

라만/형광 현미경을 이용한 글루타치온 분포연구:  
Intact Lens에서의 3차원 Imaging을 위한  
형광표지법 개발

劉 壽 昌

군산대학교 자연과학대학 화학과  
(1995. 8. 25 접수)

Study of Glutathione Distribution Using a  
Raman/Fluorescence Microscope: Development of the  
Fluorescence Labelling Method to the  
Intact Lens for Three Dimensional Imaging

Soo-Chang Yu

Department of Chemistry, Kunsan National University,  
Chonbuk 573-701, Korea  
(Received August 25, 1995)

수정체의 불투명성은 주로 단백질이나 비단백질인 글루타치온의 sulfhydryl 작용기(P-SH, G-SH)가 대량으로 산화가 됨으로써 수반된다. 환원형 글루타치온은 수정체에 존재하는 단백질의 -SH(P-SH) 작용기가 산화됨을 방지함으로써 수정체가 투명하게 유지되는데 매우 큰 역할을 담당하고 있다. 따라서 이러한 글루타치온의 감소는 외부의 스트레스에 의하여 단백질 등이 산화될 때 방어역할을 제대로 하지 못하게 됨으로써 수정체의 백내장이 유발되게 된다.<sup>1-5</sup>

수정체내에 존재하는 글루타치온의 양을 측정하는데 지금까지 여러 방법 등이 이용되어 왔으며<sup>6-9</sup> 최근들어서는 CDN(1-chloro-2,4-dinitrobenzene)을 글루타치온에 표지시킨 뒤 흡수분광기를 이용하여 그것을 정확하게 정량하는 방법<sup>10</sup>이 개발되었다. 그러나 이러한 방법들은 수정체의 균질화를 수반하는 이른바 invasive 방법이기 때문에 수정체의 한 단면을 따라 글루타치온의 양이 어떻게 분포되는지에 대해서는 알 수가 없었다. 최근들어 Yu 등은 라만/형광 현미경을 이용하여 수정체를 균질화시키지 아니하고 Fig. 1에 나타난 바와 같이 수정체의 visual

axis나 equatorial axis로 자른 후 단면에 존재하는 여러 형광물질의 공간분포(spatial distribution)를 mapping할 수가 있었다.<sup>11-13</sup> 이러한 방법은 수정체를 균질화시키지 않고 그대로 형상(morphology)을 유지시키면서 백내장을 유발하는 여러가지 화합물이 어떻게 분포되어 있는지를 알아보는 방법론을 제시했다는데 큰 기여를 했다. 하지만 여기에 mapping된 형광 물질들은 자체내에서 형광을 나타내기 때문에 전혀 어렵지 않게 그것들의 공간분포를 밝힐 수가 있었으나 자체 형광을 나타내지 않는  $Ca^{2+}$  이온이나 글루타치온과 같은 분자에 대해서는 라만/형광 현미경을 이용하여 그것들의 공간분포를 밝힐 수가 없었다. 따라서 선택성 및 감도가 좋은 라만/형광 현미경을 이용하여 자체 형광을 나타내지 않고 이온이나 분자의 공간분포를 밝힐 수 있다면 라만/형광 현미경의 응용성이 한층 넓어지리라 기대된다.

이에 본 실험에서는 자체 형광을 나타내지 않는 글루타치온의 국부적인 분포도를 나타내는데 CM-FDA(5-chloromethylfluorescein diacetate)라는 형광 probe를 사용하여 수정체 단면에서의 3차원 imaging을 처음으로 시도하게 되었다.

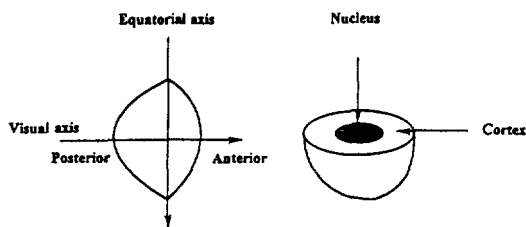


Fig. 1. 수정체 및 그의 visual axis를 따라 절단한 단면도.

