J. of Korean Ind. & Eng. Chemistry,
Vol.7, No.2, April 1996, 252-260

기능성 막 제조를 위한 DPPC 지질막과 탄수화물 혼합막에 관한 연구

정 택 서 · 이 재 성* · 이 기 창 · 홍 장 후**

명지대학교 공과대학 화학공학과, *한국과학기술연구원 특성분석센터
**서울산업대학교 정밀화학과

(1995년 8월 14일 접수, 1996년 2월 12일 채택)

A Study on DPPC Lipid Membrane and its Carbohydrate Mixture Membrane for Preparation of a Functional Membrane

Teak-Suh Jeong, Jae-Seong Rhee*, Ki-Chang Lee, and Jang-Hoo Hong**

Dept. of Chem. Eng., College of Eng., Myong Ji Univ., Seoul 120-728, Korea
*Org, Anal. Chem. Lab. Advanced Analysis Center, Korea Instituted of Science and Technology Seoul 136-791, Korea
**Dept. of Fine Chem., Seoul Nat'l Polytechnic Univ., Seoul 139-743, Korea

(*Received August 14, 1995, Accepted February 12, 1996*)

요 약 : 막의 기능설계를 하기 위하여 DPPC(dipalmitoylphosphatidylcholine)인 지질로 제조한 liposome과 DPPC와 DTAB(dodecyltrimethylammonium bromide)를 혼합하여 liposome을 제조하여 그 구조변화를 조사하였다. 막 구조의 변화는 CF(carboxylfluorescein)를 이용하여 DPPC의 상전이 온도(t_c=41℃) 이상과 이하에서 측정하여 평가하였다. DPPC liposome에 함유된 CF의 유출에 의한 형광강도는 45℃에서 증가되었지만 20℃에서는 그 변화는 관측되지 않았다. 동등한 조건에서 DPPC/DTAB liposome에서 CF 유출에 의한 형광강도의 변화는 DPPC liposome에 비하여 큰 것이 관측되었다. 이 결과는 DPPC/DTAB liposome이 불규칙한 배열을 하고 있다는 것을 시사한다. 한편 Ca^{2+} 존재하에서 DPPC liposome과 DTAB/DPPC liposome에서 Quin 2의 형광강도는 45℃에서 현저히 증가되었지만 20℃에서는 거의 변화하지 않았다. 그리고 형광강도의 변화는 DPPC/DTAB liposome보다 DPPC liposome 쪽이 더 크게 나타났다. 이것은 DPPC/DTAB liposome의 구조가 DPPC liposome보다 더 안정하다는 것을 의미한다. 또한 형광물질인 ANS를 이용하여 막 표면의 양상을 조사한 결과 DPPC liposome과 DPPC/DTAB liposome에서 ANS의 형광강도는 45℃와 20℃에서 다른 양상을 보였다. 이 양상은 상전이 온도의 이상과 이하에서 DPPC liposome과 DPPC/DTAB liposome의 막유동성을 의미하고 그 변화량은 DPPC liposome이 DPPC/DTAB liposome보다 더 컸다. 또한 DSC에 의해 측정된 상전이 온도는 DPPC liposome의 경우 41℃이었으며 DPPC/DTAB liposome의 경우에는 32℃이었다. 이상의 결과로 DPPC/DTAB liposome의 분자배열 상태가 불규칙한 것을 의미한다. 그러므로 DPPC/DTAB liposome은 불규칙하게 배열되어 있지만 안정된 구조를 갖고 있다고 생각된다.

Abstract: In this article, we investigate into the structural changes of liposome to design its functional membranes by the synthesis of two types of liposomes, DPPC liposome and DTAB of hydrocarbon substance/DPPC liposome. The changes of membrane structures are evaluated by the CF fluorescent intensity measured above and below the phase transition temperature of the membrane, t_c=41℃. CF fluorescent intensities are enhanced by the CF leakage from

DPPC liposome at 45℃, while no changes are observed at 20℃. Under the same conditions, it is observed that the intensity enhanced by CF leakage from DPPC/DTAB liposome is larger than that of DPPC liposome alone, which suggests that DPPC/DTAB liposome has irregular arrangement. Under the presence of Ca^{2+}, Quin 2 fluorescent intensity in either DPPC liposome or DPPC/DTAB liposome is significantly increasing at 45℃, while almost none of the changes are observed at 20℃. The fluorescent intensity of DPPC liposome turns out to be larger than that of DPPC/DTAB liposome, which suggests that the DPPC/DTAB liposome is structurally more stable than the DPPC liposome. Additionally, when the analysis is done to observe changes in the shapes of membrane surfaces with ANS fluorescent, ANS fluorescent under DPPC or DPPC/DTAB liposome shows each of different appearances at 45℃ and 20℃ respectively. This result indicates that its respective membrane fluidity is changing above and below of the designated temperatures in phase transition. As to the magnitude of change of its membrane fluidity, DPPC liposome is much larger than DPPC/DTAB liposome. As far as the temperatures in phase transition measured by DSC are concerned, it is 41 ℃ and 32℃ for DPPC and DPPC/DTAB liposome respectively, which suggests that DPPC/DTAB liposome has an irregular molecular arrangement in its structure. That is, it is summed up that DPPC/DTAB turns out to be structurally stable, even so, its structure is irregularly arranged.

