2009년도 대한전기학회 하계학술대회 논문집 2009. 7. 14 - 17

파라쿼트 농도에 따른 HepG2 세포의 물리적 특성 변화와 실시간 모폴로지 관찰

이동윤*, 강현욱**, Hiroshi Muramatsu**, 권영수*†
*동아대학교 전기공학과, **동경공과대학 응용생물학부

Physical Property and Morphology Observation of HepG2 Cells by Various Concentration of Paraquat

Dong-Yun Lee*, Hyen-Wook Kang**, Hiroshi Muramatsu**, Young-Soo Kwon*†
*Dept. of Electrical Eng., Dong-A University, **School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo University of Technology

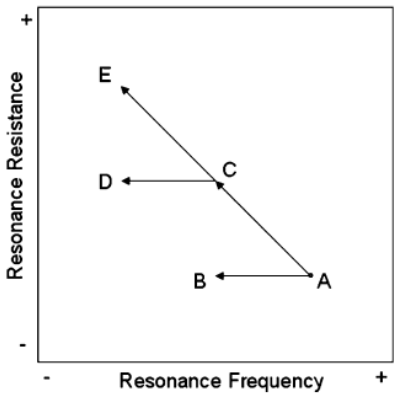
Abstract - Paraquat is well-known to cause hepatotoxic responses in human and other mammal species. In solution, it forms free radicals and charge-transfer complex of which formation plays an important role in determination of its biological activity in the presence of various anions. The HepG2 cells were cultured onto a quartz crystal sensor which is possible to detect the density and a viscosity changes using the resonance frequency (F) and the resonance resistance (R). The plot of F-R diagram is able to explain the rheological change of cells onto the surface of the quartz crystal sensor. In this paper, we investigated the physical properties of the HepG2 cells cultured onto a ITO electrode of the quartz crystal sensor according to the paraquat injection at various concentrations (100 mM, 10 mM, 1 mM). We also observed the morphological changes with a micro CCD camera, simultaneously. The HepG2 cells were cultured onto the ITO electrode surface of the quartz crystal modified a collagen film in CO_2 incubator. After the paraquat injection, we observed the changes of the morphologies by the micro CCD camera depending on time and analyzed the physical changes of cells on the electrode surface of quartz crystal using F-R diagram. From all results, we proved the effect of paraquat at various concentrations which is led to an apoptosis such as weakening and death of the cells by oxidation and reduction reaction that were produced the superoxide anions and other free radicals.

1. 서 론

호기성 물질대사에서 산소는 생명유지에 필수적인 요소지만, 대사과정에서 생성되는 superoxide radical (O_2^-), hydroxyl radical (OH), hydrogen peroxide (H_2O_2) 등과 같은 유독성을 나타내는 활성기 산소들은 세포막의 구성성분인 인지질과 반응성이 강한 것으로 알려져 있다 [1]. 이러한 활성기 산소는 비단백성 대사물질의 자기산화나 오존의 흡입, 파라쿼트와 같은 산화제에 의해 생성된다 [2]. 제초제로 널리 쓰이는 파라쿼트(1,1´-dimethyl-4,4´-byphyridinium dichloride; Paraquat)는 생체 내의 철 이온으로부터 전자를 받아 환원된 후, 용존산소와 반응하여 활성기 산소들을 생성시키는 비선택적 중독 약물이다 [3]. 즉, 파라쿼트 중독으로 발생되는 활성기 산소들에 의해 세포막의 손상 및 세포의 기능 상실이 유발된다.

수정진동자는 공진주파수 변화를 측정함으로써 1ng 단위의 질량변화를 관측할 수 있는 분석소자로 널리 활용되고 있다 [4]. 그림 1은 수정진동자의 공진주파수(F)와 공진저항(R)의 상호관계를 나타내고 있다. F-R 다이어그램은 수정진동자 표면에 질량부하가 발생할 때, 질량부하에 의한 표면의 상태 변화를 나타낸다. 수정진동자의 초기 공진특성이 A 영역에 존재한다고 가정하면 표면에 탄성을 가지는 질량부하가 거동하면 B 영역으로 이동하고, 점탄성을 가지는 질량부하가 거동하면 C 영역으로 이동한다. C 영역에서 2차로 질량부하가 발생하여 점성이 증가하면 E 영역으로 이동하고, 영향을 미치지 못하면 D 영역으로 이동하게 된다. 즉, 질량부하와 점탄성에 의한 수정진동자 표면에서의 상태 변화는 공진특성을 이용하여 분석할 수 있다.

본 연구에서는 다양한 농도의 파라쿼트 주입에 따른 세포의 물리적 특성은 수정진동자의 공진특성으로 분석하였으며, 그에 따른 실시간 모폴로지 변화는 micro CCD 카메라를 이용하여 관찰, 분석하였다.



