

Membrane Penetration and Translocation of Nanoparticles

신동주, 현정인, 심은지*

연세대학교 화학과

서울특별시 서대문구 연세로 50 (120-749)

전화: 010-2520-4948, 이메일: sindupid@naver.com

Chemworks (or Chemworks2) ID: sindupid

ABSTRACT

Understanding interactions between nanoparticles and lipid bilayer membranes is of great importance due to the potential applications in bio-nanotechnology such as drug deliveries, carrying genes, and utilization of integral membrane proteins. To investigate the dynamics of nanoparticle penetration and translocation into membranes, we performed dissipative particle dynamics simulations which use simple and intuitive coarse-grained models yet effectively describe hydrodynamic interactions in cell environment. We discuss the influence of the shape of nanoparticles as well as the properties of membranes including large membrane-embedded proteins that are found to significantly affect orientation of nanoparticles within membranes and, in turn, the minimum force required to translocate nanoparticles.

keywords : Membrane, Penetration, Nanoparticles, Computer simulation

서론

나노입자는 약이나 단백질 등 여러 입자를 세포 안으로 운반할 수 있다. 하지만 나노입자는 세포에 독성을 띄기도 하는데 이는 세포 안으로 운반할 때 세포막을 투과하며 세포막을 파괴시키기 때문인 것으로 알려졌다. 따라서 나노입자가 세포막을 투과하는 과정은 지금까지 많은 연구가 진행되어 왔다. 하지만 나노입자의 모양에 따른 세포막의 투과성에 관한 연구는 다양하게 진행되어 있지 않다. 이에 우리는 크기가 비슷한 막대 모양의 나노입자 중 밑면의 모양에 따라 세포막을 관통할 때 어떻게 관통하는지, 세포막과 어떤 상호작용을 하는지에 대해 컴퓨터 시뮬레이션을 통해 연구하였다.

이론 및 계산방법

1) Coarse-Grained Model

단백질, 세포막과 같은 생체 분자는 이루는 원자의 개수가 너무 많아 MD 로 계산을 하는데 계산량이 많아지는 어려움이 있다. 계산의 효율성을 위해 주로 사용하는 방법이 Coarse-graining method 이다. 이는 여러 원자를 하나의 입자로 모사함으로써 전체 분자 모형을 보다 단순화 시킬 수 있는 장점이 있다. 본 연구에서는 세포막의 인지질 이중층을 구현하기 위해 지질분자를 친수성인 머리입자 2 개와 소수성인 꼬리입자 5 개, 총 7 개 입자로 구성된 선형 분자로 가정을 하였으며 동일한 지질분자 내에서 인접한 i 번째와 $i+1$ 번째 입자들은 조화진동자힘 ($U_s(=k_s(1-\frac{r_{li+1}}{l_0})^2)$)를 통해 서로 연결되어 있다고 가정하였다. $k_s = 128k_B T/r_c^2$ 이며, $l_0 = 0.5r_c$ 이다. 인접한 세 입자 사이의 각도도 결합각

포텐셜함수 $U_b(= k_s(1 - \cos(\theta - \theta_0)))$ 에 의해 조절되었다. 이 때, $k_b = 5k_B T/r_c^2$ 이며, $\theta_0 = 0$ 으로 설정되었다. 용매에 해당하는 물 분자는 계에 실질적으로 존재하는 하나의 입자로 묘사하였다. 모든 단위는 reduced unit 을 사용하였고 $r_c \equiv 0.8nm$ 이고 $\Delta t = 90ps$ 이다. 본 연구에서 사용된 모든 나노입자는 격자상수 $a = 0.28nm$ 에 의해 배열되었고 LAMMPS 프로그램을 사용하였다.

