From the Perspective of Immunomodulation: A Mini–Review, *Frontiers in Immunology*, 11, 658 (2020)

[28] Geller, Anne, Rejeena Shrestha, and Jun Yan, Yeast derived β -d-glucan in cancer novel uses of a traditional therapeutic, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15), 3618 (2019)

[29] Alexander, Matthew P., *et al.*, Beta-glucan-induced inflammatory monocytes mediate antitumor efficacy in the murine lung, *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 67(11), 1731–1742 (2018)

[30] Qi, Chunjian, *et al.*, Differential pathways regulating innate and adaptive antitumor immune responses by particulate and soluble yeast-derived β -glucans, *Blood*, 117(25), 6825–6836 (2011)

[31] Huang, Haibin, *et al.*, Relative contributions of dectin-1 and complement to immune responses to particulate β -glucans., *The Journal of Immunology*, 189(1), 312–317 (2012)

[32] Fang, Jianping, *et al.*, Structure of a β -glucan from *Grifola frondosa* and its antitumor effect by activating dectin-1/Syk/NF- κ B signaling, *Glycoconjugate journal*, 29(5), 365–377 (2012)

[33] Masuda, Y., *et al.*, Soluble β -glucan from *Grifola frondosa* induces proliferation and dectin-1/Syk signaling in resident macrophages via the GM-CSF autocrine pathway, *Journal of leukocyte biology*, 91(4), 547–556 (2012)

[34] Ariizumi K, *et al.*, Identification of a novel, dendritic cell–

- associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning, *Journal of Biological Chemistry*, 275(26), 20157–20167 (2000)
- [35] Noriko Miyamoto, Shinichi Mochizuki, and Kazuo Sakurai, Designing an immunocyte-targeting delivery system by use of beta-glucan, *Vaccine*, 36(1), 186–189 (2018)
- [36] Jusaku Minari, *et al.*, Enhanced Cytokine Secretion from Primary Macrophages due to Dectin-1 Mediated Uptake of CpG DNA/ β -1,3-Glucan Complex, *Bioconjugate Chemistry*, 22(1), 9–15 (2011)
- [37] Steele, Chad, *et al.*, Alveolar macrophage-mediated killing of *Pneumocystis carinii* f. sp. muris involves molecular recognition by the Dectin-1 beta-glucan receptor, *The Journal of experimental medicine*, 198(11), 1677–1688 (2003)
- [38] Steele, Chad, *et al.*, The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*, *PLoS pathogens*, 1(4), e42 (2005)
- [39] Krieg, Arthur M., CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts?, *Nature Medicine*, 9(7), 831–5 (2003)
- [40] Verthelyi, Daniela, *et al.*, Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs, *The Journal of Immunology*, 166(4), 2372–7 (2001)
- [41] Hartmann, Gunther, *et al.*, Davis HL, Krieg AM, Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo, *The Journal of Immunology*, 164(3), 1617–24 (2000)
- [42] Vollmer, Jörg, *et al.*, CpG oligodeoxynucleotides stimulate IFN-gamma-inducible protein-10 production in human B cells, *Journal of endotoxin research*, 10(6), 431–8 (2004)
- [43] Perrie, Yvonne, *et al.*, Vaccine adjuvant systems: enhancing the

efficacy of sub-unit protein antigens, *International journal of pharmaceuticals*, 364(2). 272–280 (2008)

[44] Hemmi, Hiroaki, *et al.*, A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA, *Nature*, 408(6813), 740–745 (2000)

[45] Takeshita, Fumihiko, *et al.*, Cutting edge: role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells, *The Journal of Immunology*, 167(7), 3555–3558 (2001)

[46] Yi, Ae-Kyung, *et al.*, CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species, *The Journal of Immunology*, 160(10), 4755–4761 (1998)

[47] Häcker, Hans, *et al.*, Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6, *The Journal of experimental medicine*, 192(4), 595–600 (2000)

[48] Hanagata, Nobutaka, Structure-dependent immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides and their delivery system, *International journal of nanomedicine*, 7, 2181 (2012)

[49] Zhu, Yufang, *et al.*, Design of mesoporous silica/ cytosine-phosphodiester-guanin oligodeoxynucleotide complexes to enhance delivery efficiency, *The Journal of Physical Chemistry C*, 115(2), 447–452 (2011)