<그림 1> 수정진동자의 공진주파수와 공진저항의 상호관계. (F-R 다이어그램의 기본적인 형태)

2. 실 험

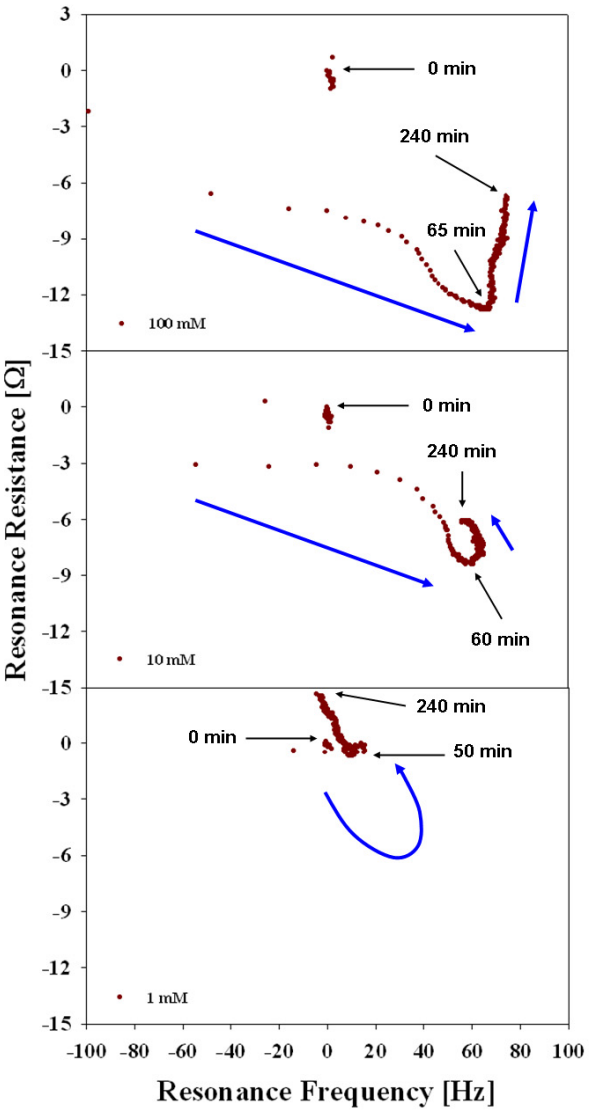
실험에 사용한 HepG2 세포는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma, USA) 배양액에 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Germany)를 첨가하여 CO_2 인큐베이터(5% CO_2, 37°C)에서 배양하였다.

수정진동자(9MHz, 5mm diameter, At-cut)의 표면은 모폴로지 관찰을 용이하게 하기 위하여 투명한 ITO 전극을 스퍼터링하여 제작하였다. 제작된 수정진동자는 안정화 시간을 거친 후, 세포의 성장을 위하여 콜라겐 용액(2%, 50$\mu\ell$)을 전극 표면에 2시간 이상 코팅하였다. 콜라겐이 코팅된 수정진동자의 ITO 전극 위에 1.5 × 10^5 개의 HepG2 세포를 주입(50$\mu\ell$)하여 성장시켰다. 성장한 세포에 다양한 농도의 파라쿼트를 주입한 후, 세포의 상태 변화를 수정진동자의 공진주파수와 공진저항의 변화와 모폴로지 관찰을 통하여 실시간으로 분석하였다.

3. 결과 및 토의

챔버 내에 주입된 HepG2 세포는 수정진동자의 ITO 전극 표면에서 지속적으로 성장하고 있는 것을 공진주파수의 감소와 공진저항의 증가로 확인하였다. 또한, F-R 다이어그램에 의하면 전극 표면에서 세포의 성장으로 질량과 점성이 증가하고 있음을 알 수 있다.

그림 2는 챔버 속에서 일정시간 이상 성장한 세포에 파라쿼트 농도 변화에 따른 F-R 다이어그램 특성을 나타내고 있다. 농도에 관계없이 파라쿼트 주입후 공진주파수는 증가하고 공진저항은 감소하고 있다. 이러한 결과는 세포가 죽거나 활동성이 약해져서 수정진동자의 전극표면에서 질량과 점성이 변하고 있음을 알 수 있다 [5]. 그러나 농도가 높을수록 공진저항이 감소하는 폭이 더 크고 더 오랜 시간동안 영향을 미치고 있음을 확인할 수 있다. F-R 다이어그램에서 공진주파수는 증가하고 공진저항은 감소하고 있지만 100 mM의 경우 65분, 10 mM의 경우 60분, 1 mM의 경우 50분 이후부터 공진주파수는 계속 증가하지만 공진저항이 증가하고 있음을 알 수 있다. 이것은 세포의 골격과 인테그린과 같은 세포내 단백질이 전극 표면에서 재정렬되고 있는 것을 나타낸다.