2) DPD (Dissipative Particle Dynamics) Method

본 연구에서는 나노입자의 세포막 투과 현상을 재현하기 위해 DPD (Dissipative Particle Dynamics) 방법을 사용하였다. DPD 는 Coarse-grained model 에서 주로 쓰이는 시뮬레이션 방법이며 유체역학과 같이 큰 계의 동역학을 연구하는데 유용한 계산 방법이다. DPD 는 뉴턴의 운동법칙을 따르며 각각의 입자에 세 가지 종류의 힘이 작용한다. Conservative pairwise force, dissipative force, random force 가 그것이다. 각각의 입자에 작용하는 총 합력은 다음과 같이 나타낼 수 있으며,

$$f_i = \sum_{j \neq i} (F_{ij}^C + F_{ij}^D + F_{ij}^R) \quad (1)$$

각 성분은 다음과 같이 정의된다.

$$F_{ij}^C = a_{ij} \left(1 - \frac{r_{ij}}{r_c}\right) \hat{e}_{ij} \quad F_{ij}^D = -\gamma \left(1 - \frac{r_{ij}}{r_c}\right)^2 (\hat{e}_{ij} \cdot v_{ij}) \hat{e}_{ij} \quad F_{ij}^R = \sqrt{2\gamma k_B T} \left(1 - \frac{r_{ij}}{r_c}\right) \zeta_{ij} \Delta t^{-\frac{1}{2}} \hat{e}_{ij} \quad (2)$$

본 연구에서 Conservative pairwise force 의 파라미터 a_{ij} 는 각 입자의 종류에 따라 다르게 설정하였다. 친수성 입자의 경우 같은 입자간 인력이 강하므로 반발력에 해당하는 파라미터를 작게 설정해 주었고 반대로 친수성과 소수성 입자와의 상호작용은 반발력이 크게 설정해 주었다. 각각의 입자 쌍에 해당하는 파라미터들은 다음과 같다.

a_{ij}	W	H	T	P
W	25	25	95	25
H	25	25	95	25
T	95	95	25	95
P	25	25	95	95

표 1. 입자들의 상호작용 파라미터

여기서 W 는 물 분자, H 는 인지질의 머리 부분, T 는 인지질의 꼬리 부분, P 는 나노입자에 해당하는 Coarse-grained 입자이다. Random force 의 경우 random seed 에 의해 새롭게 난수가 발생하는데 본 연구에서는 매 계산마다 적어도 4 번 이상 seed 를 바꾸어 가며 계산을 하여 평균값으로 결과를 얻었다.

3) LAMMPS (Large-scale Atomic/Molecular Massively Parallel Simulator)

본 연구에서 사용한 LAMMPS 는 분자동역학을 계산하기 위한 프로그램으로 병렬계산을 할 수 있는 특징이 있다. LAMMPS 의 명령어를 통해 입자들 간의 potential 을 원하는 대로 설정하여 계산을 할 수 있는데, 예를 들어, rigid 명령어를 통해 rigid 한 나노입자를 구현할 수도 있다. 본 연구에서는 나노입자가 세포막을 투과하는 것을 재현하기 위해 나노입자에 addforce 명령어를 통해 인위적으로 힘을 더해주었다. 이 때 나노입자에 가하고 싶은 총 힘을 나노입자의 개수로 나누어 힘을 골고루 분산시켰다. 모든 계산은 세 단계로 이루어졌는데 먼저 $t=0.001$ 의 시간단위로 나노입자에 아무런 힘을 가하지 않고 50000step 만큼 전체 계를 안정화 시킨 후 $t=0.02$ 로 20000step 만큼 다시 한번 안정화를 시킨다. 그 후 본격적으로 나노입자에 일정한 힘을 가한 후 세포막에 대한 투과성을 관찰하였다. 이 단계는 모든 계산에서 100000step 이상으로 진행하였다. 이 때

투과성을 판단하는 척도로 최소힘 개념을 사용하였다. 이는 힘을 5 단위로 변화시키며 입자가 세포막을 뚫을 수 있는 최소의 힘이다. 모든 나노입자의 초기위치는 세포막으로부터 $2.0r_c$ 만큼 위에 배치하였다. 시뮬레이션 계의 크기는 $40 \times 40 \times 48$ (reduced unit)이며 모든 방향이 PBC (Periodic Boundary Condition)에서 진행되었다. 또한 나노입자를 제외한 부분의 밀도가 3.00 이 되도록 용매를 계에 골고루 배치하였다. 이 때 용매는 세포막의 내부로 침투하지 않도록 설정했다.