### 실 험

이 실험에 필요한 라만/형광 현미경 장치는 자동으로 실험을 수행할 수 있게 Spex의 triplemate와 Zeiss 현미경을 조합으로 설계된 시스템으로 이 시스템의 특성과 자세한 설명은 다른곳에 잘 기술되어 있다.<sup>11-14</sup> 컴퓨터로 작동되는 X-Y translation stage를 이용하여 본실험에서는 21×24점의 데이터를 얻어 3차원으로 mapping하여 나타냈다. 형광 표지에 사용되는 형광 probe는 521 nm에서 최대형광을 나타내므로 Ar<sup>+</sup> 레이저(coherent)의 488 nm로 들뜨게 한 다음 521 nm에 단색화 장치를 고정시켜 sampling되는 각 점에서 형광의 상대적인 세기를 기록하여 그것을 3차원으로 imaging하였다. 이때 사용한 레이저빔 spot의 크기는 직경이 약 1~8 μm 정도이며 샘플의 가로 또는 세로의 길이가 0.5~1 cm 정도이므로 어떤 한 점에 존재하는 형광 probe가 연속된 빔에 의해서 depletion될 가능성이 배제되었다. 형광표지를 위한 probe로서는 Molecular Probe 회사로부터 구입한 CMFDA를 사용하였는데 그것의 사용법은 이 회사의 protocol을 따랐다. 이 형광probe는 글루타치온의 -SH기에 있는 수소 하나가 떨어져 나감으로써 형광표지가 되게 되는데 이것의 장점은 특히 -SH기를 가지는 단백질과 같은 다른 분자가 혼합되어 존재한다 하더라도 선택적으로 글루타치온과만 달라붙게 되어 있다.<sup>15,16</sup>

수정체는 1년 정도된 guinea pig으로부터 얻었으며 얻은 즉시 완충용액에 넣어 형광물질과 함께 약 24시간 동안 incubation시켰다. 형광표지가 된 수정체는 즉시 알루미늄블록에 옮겨진 뒤 -50℃되는 cold stage에 급랭시켰다. 급랭된 수정체는 visual axis를 따라서 면도날로 뒷부분의 반을 밀어내어 편평하게 한 다음 stage가 x-y축을 따라 sampling

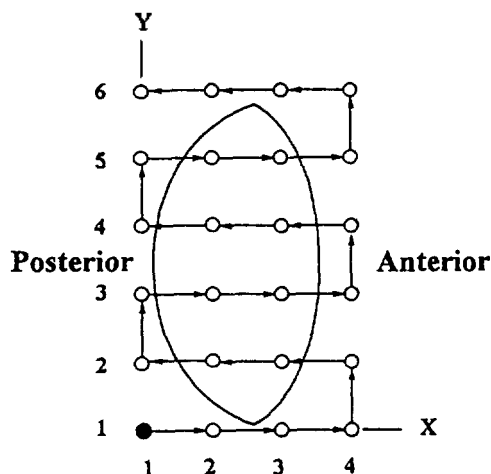


Fig. 2. 절단된 수정체를 포함하는 직사각형틀 안에서의 레이저빔이 scanning하는 경로. 수정체의 절단은 visual axis를 따라 이루어졌으며 equatorial 면에는 수직이다. 편의상 4×6점을 나타냈으나 실험에서는 21×24점에 대해서 레이저빔을 주사했다. 검은 점(1, 1)이 출발점이다.

하는 전지역에 걸쳐서 현미경의 대물렌즈가 똑같은 초점거리를 유지할 수 있게끔 평형을 맞췄다. 그런 다음 Fig. 2에 나타나 있는 순서대로 21×24점을 sampling하여 mapping을 하였다.

### 결과 및 고찰

Fig. 3에 나타나 있는 것은 글루타치온의 분포를 3차원으로 mapping을 한 투시도이다. 투시도에 나타난 Fig. 3의 ㉑는 전체를 알아 볼 수 있도록 나타낸 것이며 Fig. 3의 ㉒는 안쪽 부분인 핵(nucleus) 부분이 뚜렷이 보일 수 있도록 스펙트럼의 반절만을 나타내었다. 그림의 좌측이 posterior, 우측이 anterior에 해당된다. 각 점에서의 형광의 세기는 형광 probe의 농도 크기에 정비례하는 절대농도로 나타내지 않고 각 점에서의 상대적인 농도값을 임의로 scale하여 나타냈다. 투시도에 나타나 있는 것처럼 핵부분에서는 형광의 세기가 아주 약하게 나타나 있고 반면에 피질(cortex) 부분에는 아주 크게 나타나 있다. 이것은 곧 글루타치온의 양이 핵부분에서는 적고 반면에 피질부분에서 아주 많이 나타남을 의미한다. 이 형광 probe, CMFDA의 특징은 글루타치온과 함께 존재하는 글루타치온 s-transferase에