1. 서 론

세포막은 세포질을 외부로부터 격리시키며 물질수송을 제어하고 능률적인 생화학반응을 추진할 뿐만 아니라 외부와의 정보전달의 역할도 수행한다. 세포막에 관한 모델은 Singer와 Nicolson에 의해 제안된 fluid-mosaic 모델이 최근 학계에서 널리 인정 되고 있다[1]. 이 모델에 의하면 막은 phospholipid와 glycolipid를 포함하는 지질이중층으로 구성되어 있고 그 중에 단백질이 내재되어 있어서 지질 분자들은 막평면에서 측면으로 자유롭게 확산 운동을 하는데 전이확산(flip-flop)은 대단히 느리게 진행된다. 이와 같은 운동은 지질분자간의 관계가 대단히 합리적이어야만 일어날 수 있다. 한편, 지질분자는 소수성부분인 지방족 이중사슬과 인 또는 카르복실기 에스테르 극성 head group으로 구성되어 있다. 그리고 세포막에서 물질의 이동은 더욱 규칙성이 큰 결정이중층에서 액정이중층으로 상전이에 의해 수동적으로 일어나는데, 이는 탄화수소 사슬의 길이, 이중결합의 상태나 수 그리고 내재하는 콜레스테롤의 양 등에 의하여 결정된다.

생체막은 그 구조가 대단히 복잡하기 때문에 이를 분자 레벨에서 연구하기 위해서는 막모델의 이용이 필요하다. 이와 같은 연구로 이용되는 모델막은 지질이중층의 vesicle 구조를 가지고 있지만 그 기능면에서는 막 모델의 일부로써 현재 중요시 되고 있다. phospholipid와 같은 생물 조직에서 분리한 물질의 조성으로 구성된 베시클을 liposome 혹은 bangosome이라고 한다[2]. vesicle이나 liposome은 한번 형성되면 몇 주일간 심지어 몇달간 분해되지 않으므로 좋은 막모델이 된다. 한편 막모델은 Gebick과 Hickes에 의해 처음 인식되었으며, Oleic 산과 linoleic 산 수용 완충용액 속에서 계면 활성제를 진탕시켜서 얻은 폐쇄된 이중층을 ufasome이라고 불렀다[3]. 그러나 ufasome은 pH의 영향을 받아서 pH 6-8 이외에서는 불안정하고 구조가 약하기 때문에 이를 이용하기에는 불리한 조건이 많았다. 그러나 최근에는 C8-C18 사슬를 갖는 여러 가지 단일사슬 양친매성으로부터 vesicle을 형성시키어 보다 안정된 막모델을 제조하고 있다[4, 5]. 이와 같은 vesicle은 넓은 pH 범위에서도 안정하고 이상적인 삼투압계로서도 작용하며 용질을 포획할 수 있다는 것을 알았다.

본 연구에서는 dipalmitoylphosphatidyl choline (DPPC)과 dodecyltrimethylammonium bromide (DTAB) 탄수화물 혼합막을 제조하고 분광기를 이용하여 그 구조변화를 측정하였다. 그리고 그 평가한 결과를 보고 한다.

2. 실 험

2. 1. 시약 및 기기

본 실험에 사용된 dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), 4-(2-hydroxyethyl)-1-(piperazineethanesulfonic acid)(HEPES), $CaCl_2$, $CHCl_3$, 에탄올, 이소부탄올은 Sigma 사제를 사용하였고, dodecyltrimethylammonium bromide(DTAB), dodecyl amine

(DA) 및 octadecyl amine(OA)은 Aldrich 사제를 각각 그대로 사용하였다. 칼럼에 사용된 Sephadex G-200과 형광물질인 2-[(2-amino-5-methyl-phenoxy-methyl]-6-methoxy-8-anilinonaphthalene-8-sulfonate(ANS), aminoquinoline-N,N,N′,N′-tetraaceticacid(Quin2), 5(6)-carboxyfluorescein(CF) 그리고 계면활성제 Triton X-100은 Sigma 사제을 사용하였다. 측정기기는 Luminescence 분광광도계(model LS-5, Perkin-Elmer Co.), Ultrasonic(Sonifier-250, Branson Co.) 및 시차주사열량계(DSC-50, Shimadzu Co.)를 이용하였다.