[50] Pan, Xiaogang, *et al.*, Antitumor activity of G3139 lipid nanoparticles (LNPs), *Molecular pharmaceuticals*, 6(1), 211–20 (2009)

[51] Chen, Helen C., *et al.*, Effects of particle size on toll-like receptor 9-mediated cytokine profiles, *Biomaterials*, 32(6), 1731–7 (2011)

[52] Zhi, Chunyi, *et al.*, BN nanospheres as CpG ODN carriers for activation of Toll-like receptor 9, *Journal of Materials Chemistry*,

21(14), 5219–5222 (2011)

[53] Sokolova, Viktoriya, *et al.*, The use of calcium phosphate nanoparticles encapsulating Toll-like receptor ligands and the antigen hemagglutinin to induce dendritic cell maturation and T cell activation, *Biomaterials*, 31(21), 5627–33 (2010)

[54] Zhu, Yufang, *et al.*, Hollow mesoporous silica/poly(L-lysine) particles for codelivery of drug and gene with enzyme-triggered release property, *The Journal of Physical Chemistry C*, 115(28), 13630–13636 (2011)

[55] Demento, Stacey L., *et al.*, TLR9-targeted biodegradable nanoparticles as immunization vectors protect against West Nile encephalitis, *The Journal of Immunology*, 185(5), 2989–97 (2010)

[56] Petty, Jeffrey T., *et al.*, DNA-templated Ag nanocluster formation, *Journal of the American Chemical Society*, 126(16), 5207–5212 (2004)

[57] David-Cordonnier, Marie-Hélène, *et al.*, Covalent binding of antitumor benzoacronycines to double-stranded DNA induces helix opening and the formation of single-stranded DNA: unique consequences of a novel DNA-bonding mechanism, *Molecular cancer therapeutics*, 4(1), 71–80 (2005)

[58] Gao, Shanshan, *et al.*, The synergistic effect of homocysteine and lipopolysaccharide on the differentiation and conversion of raw264.7 macrophages, *Journal of Inflammation*, 11, 13 (2014)

[59] Guo, Shanshan, *et al.*, Synergistic anti-inflammatory effects of nobiletin and sulforaphane in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 2157–2164 (2012)

[60] Gong, Min, Xiaozhen Zhuo, and Aiqun Ma, STAT6 upregulation

promotes M2 macrophage polarization to suppress atherosclerosis, *Medical Science Monitor Basic Research*, 23, 240–249 (2017)

[61] Wang, Qingshan, *et al.*, Fra-1 protooncogene regulates IL-6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages, *Cell Research*, 20, 701–712 (2010)

[62] Cui, W., *et al.*, Physicochemical properties and structural characterization by two-dimensional NMR spectroscopy of wheat β -D-glucan—comparison with other cereal β -D-glucans, *Carbohydrate Polymers*, 41(3), 249–258 (2000)

[63] Noss, Ilka, *et al.*, IgG to Various Beta-Glucans in a Human Adult Population, *International archives of allergy and immunology*, 157(1), 98–108 (2012)

[64] Charhouf, I., *et al.* Characterization of a dialdehyde chitosan generated by periodate oxidation, *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR)*, 16(2), 336–348 (2014)

[65] Hirano, Shigehiro, Tamotsu Fukuda, and Motonori Sato, Periodate oxidation of some carbohydrates as examined by NMR spectroscopy, *Agricultural and Biological Chemistry*, 38(12), 2539–2543 (1974)

[66] Synytsya, Andriy, and Miroslav Novak, Structural analysis of glucans, *Annals of translational medicine*, 2, 2 (2014)

[67] Sarip, Harun, *et al.*, A review of the thermal pretreatment of lignocellulosic biomass towards glucose production: autohydrolysis with DIC technology, *BioResources*, 11(4), 10625–10653 (2016)

[68] Zauner, Wolfgang, Manfred Ogris, and Ernst Wagner, Polylysine-based transfection systems utilizing receptor-mediated delivery, *Advanced drug delivery reviews*, 30(1–3), 97–113 (1998)

[69] Kou, Longfa, *et al.*, The endocytosis and intracellular fate of

nanomedicines: Implication for rational design, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(1), 1–10 (2013)

[70] Park, Jeongsin, *et al.*, Size dependent macrophage responses and toxicological effects of Ag nanoparticles, *Chemical communications*, 47(15), 4382–4384 (2011)