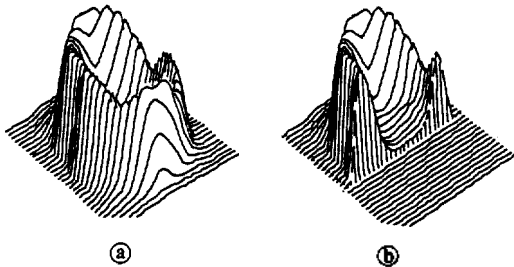


Fig. 3. ④ 수정체의 왼쪽면이 posterior이고 오른쪽면이 anterior이다. Visual axis를 따라 절단한 수정체 단면의 전체면에서 형광세기의 상대적인 크기를 나타내었다. 형광의 세기가 큰 곳인 가장자리 부분이 피질이며 형광의 세기가 약한 가운데 부분이 핵에 해당된다. 형광이 나타나지 않은 피질의 바깥부분은 알루미늄블록에 해당된다. ⑤ ④번과 똑같으나 핵 근처에서 가리움없이 뚜렷이 볼 수 있도록 반쪽면을 나타내지 않았다.

의해서 CMFDA의 acetate를 잘라내는 cytosolic esterase 과정을 거쳐 글루타치온과 결합하는데, 결합하기 전까지는 무색이며 또한 형광을 나타내지 않다가 결합 후에 형광을 나타낸다. 따라서 다른 형광물질에서처럼 결합되지 않아도 형광을 나타내어 data를 해석하는데 오류를 범할 수 있는 문제점을 해결할 수 있게 되었다. 이 실험의 결과는 다른 연구자의 결과와 잘 일치함을 보여준다. Barron<sup>14</sup>은 UV (ultraviolet) 빛에 의한 수정체의 damage를 알아보기 위해서 UV 빛에 의해서 고갈되는 -SH 양의 분포도에 대해서 라만 분광학을 이용하여 연구한 바 있다. 연구한 결과에 의하면 UV 빛에 의하여 생성된 수정체는 피질부분보다 핵부분에서 -SH의 양이 훨씬 더 적게 나타남을 발견하였다. 그것은 UV 빛 등과 같은 외부의 스트레스에 핵부분은 피질부분보다 더 쉽게 손상을 입어 단백질의 -SH가 crosslinking을 일으켜 disulfide를 생성하기 때문으로 해석하였다. 이것에 대한 이유는 피질부분에는 글루타치온의 양이 많아서 그만큼 스트레스를 잘 방어하지만 반면에 핵부분은 그렇지 못함을 나타내 주고 있는 것이다. 따라서 글루타치온에 선택적인 이 형광표지방법이 수정체의 형상을 변형시키지 않고 글루타치온의 분포도를 밝히는데 성공적인 결과를 가져다 주었음을 알 수가 있다. 그러나 이 표지방법에 사용하는 형광 probe와 함께 수정체를 incubation시켰을 때 과연 probe가 핵부분에까지 침투하는지에 관한 의문점을

가질 수도 있다. 왜냐하면 피질부분과 핵부분은 단백질의 밀도가 달라서 형광물질의 침투여건이 다르기 때문이다. 즉 피질부분에서는 단백질의 밀도가 낮아서 쉽게 침투를 해 글루타치온과 잘 달라붙을 수 있는 반면에 핵부분은 밀도가 높기 때문에 쉽게 침투를 해 들어갈 수가 없어서 글루타치온과의 결합 기회가 줄어들게 된다. 이러한 의구심을 해소하기 위하여 다음과 같은 실험을 하였다. 먼저 수정체를 잘라도 유동되지 않도록 수정체를 고정액에 충분히 incubation시킨 뒤 고정시키어 면도날로 표면이 반듯하게 반쪽면을 잘라낸 후 형광 probe와 다시 incubation시키는 방법을 택했다. 이렇게 함으로써 수정체의 피질부분과 핵부분이 똑같은 확률로서 형광 probe와 접할 수 있게 된다. 따라서 다른 지역에 분포되어 있는 글루타치온들이 형광 probe와 결합을 일으킬 때 주변의 다른 matrix에 의해 형광 probe의 확산 속도가 영향을 미칠 수 있는 가능성을 배제한 것이다. 이때의 결과 역시 앞에 기술한 방법, 즉 먼저 수정체 전체를 형광 probe와 incubation시켰던 결과와 똑같이 나타냄을 확인하였다.