2.2. Liposome의 제조

DPPC 인지질 10mM을 정제된 클로로포롬 용액 3ml에 용해시키고 충분히 교반하였다. 그후 질소가스로 클로로포롬을 제거하여 플라스크벽에 얇은 DPPC 막을 형성시켰다. 다시 남아 있는 클로로포롬 용액을 완전히 제거하기 위하여 진공건조기 속에서 2시간 동안 감압건조시킨 다음 질소 분위기 속에서 1일을 방치하여 용매를 완전히 제거하였다. 이 조건하에서 완충용액(10mM Hepes, pH 7.4, 100mM NaCl) 3ml를 가하고 50℃로 조절된 항온조속에서 3분간 유지한 다음, 다시 10℃ 정도로 냉각시킨 다음 교반하는 과정을 수회 반복하여 다중층막을 제조하였다. 이와 같이 제조된 다중층막을 항온조속에서 50℃로 유지하면서 Ultrasonic 장치로 초음파 처리하여 단층의 DPPC liposome을 제조하였다. DPPC/DTAB, DPPC/OA 그리고 DPPC/DA 탄수화물 혼합막의 제조는 10mM의 DPPC 인지질에 탄수화물을 20mol% 회합시키었다. 그리고 다음 막모델의 제조 과정은 위의 DPPC 방법과 같게 하였다. 이렇게 하여 제조된 단층 liposome의 직경은 200~350Å이다.

2.3. CF와 Quin 2를 함유한 막의 제조

2.2에서와 같이 클로로포름을 완전히 제거한 DPPC 용액에 CF 120mM을 첨가하여 50℃로 3분간 유지하여 votex mixer로 충분히 교반하였다. 그리고 다시 10℃로 3분간 냉각시켜 교반하였다. 이와 같은 과정을 수회 반복하여 CF를 함유한 다중층 liposome을 제조하였다. 이것을 50℃에서 초음파 장치로 20분간 처리하여 CF 형광물질이 함유된 단층 DPPC liposome을 제조하였다[10]. liposome에 함유되지 않은 유리 CF는 sephadex G-200을 충진시킨 column을 이용하여 제거하였다. Sephadex column은 sephadex G-200을 Hepes 완충용액에 1일간 팽윤시킨 다음 겔 중의 공기를 모두 제거하여 column(1.5×30㎝)에 충진하였다. 마찬가지로 Quin 2 형광물질를 함유한 liposome도 DPPC(25mg/3ml) liposome 용액에 Quin 2 100mM을 첨가하여 제조하였다[6]. 그리고 CF, Quin 2 형광물질을 함유한 DTAB/DPPC 혼합막도 동일하게 제조하였다. 이와 같이 하여 제조된 모델 막의 표면적은 colume을 통과한 동일하게 유출되는 것을 모았으므로 같은 분자수를 갖는 막들로 조성되어 있어서 거의 같다고 볼 수 있다.

2.4. 형광측정

막 내부로부터 유출된 형광물질의 형광강도는 Barbert 등[7]의 방법에 따랐으며, 형광측정은 Luminescence 분광강도계를 이용하였다. Hepes 완충용액를 미리 상전이 온도(DPPC, t_c=41℃, DPPC/DTAB, t_c=32℃) 이상(45℃)과 이하(20℃)로 항온이 되도록 하였으며, CF 또는 Quin 2가 함유된 DPPC liposome를 첨가하여 형광강도의 변화를 분광강도계로 기록하였다. DPPC/DTAB 혼합막의 형광 측정도 DPPC liposome의 조건과 동일하게 하였다. CF 형광강도의 측정은 여기(excition)는 470nm에서 에너지 방출(emission)은 515nm에서, 그리고 Quin 2는 339nm와 510nm에서, ANS는 398nm와 478nm에서 각각 측정하였다. 이와 같은 측정 영역은 산란광의 영향을 가능한한 최소로 줄이기 위한 방법으로 선택되었다. 막으로부터 유출되는 형광물질의 형광 퍼센트(I%)는 다음 식과 같이 구하였다[8].

$$I\% = 100(I_a - I_b)/(I_x - I_b)$$

여기서 I_x : Triton X-100에 의하여 막이 파괴되었을 때 막내부의 형광물질이 100% 방출되었을 때의 형광강도

I_a : 항온 후의 형광강도

I_b : 항온 전의 형광강도

2.5. DSC 측정

DPPC liposome과 탄수화물 혼합막의 상전이 온도는 DSC(Shimadzu mode DSC-50)를 이용하여 측정하였다[13]. 상전이 온도를 알아 보기 위한 DSC 측정은 DPPC liposome, 그리고 DPPC/DTAB, DPPC/DA 및 DPPC/OA 탄수화물 혼합막을 0.1ml 취하

였으며 시료의 증발을 방지하기 위하여 밀봉한 후 5℃에서 90℃까지 가열하였다. 가열 속도는 2℃/min로 하는 것이 가장 적절하다고 알려져 이와 같이 수행하였다[9]. DPPC와 DPPC/DTAB의 상전이는 41℃와 32℃이었다.