결과 및 토의

1) 온도, 밀도에 따른 세포막 요동

인지질분자의 개수	2950	3450	3950	4450	4950

표 2. 세포막 내 인지질 분자의 개수에 따른 요동의 변화

세포막은 DPD 시뮬레이션 내에서 평평하게 있지 않고 굴곡이 생기게 된다. 이러한 요동은 실제 세포막에서는 거의 존재하지 않으며 이러한 요동이 생김으로써 매 계산마다 결과의 정밀도가 떨어지는 현상을 발견하였다. 따라서 본 연구에서는 요동을 최대한 줄이기

위해 DPD 시뮬레이션에서의 온도와 세포막에 있는 인지질 분자의 수를 조절하여 세포막의 밀도를 변화시켜 요동의 변화를 계산하였다. 표 1 은 실제로 세포막의 밀도를 변화시킨 후 초기화 과정을 거쳤을 때 모양이 어떻게 변하는지 알아본 것이다. 이로 보았을 때 세포막의 밀도가 커질수록 세포막의 Fluctuation 은 점점 커진다는 것을 알 수 있으며 3450 개부터는 거의 요동이 없음을 알 수 있었다.

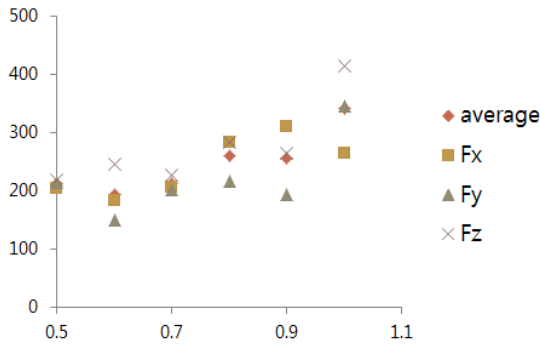


그림 1. 온도에 따른 표면장력

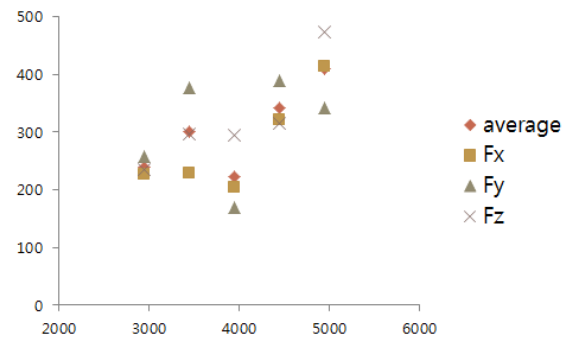


그림 2. 밀도에 따른 표면장력

이를 보다 정량적으로 알기 위해 표면장력을 임의로 정의를 하여 구하였다. 세포막을 16 등분하여 각각의 구간에서 세포막의 모든 입자의 x 방향 힘, y 방향 힘, z 방향 힘을 더한다. 그 후 각 구간에서의 표준편차를 구하면 그것이 얼마나 힘이 분산되어 있나를 나타내준다고 생각하였다. 따라서 온도를 0.5 에서 1.0 까지 변화시키며 계산을 하니 그림 1 과 같은 결과가 나왔다. 온도가 증가할수록 표면장력, 즉 요동은 증가한다. 또한 그림 2 는 밀도에 따른 표면장력의 변화인데 여기서도 밀도가 증가 할수록 표면장력이 증가하는 경향을 볼 수 있다. 이는 표 2 에서 그림으로 본 결과와 일치한다. 우리는 여러 추가적인 실험 결과 앞으로의 계산에서 너무 밀도가 낮지 않으면서 요동이 최소화 되는 3750 의 밀도를 선택하였고 온도는 일반적으로 사용되는 1.0 으로 선택하여 계산을 하였다.