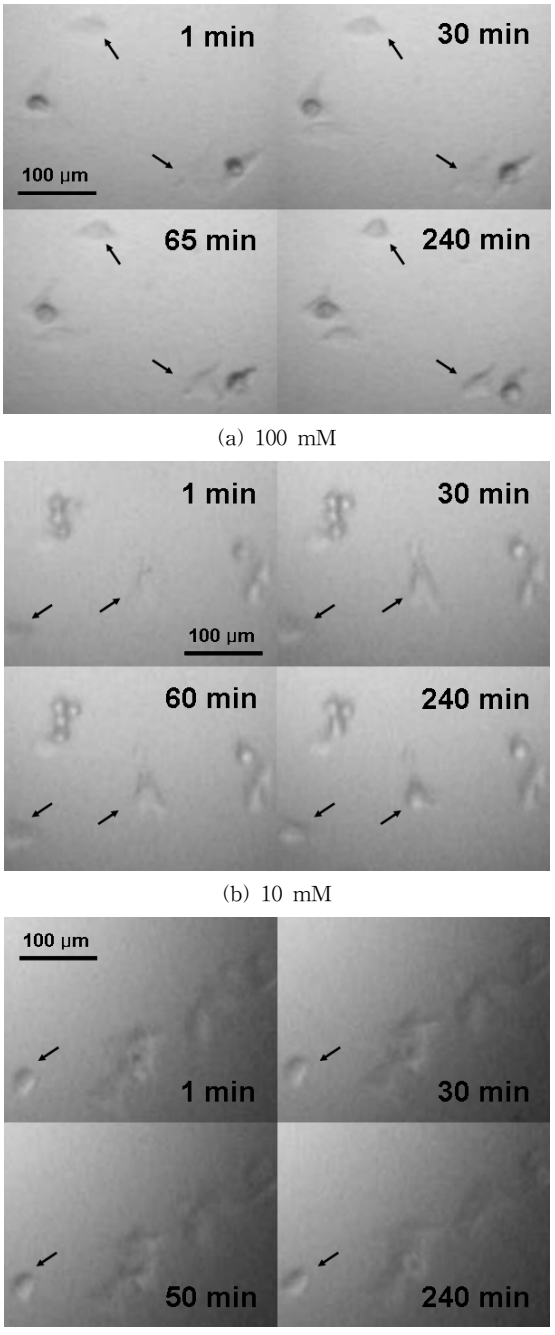


<그림 2> 파라퀴트 농도 변화에 따른 F-R 다이어그램.

그림 3은 파라퀴트 주입에 따른 HepG2 세포의 모폴로지를 실시간으로 관찰한 내용이다. (a)는 100 mM, (b)는 10 mM, (c)는 1 mM 농도에서의 모폴로지이다. 농도변화에 따라 반응이 일어나는 시점이 조금씩 다르게 나타나지만 파라퀴트 주입후 세포의 모양은 시간이 지날수록 크기는 작아져서 원래의 형태로 되돌아간다는 것을 알 수 있다. 그림에서 보면 세포의 크기가 처음보다 약 60% 크기로 작아졌음을 알 수 있다. 이것은 세포가 죽거나 활동성이 약해졌다는 것을 의미한다 [6].

4. 결 론

본 연구에서는 수정진동자를 이용하여 파라퀴트 농도 변화에 따른 HepG2 세포의 물리적 특성 변화를 분석하였으며, micro CCD 카메라를 이용하여 모폴로지의 변화를 실시간 관찰하였다. 파라퀴트 주입 후, 공진주파수는 증가하고 공진저항은 감소함을 알 수 있었다. 농도가 높을수록 공진주파수의 증가 및 공진저항의 감소폭이 크게 나타났으며, 반응이 지속되는 시간도 길게 나타났다. 동시에 측정된 모폴로지 관찰에 의해서도 세포의 크기가 점점 작아져서 원래 형태로 되돌아가는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 전극표면에서 세포가 죽거나 활동성이 약해졌다는 것을 의미한다. 이러한 특성은 세포와 같은 생체물질의 성장과 죽음에 수정진동자를 이용하여 물리적 특성 변화를 분석할 수 있는 센싱 시스템에 응용할 수 있을 것으로 기대된다.



<그림 3> 파라퀴트 주입에 따른 세포의 실시간 모폴로지 특성.

[참 고 문 헌]

[1] B. Descampiaux, M. Imbenotte, V. Desenclos, G. Vermeersch, M. Lhermitte, F. Erb, Chem. Res. Toxicol., 10, 34, 1997.
[2] A. Higuchi, K. Yonemitsu, A. Koreeda, S. Tsunenari, Toxicology, 183, 143, 2003.
[3] Wan-lin Yang and Albert Y. Sun, Neurochem. Res., 23(11), 1387, 1998.
[4] D.-Y. Lee, A.K.M. Kafi, S.-H. Park, Y.-S. Kwon, J. Nanosci. Nanotechnol. 6, 3657, 2006.
[5] H.-W. Kang, Y. Yamamoto, H. Muramatsu, Anal. Chim. Acta, 624, 154, 2008.
[6] H.-W. Kang and H. Muramatsu, Biosens. Bioelectron., 24, 1318, 2009.