[71] Foroozandeh, Parisa, and Azlan Abdul Aziz, Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles, *Nanoscale research letters*, 13(1), 339 (2018)

[72] Dausend, Julia, *et al.*, Uptake mechanism of oppositely charged fluorescent nanoparticles in HeLa cells, *Macromolecular bioscience*, 8(12), 1135–1143 (2008)

[73] Panariti, Alice, Giuseppe Misericchi, and Ilaria Rivolta, The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: disrupting or enabling functions?, *Nanotechnology, science and applications*, 5, 87 (2012)

[74] Nguyen, Kathy C., *et al.*, Comparison of toxicity of uncoated and coated silver nanoparticles, *Journal of Physics: Conference Series*, 429(1), 012025 (2013)

[75] Taciak, Bartłomiej, *et al.*, Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages, *PloS one*, 13(6), e0198943 (2018)

[76] Martinez, Fernando O., and Siamon Gordon, The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment, *F1000prime reports*, 6 (2014)

[77] Stempin, Cinthia C., *et al.*, Arginase in parasitic infections: macrophage activation, immunosuppression, and intracellular signals, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 683485 (2009)

[78] Xu, Lingyun, *et al.*, Arginase and autoimmune inflammation in the

central nervous system, *Immunology*, 110(1), 141–148 (2003)

[79] Kavalukas, Sandra L., *et al.*, Arginase inhibition promotes wound healing in mice, *Surgery*, 151(2), 287–295 (2012)

Abstract

Barley β –glucan/CpG ODN /Ag nanocomplexes for macrophage targeting and polarization

Migyeom Lee

Department of Agriculture, Forestry and Bioresources

The Graduate School

Seoul National University

In this study, a triple nanocomplex of barley beta glucan/CpG oligonucleotide/silver nanoparticles that can deliver CpG oligonucleotide used as an immunosuppressive agent and barley beta glucan used to treat various immune diseases was developed, confirming its high affinity to RAW264.7 cells and polarization effect into M1 phenotype. The number average molecular weight of oxidized beta glucan, OXBG 0.5X, 1X, 2X was 4.2 kDa, 3.0 kDa, 2.0 kDa, respectively. Their weight average molecular weight was 22.9 kDa, 13.9 kDa, 9.2 kDa, respectively. In addition, measured aldehyde in OXBG 0.5X, 1X, 2X was 1.07 mmole/g, 2.39 mmole/g, 3.81 mmole/g, with a calculated oxidation degree of 14.14, 31.66 and 50.35%, respectively. The oxidation degree and molecular weight of beta glucan affected stability of the prepared nanoparticles, and β G_{1X}-CpG-Ag NP showed aggregation in serum-free media after 4h incubation at 37°C.

The size and shape of the silver nanoparticles determine surface area capable of releasing silver ions, thus the smaller the size, the more reactive oxygen species are induced and has higher cytotoxicity. All particles showed no cytotoxicity, except when highest concentration was treated. CpG-Ag NP and β G_{0.5X}-CpG-Ag NP with modified surface took more time to produce reactive oxygen species compared to Ag NP with exposed surfaces. When β G_{0.5X}-CpG-Ag NP was treated, DCF fluorescence did not increase after 4 h incubation. However, it increased up to 1.74 times after 8 h incubation compared to non-treated cells, which is similar level compared to Ag NP. Through flow cytometry experiment, higher affinity for RAW264.7 cells, compared to HeLa cells, of nanoparticles containing beta glucan was confirmed. RAW264.7 cells treated with β G_{0.5X}-CpG-Ag NP showed uptake efficiency of 85.0%, which was much higher than 33.9% of CpG-Ag NP. In qPCR experiment, expression levels of M1 polarization markers (iNOS, COX-2) increased in RAW264.7 cells treated with CpG-Ag NP and β G_{0.5X}-CpG-Ag NP after 24 h incubation. Also, β G_{0.5X}-CpG-Ag NP induced increased expression of COX-2, which was statistically greater than the result of CpG-Ag NP. In conclusion, triple nanocomplex including beta glucan showed high affinity towards RAW264.7 cells and showed potential in M1 polarization of macrophages.

Keywords : Barley beta glucan, CpG oligonucleotide, silver nanoparticle, immune adjuvant, gene delivery, macrophage, M1 polarization

Student Number : 2020-29435