2) 움직임 제한 모형

나노입자에 힘을 인위적으로 주어 세포막을 투과하는 계산을 하다 보니 문제점이 발생하였다. 세포막이 나노입자에 밀려 계속 나노입자와 같이 가속되며 내려가는 것이다. 실제 상황에서는 세포막이 내려가지 않는다. 따라서 세포막을 고정시켜주는 제한 모형이 필요하게 되었다. 세포막을 고정시키는 방법에는 두 가지가 있는데 먼저 결의 분자들의 질량을 크게 늘려서 전체적으로 움직이지 않도록 직접적인 제한조건을 거는 방법과 아무런 힘을 가하지 않고 그대로 계산을 하여 계산 후 결과파일을 수정하여 세포막의 무게중심을 계산하여 가운데로 고정시키는 방법이 있다. 본 연구에서는 두 가지 방법 모두 사용하여 계산을 한 후 더 합리적인 방법을 택하기로 하였다.

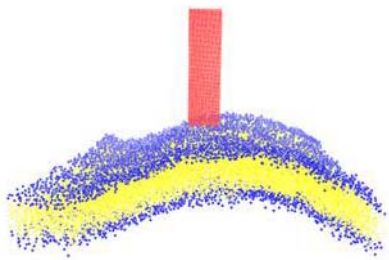


그림 3-(a). 제한조건을 걸지 않은 경우

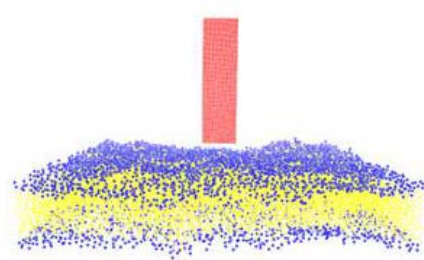


그림 3-(b). 제한조건을 건 경우

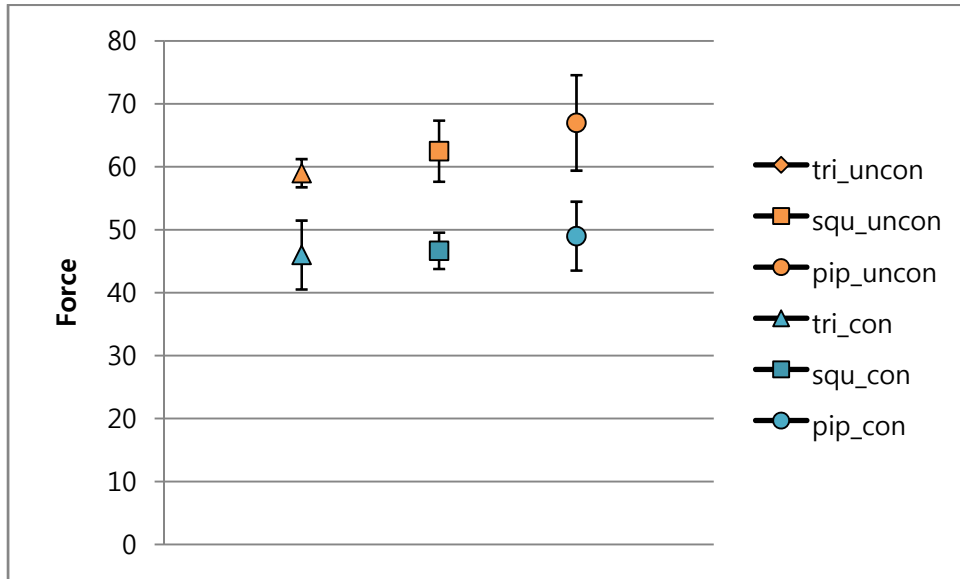


그림 4. 두 가지 제한 모형으로 측정한 모양 별(삼각기둥, 사각기둥, 원기둥) 최소힘. 주황색은 제한조건을 걸지 않고 결과파일만 고정시킨 것이고 청록색은 세포막의 주변에 질량이 큰 분자를 배치하여 고정시킨 것

계산 결과 두 가지 사실을 알 수 있었다. 그림 3-(a)와 3-(b)와 같이 제한조건을 걸게 되면 걸지 않았을 때보다 세포막의 요동이 현저하게 줄어든다는 것이다. 또한 그림 4의 결과를 보았을 때 알 수 있는 점은 제한조건을 걸었을 때가 걸지 않았을 때보다 세포막을 투과하는데 더 힘이 많이 든다는 것이다. 하지만 제한조건의 경우에는 양쪽 끝이 너무 움직이지 않아 인위적인 느낌이 강했고 본 연구에서는 제한조건을 시키지 않은 모형이 좀 더 합당하다고 판단하였다.