3. 결과 및 고찰

3. 1. DPPC liposome으로부터의 CF leakage 측정에 의한 막구조 평가

막 구조의 변화를 조사하기 위한 실험은 CF형광물질이 함유된 10mM DPPC liposome 0.5ml를 미리 항온된 완충용액(10mM Hepes, pH 7.4, 100mM NaCl) 2ml에 가하고 시간이 경과함에 따라서 막으로부터 유출되는 CF 형광강도를 측정하여 조사하였다. CF 형광물질은 일정 농도 이상에서는 분자간의 회합으로 인하여 자기소광(quenching)되나 형광분자가 막을 통하여 외부로 유출되면 농도가 묽어져서 형광을 발한다. 따라서 막구조 변화는 막내부에 있던 CF가 막 외부로 새어나오는 CF의 형광강도를 측정하여 조사할 수 있다[10].

Fig. 1은 DPPC(t_c=41℃)의 상전이 온도 이상과 이하에서 DPPC만으로 제조된 막으로부터 새어나오는 CF 형광강도의 변화를 나타낸 것이다. Fig. 1에서 시간의 경과에 따라 CF 형광강도는 t_c 이하(20℃)에서는 거의 변화하지 않았으나 t_c 이상(45℃)에서는 25%까지 증가되었다. DPPC는 t_c 이상에서는 액정(liquid crystal)상태에 있고 t_c 이하에서는 지질분자의 아실사슬이 규칙적으로 배열되어 있는 것이 알려져 있다[11]. 따라서 DPPC는 t_c 이상에서는 liposome을 구성하는 지질분자가 액정상태로 존재하여 아실사슬의 간격이 넓어지고 무질서한 상태가 되어 있으므로 내부의 CF가 외부로 유출되었다고 생각된다. 이에 대하여 t_c 이하에서는 CF의 유출이 관측되지 않았던 것은 지질분자의 아실사슬간의 배열이 잘 정돈되어 있어 막에서 CF가 유출할 수 있는 빈틈이 없는 것을 시사한다.

Fig. 2는 liposome 구조의 안정성을 조사하기 위하여 알코올 종류인 ethanol과 iso-buthanol을 DPPC liposome에 첨가하여 막구조에 미치는 영향을 나타냈다. 위의 DPPC 실험과 같이 DPPC의 t_c 이상과 이하에서 에탄올과 이소부탄올을 각각 0.1ml씩 첨가한 후 막으로부터 새어나오는 CF를 측정하였다. Ethanol을 CF를 함유한 DPPC liposome에 첨가하였을 경우에 CF의 형광강도는 t_c 이하에서 25%까지 증가되었으며 t_c 이상에서 80%까지 증대되었다. 이는 Fig. 1의 DPPC 분자의 아실사슬이 질서 정연한 배열상태로 되어있는 것과는 대조적으로 ethanol에 의해 그 배열 상태가 무질서하게 된 것을 시사한다. 또

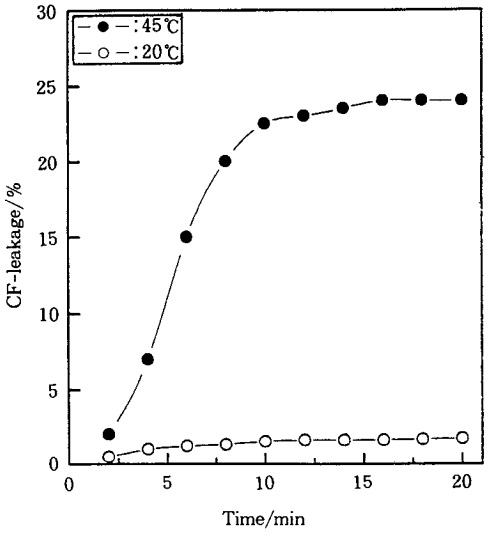

Fig. 1. CF-leakage from DPPC liposomes at 20℃ and 45℃. [DPPC]=120mM.