이 형광표지방법을 도입하여 라만/형광 현미경을 이용한 형광 imaging 방법은 다른 방법에 비하여 다음과 같은 장점이 있다. 첫째로 이와 같은 방법에 사용되는 형광물질은 상업적으로 얻기가 쉬울 뿐 아니라 원하는 화학종 - 예를 들어, 양이온, 래디칼 그리고 분자의 여러 작용기 등 - 에 매우 선택적이다. 따라서 상업적으로 얻을 수 있는 여러 종류의 형광 물질을 이용하면 자체 형광을 나타내지 않는 화학종의 분포를 알 수 있다는 장점이 있다. 두째로 형광 probe가 달라붙어 있을 경우와 그렇지 않을 경우에서의 형광세기가 구분할 수 있을 정도로 충분히 다르게 나타나기 때문에 수정체의 형상을 변형시키지 않으면서 정확하게 원하는 화학종의 국부적인 imaging을 쉽게 할 수가 있다.

수정체를 균질화시키지 않고 관심있는 화학종들의 분포도를 알아보기 위한 목적으로 non-invasive한 형광표지방법을 최초로 개발하여 글루타치온의 분포를 알아보는 데 적용하였다. 라만/형광 현미경을 이용하여 visual이나 equatorial axis의 단면을 따라 글루타치온의 분포를 3차원으로 imaging하였는 바 다른 방법의 결과와 일치하는 만족할만한 결과를

업었다. 아직은 초기단계이나 앞으로 좀더 밀도있는 연구를 함으로써 수정체 뿐만 아니라 생체의 여러 조직에 존재하는 여러 화학종들의 국부적인 분포를 밝혀서 궁극적으로 그것들의 생성메카니즘을 밝히는데 이 형광표지방법을 이용할 수 있으리라 생각된다.

이 연구는 1994년도 교육부 기초과학육성연구비(BSRI 94-3431)의 지원에 의한것이며 이에 감사를 드린다.

#### 인 용 문 헌

1. Ansari, N. H.; Srivastava, S. K. *Curr. Eye Research* **1982/1983**, *2*, 271.
2. Truscott, R. J. W.; Augusteyn, R. C. *Exp. Eye Res.* **1977**, *25*, 139
3. Kinoshita, J. H.; Merola, L. O. *Ciba Fdn. Symp.* **1973**, *19*, 173.
4. Augusteyn, R. C. *Exp. Eye Res.* **1979**, *28*, 665.
5. Cohen, G.; Hochstein, P. *Biochemistry* **1963**, *2*, 1420.
6. Ellman, G. L. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 70.
7. Beutler, E. *Red Cell Metabolism*; Grune and Stratton: New York, 1975; p 112.
8. Chaney, W. L.; Spector, A. *Curr. Eye Res* **1984**, *3*, 345.
9. Awasthi, Y. C.; Garg, H. S.; Dao, D. D.; Partridge, C. A.; Srivastava, S. K. *Blood* **1981**, *58*, 733.
10. Saxena, M.; Singhal, S. S.; Awasthi, Y. C. *Exp. Eye Res.* **1992**, *54*, 461.
11. Yu, N.-T.; Cai, M.-Z.; Ho, D. J.-Y. Kuck, J. F. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85*, 103.
12. Barron, B. C.; Yu, N. T.; Kuck, J. F. R. *Exp. Eye Res.* **1988**, *47*, 901.
13. Yu, N. T.; Barron, B. C.; Kuck, J. F. R. *Exp. Eye Res.* **1989**, *49*, 189.
14. Barron, B. C. Ph. D. thesis, *Georgia Institute of Technology*, 1988.
15. Hedley, D. W.; Chow, S. *Cytometry* **1994**, *15*, 349.
16. Jaroszeski, M. J.; Gilbert, R.; Heller, R. *Anal. Biochem.* **1994**, *216*, 271.