3) 입자의 모양과 배치에 따른 최소힘

입자의 모양(사각기둥, 삼각기둥, 원기둥)에 따라서 최소힘이 어떻게 달라지는지 계산을 하였고 모양 뿐만 아니라 초기의 배치(방향)에 따라서도 어떻게 달라지는지

계산하였다.

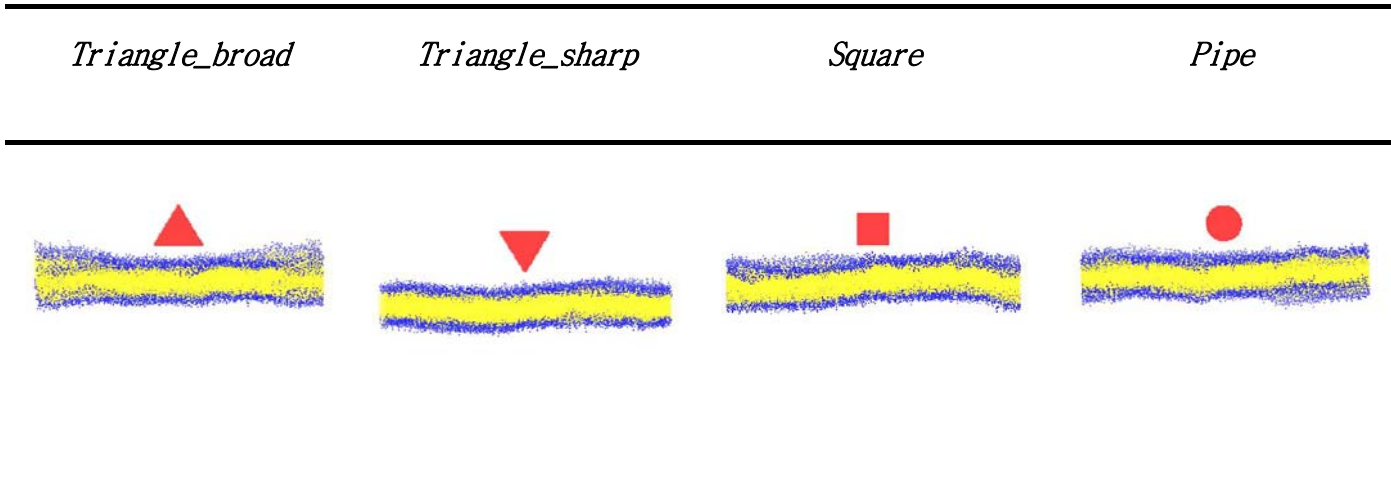


표 3. 여러가지 모양의 90 도 회전한 초기 배치, 세포막과 나노입자 사이의 간격은 항상 2.0 이다.