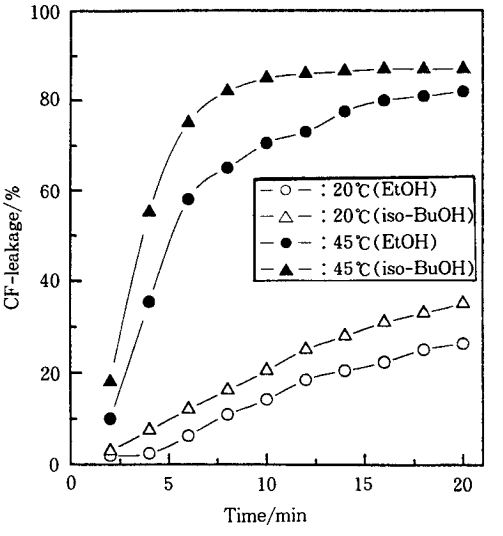

Fig. 2. CF-leakage from DPPC liposomes with additives EtOH and iso-BuOH at 20℃ and 45℃. [DPPC]=120mM, [Additives]=0.5ml.

한 ethanol보다 소수성이 크고 겉보기 부피가 큰 iso-buthanol를 첨가했을 때는 t_c 이하에서도 CF의 형광강도가 20%까지 증대되었으며 t_c 이상에서는 CF leakage가 93%나 되었다. 즉 막은 ethanol과 iso-buthanol의 첨가에 의해 영향을 받았으며 DPPC liposome만의 CF leakage에 비하여 CF의 형광강도가 t_c 이상에서는 물론 t_c 이하에서도 현저히 증가되는 것이 관측되었다.

이의 결과로부터 친수성에 가까운 ethanol은 막표면 인지질 분자의 머리부분에 분배하여 막에 perturbation을 일으켰다고 볼 수 있다. 이에 대하여 iso-buthanol은 아실사슬까지도 분배되는 것으로 생각된다. 한편 이때의 형광강도 변화가 완만한 증가를 보이고 있는 것으로 보아 막은 손상되지 않은 것으로 본다.

3.2. DPPC/DTAB 혼합막으로부터 CF leakage 측정에 의한 막구조 평가

생체막 자체는 대단히 복잡하고 약하여 손상되기 쉽기 때문에 이를 이용하기 위해서는 단단한 구조를 갖는 안정된 막을 제조해야 한다. 이와 같은 목적으로 DPPC 인지질에 DTAB 탄수화물을 회합시킨 DPPC/DTAB 혼합막을 제조하였다.

Fig. 3은 CF를 함유한 DPPC/DTAB 혼합막의 상전이 온도(t_c=32℃) 이상과 이하에서 막으로부터 유출되는 CF를 측정하여 나타낸 것이다. 60분 항온한 다음 CF의 유출을 측정하였을 때 t_c 이상에서 DPPC/DTAB 혼합막의 CF leakage는 17%로 나타나 DPPC liposome에서의 CF의 형광강도보다 낮았으며, t_c 이하에서는 거의 비슷하였다. 실험에서 CF leakage의 급격한 유출은 관측되지 않고 DPPC의 형광변화와 경향이 비슷한 것으로 미루어 DTAB 분자가 DPPC 지질에 고르게 분배하여 비교적 안정된 막을 형성하고 있는 것으로 생각된다. 또한 t_c 이상에서 CF leakage가 DPPC보다 낮게 나타난 것은 막에 탄수화물이 회합되어 강화되었기 때문으로 보인다. Fig. 4는 상변화 및 상전이 온도 등에 영향을 주는 막의 산만성을 조사하기 위하여 혼합막에 알코올을 첨가하여 나타낸 것이다. Ethanol은 t_c 이상에서 CF 형광강도가 86 %로 형광변화가 DPPC liposome보다 증가되었으며 T_c 이하에서도 마찬가지로 증가하였다. Iso-buthanol의 경우 T_c 이상에서 96%까지 증가된 것이 관측되었다. 이때 형광강도의 증가는 DTAB 분

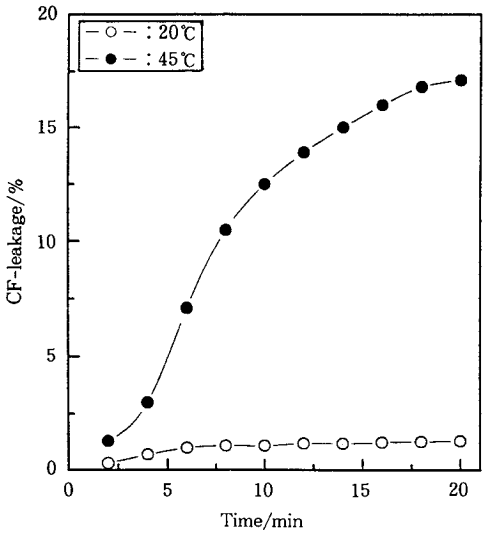

Fig. 3. CF-leakage from DPPC/DTAB mixture membranes at 20℃ and 45℃. [DPPC]=120mM, [DTAB]=20mM.