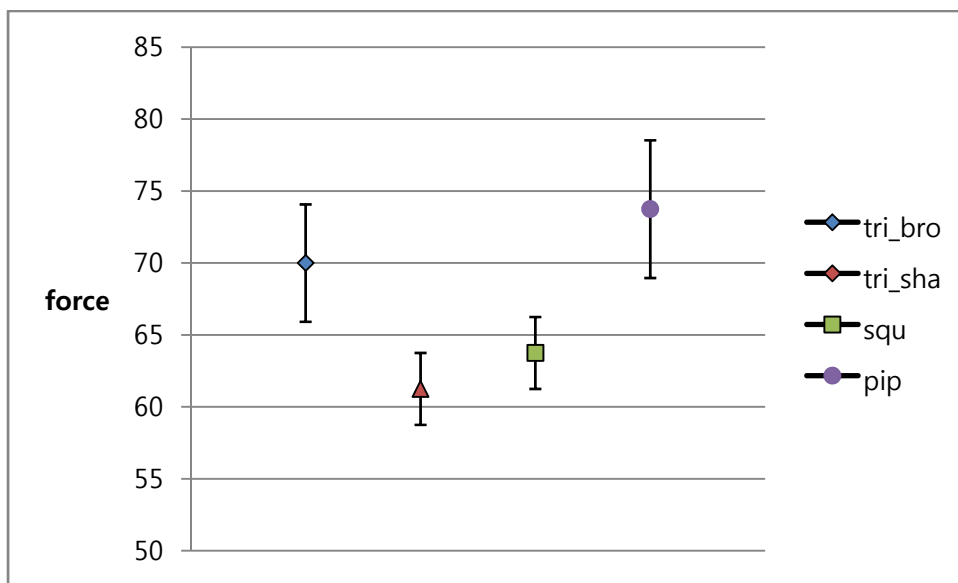


그림 5. 90 도 회전시킨 나노입자들의 모양별 최소힘

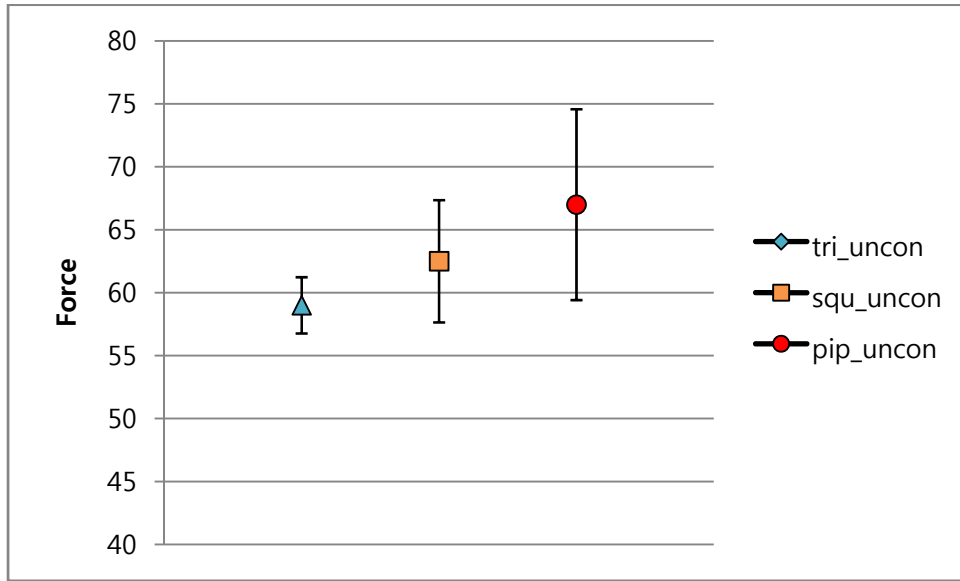


그림 6. 세포막의 표면에 수직하게 배치된 모양 별 나노입자의 최소힘

나노입자의 모양과 배치에 따라 최소힘이 어떻게 달라지는지 알아보기 위하여 세포막에 수직인 방향으로 배치한 것과 그것을 90 도로 돌려 배치한 것 두 가지 경우에 대해 각각 모양 별로 최소힘을 측정하였다. 표 3 은 90 도로 돌려 배치한 나노입자들을 나타낸 것이고 모든 모든 입자의 경우 세포막으로부터 2.0 의 거리만큼 떨어진 곳에 배치하였다. 이로써 세포막에 닿을 때의 속도를 비슷하게 할 수 있었다. 그림 5 의 결과를 보았을 때 모양에 대해서는 삼각기둥의 경우가 가장 잘 투과되었고 다음으로 사각기둥 원기둥 순으로 투과가 잘 되었다. 마찬가지로 90 도 회전시켜 평평하게 떨어뜨린 그림 6 의 결과에 대해서도 모양에 대한 경향성은 삼각기둥>사각기둥>원기둥 순으로 일정하였다. 하지만 이 경우 맨 처음 배치가 삼각기둥의 뾰족한 모서리가 아래를 바라볼 수도 있고 평평한 면이 아래를 바라볼 수도 있어서 두 가지 경우에 대해서 최소힘을 비교해 본 결과 뾰족한 모서리가 아래를 바라볼 경우 훨씬 잘 투과됨을 확인할 수 있었다. 이로 보았을 때 입자의 모양뿐만 아니라 입사할 때의 각도도 세포막의 투과에 중요한 영향을 끼치는 것으로

보인다.

전체적으로 세워서 떨어뜨렸을 때와 눕혀서 떨어뜨렸을 때 두 가지 경우를 비교해 보면 눕혀서 떨어뜨렸을 때 더 많은 힘이 드는 것을 확인할 수 있다.

결론

본 연구에서는 세포막의 밀도, 온도에 따른 요동을 관찰하고 나노입자의 모양에 따라 세포막을 투과하는 경향성을 LAMMPS 프로그램을 이용하여 알아보았다. 계산에는 Coarse-grained model 이 사용되어 계산을 간단화 하였으며 유체역학을 잘 표현할 수 있는 DPD 방법이 사용되었다. 계산결과, 세포막의 밀도를 증가시킬수록 세포막의 요동과 표면장력은 증가하는 경향을 보였고 마찬가지로 DPD 시뮬레이션의 온도를 증가시킬수록 요동이 증가하였다. 이에 적절한 온도와 밀도를 선택할 수 있었으며 이러한 온도와 밀도를 가지고 나노입자의 모양에 따른 최소힘을 측정하였다. 이 때 발생한 세포막이 나노입자와 같이 내려가는 문제점은 세포막의 무게중심을 좌표의 가운데로 옮기는 프로그램을 만듦으로써 해결할 수 있었다. 추가적으로 질량이 큰 분자를 세포막 주변에 배열했을 때 최소힘이 더 작게 나오는 것으로 보아 실제로 질량이 큰 단백질이 세포막 곳곳에 존재한다면 더 쉽게 나노입자가 투과할 수 있지 않을까 하는 의문도 든다. 이는 향후 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다. 계산 결과, 삼각기둥>사각기둥>원기둥 순으로 투과가 잘 되었으며 눕혀서 떨어뜨렸을 때 보다 세워서 떨어뜨렸을 때 더 투과가 잘 되었다. 추가로 삼각기둥의 경우 뾰족한 모서리로 떨어뜨릴 때와 평평한 면으로 떨어뜨릴 때 최소힘은 뾰족한 모서리가 훨씬 작게 측정되었다. 이러한 결과를 종합해 보았을 때 막대모양의 나노입자가 세포막을 투과할 때 밀면의 모양과 초기 배치가 중요한 영향을

끼친다는 것을 알 수 있다. 밀면의 모양의 경우 모서리의 개수가 많아질수록 더 투과하기 어려운 경향성을 보였다. 또한 세워서 떨어뜨릴 때와 눕혀서 떨어뜨릴 때 최소힘이 많이 차이 나는 것으로 보아 나노입자의 초기 배치 즉, 세포막에 입사할 때의 각도나 방향이 투과에 매우 큰 영향을 미치는 것을 확인할 수 있다. 향후 과제로 세포막의 온도나 밀도에 따라서 투과성은 어떻게 달라지는지, 균일하지 않은 단백질이 있는 세포막에 대해서는 투과성이 어떻게 달라질 것인지, 세포막과 나노입자 사이에 인력이 있는 경우에 대해서는 투과성이 어떻게 달라질 것인지에 대한 연구가 필요할 것으로 보인다.

참고문헌

1. Kai Yang; Yu-Qiang Ma. Computer simulation of the translocation of nanoparticles with different shapes across a lipid bilayer. *Nature nanotechnology*. 2010
2. Espagnol, P.&Warren, P. Statistical Mechanics of Dissipative Particle Dynamics. *Europhys. Lett.* 30, 191-196 (1995)
3. Shika Nangja; Radhakrishna Sureshkumar. Effects of Nanoparticle Charge and Shape Anisotropy on Translocation through Cell Membranes. *Langmuir*. 2012