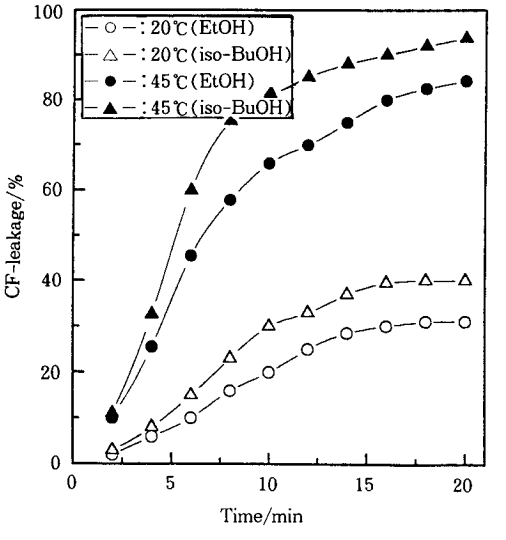

Fig. 4. CF-leakage from DPPC/DTAB mixture membranes with additives EtOH and BuOH at 20℃ and 45℃. [DPPC]=120mM, [DTAB]=20mM, [Additives]=0.5ml.

자가 DPPC 지질에 대해 머리부분이 큰 겉보기 부피를 가지고 있으므로 막의 머리부분에 알코올이 분배되어 막 소수부분인 아실사슬까지 영향을 미치어 막 유동성이 증가되었기 때문으로 생각된다.

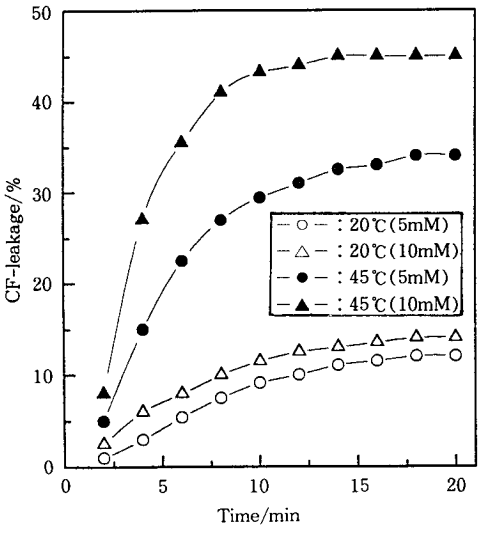

Fig. 5. CF-leakage from DPPC liposomes with additives Ca^{2+} at 20℃ and 45℃. [DPPC]= 120mM, [Additives]=0.1ml.

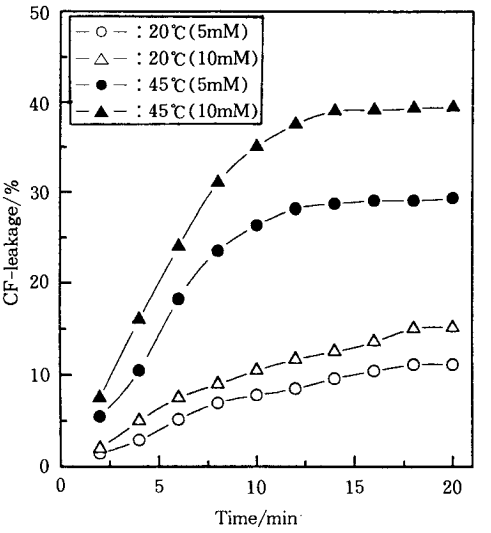

Fig. 6. CF-leakage from DPPC/DTAB mixture membranes with additives Ca^{2+} at 20℃ and 45℃. [Additives]=0.1ml.

모델막을 제조하였을 때 가장 중요한 것은 상전이나 상분리와 같이 실제로 세포막에서 일어나는 물리적 성질이다. DPPC 만으로 제조된 liposome은 상전이와 상분리와 같은 물리적 현상이 일어나지만 DTAB와 같은 화학물질을 첨가하였을 때 막 구조 보강으로 인하여 이와 같은 현상이 일어나지 않을 수도 있다. 그러나 화학물질의 아실사슬의 탄화수소가 8 이상되면 화학물질 만으로도 liposome이 형성되며 그 구조는 DPPC와 같이 배열되어 있는 것이 보고 되어 있다[12]. 여기서 DPPC/DTAB 혼합막의 경우 상전이 온도의 존재와 CF의 유출현상으로부터 막이 완전히 형성되는 것을 알 수 있었다. 이것은 DPPC와 DTAB의 혼합막이 충분한 모델막으로서 기능할 수 있다는 것을 의미한다.

3.3. 막에 대한 Ca^{2+}의 첨가 효과

막을 통한 물질 이동은 생리작용의 중요한 역할중의 하나이다. 특히 금속이온은 생체막의 균형에 영향을 미친다. 여기서는 금속이온 중에서도 정보전달 인자로서 역할을 수행하는 Ca^{2+}의 막투과에 관하여 조사하였다. 우선 Ca^{2+}은 지질막 표면에 결합하여 상분리를 야기시키며 막유동성을 저하시킨다[13]. 이는 Ca^{2+}이 그 주위 환경에 영향을 미치어 지질 분자의 운동을 변화시키기 때문이다. Fig. 5는 CF가 함유된 DPPC liposome에 5mM, 10mM Ca^{2+}를 첨가하였을 때 막으로부터의 CF leakage를 나타낸 것이다. 그림에서 T_c 이하에서는 Ca^{2+}의 첨가효과는 관측되지 않았으나, T_c 이상에서는 10mM Ca^{2+}을 첨가 하였을때 45%까지 증가하였다. 한편 Fig. 6은 같은 조건하에서 DPPC/DTAB 혼합막의 CF 유출을 나타내었는데 이때의 형광강도 변화 역시 T_c 이상에서는 40%까지 증가하고 있으나 DPPC 보다 5% 정도 낮게 나타내어 DPPC막과 DPPC/DTAB 혼합막 모두 Ca^{2+}에 대한 영향은 비슷한 것을 알 수 있었다. 또한 T_c 이하에서도 Ca^{2+}의 영향으로 Fig. 1에서의 결과보다 10%나 형광강도가 증가하였다. 그림에서 2가 양이온의 농도에 따라서 10%까지 형광강도가 증가하는 것을 보여 Ca^{2+}이 막에 영향을 미치고 있는 것을 알았다. 이는 Ca^{2+}이 친수성 물질이므로 인지질 머리부분에 결합하게 되면 인지질 아실사슬의 분자운동이 변하여 막구조에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

3.4. DPPC/DTAB 혼합막을 통한 금속이온의 투과

금속이온의 막투과는 Ca^{2+}의 형광시약인 Quin 2를 이용하였다. Quin 2는 Ca^{2+}, Mg^{2+} 및 Ba^{2+}과 같은 2가 양이온의 형광시약으로 알려져 있다[14]. 형광시약인 Quin 2를 DPPC liposome에 함유시킨 후 막외부의 금속이온이 ionophore에 의하여 지질막 속으로

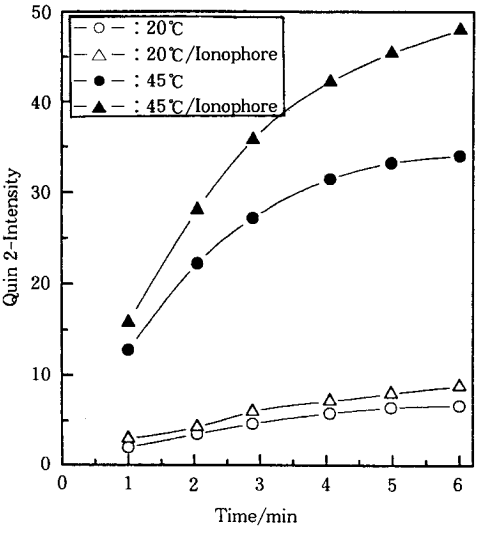

Fig. 7. Quin 2-intensity from DPPC liposomes with additives A23187 ionophores at 20℃ and 45 ℃. [DPPC]=120mM, [Additives]=0.5ml.

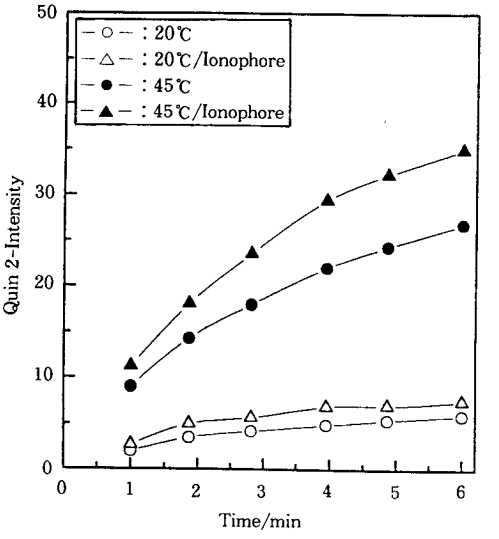

Fig. 8. Quin 2-intensity from DPPC/DTAB mixture membranes with additives A23187 ionophores at 20℃ and 45℃. [Additives]=0.5ml.

이동하는데 대해 연구한 예도 있다[15]. 본 실험에서는 Ca^{2+}이 이온운반 물질에 의하여 막내부로 이동되어 결합될 때 증대되는 형광강도를 측정하여 금속이온의 투과 현상을 조사하였다. Fig. 7은 Quin 2를 함유한 DPPC liposome에 10mM Ca^{2+}과 10mM A23187을 첨가하였을 때 나타난 Quin 2 intensity이다. 실험에서 DPPC 만으로 제조한 liposome에 10mM Ca^{2+}만을 첨가하였을 때 T_c 이하에서 10%의 변화가 있었으나, T_c 이상에서는 33%이었다. 여기에 A23187을 첨가하였을 때 T_c 이하에서는 비슷하였으나 T_c 이상에서는 45%까지 증가하였다. 이는 A23187에 의해 Ca^{2+}이 막 내부로 이동되어 Quin 2와 결합하여 형광강도가 증대되었다고 생각된다. 상전이 온도 이하에서 형광변화가 없는 것은 막의 지질분자가 정연하게 배열되어 있어서 막 내부로의 Ca^{2+}의 이동이 방해를 받았기 때문으로 본다. Fig. 8은 DTAB/DPPC 혼합막에서의 Ca^{2+}의 이동에 따른 Quin 2 형광강도의 변화를 나타낸 것이다. T_c 이하에서는 DPPC와 비슷한 경향을 나타냈으나 T_c 이상에서 Ca^{2+}만을 첨가하였을 때 형광강도가 22% 정도였으며, A23187에 대해서 25% 이내로 나타내어 전체적으로 DPPC 막보다 낮게 나타냈다. 이의 결과로 DPPC 지질만으로 구성된 막보다 DPPC/DTAB 혼합막이 이온 운반물질에 의한 2가 양이온의 막투과가 낮은 것을 알 수 있었다. 이와 같은 이유는 전체적인 막을 구성하는 인지질에 탄수화물이 혼입되어 이웃 분자간의 간격이 좁아져서 이온의 투과가 어려워졌기 때문인 것으로 생각된다.

이온이 지질 이중층막을 통과하는 속도는 Na^{1+}의 예로들면 투과계수가 10^{-13}~10^{-14}로 대단히 늦다. 따라서 생체막에서의 이온수송은 거의 담체 또는 이온 찬넬에 의존한다. 그런데 이와 같은 메카니즘에 의하지 않고 막을 통과하기 위해서는 상분리에 의한 기구를 생각할 수 있다. DPPC/DTAB 혼합막에서의 Ca^{2+}의 이동은 DPPC 만의 막에 비하여 오히려 감소되었다. 이것은 DPPC 분자와 DTAB 분자사이의 상분리가 생기는 것 보다는 겉보기 부피가 큰 DTAB의 head group이 DPPC의 head group의 결합을 보완해 주기 때문에 막이 안정화 되어서 Ca^{2+}에 의한 영향이 적기 때문이라고 생각된다. 그러므로 이 막에서 금속이온이 투과되기 위해서는 막의 상분리를 야기시키는 다른 메카니즘을 고려해야만 한다.

3.5. 형광시약 ANS를 이용한 막표면 구조변화의 평가

지질막의 표면에 대한 광학적 조사방법으로 ANS 형광시약이 이용되고 있다[16, 17]. ANS 형광물질은 지질 이중층의 친수성에 결합하게 되면 형광강도가 거의 100배나 증가된다. 이와 같은 형광증가는 인지

Table 1. Changes of ANS Fluorescence Intensity in the DPPC and DPPC/DTAB Liposomes

Liposome	Temp. (℃)	Ca^{2+} [mM]	Time/Min						
			1	2	3	4	5	6	7
DPPC	20	5	21	28	34	35	36	36	35
		10	22	40	50	52	53	53	53
	45	5	27	55	67	78	80	80	81
		10	30	92	127	142	143	143	143
DPPC/DTAB	20	5	18	25	30	33	32	33	34
		10	22	37	45	49	53	53	53
	45	5	25	50	61	68	70	70	71
		10	25	81	111	133	139	140	142

질의 물리적 상태에 대한 민감성과 이중층구조인 막 모델의 투과 이동에 연관된 연구에 이용할 수 있다. 이는 ANS 분자가 막 2중층 구조의 소수성영역에는 결합하지 않으나 친수성인 막표면에 결합하려고 하는 특성을 갖기 때문이다.

Table 1은 10mM ANS를 DPPC liposome과 혼합하여 20℃와 45℃에서 형광강도를 측정한 결과를 정리하여 나타냈다. Liposome의 상전이 온도(t_c=41℃) 이상에서 10mM Ca^{2+}이 존재할 때 ANS의 형광강도는 크게 증가하였으나 5mM Ca^{2+}에 대해서는 이보다 낮았다. 이같은 형광증가는 ANS가 주위 환경의 극성변화나 또는 상전이 온도 이상에서 지질에 결합하는 양이 증가 되었다고 생각된다. 그러나 T_c 이하인 20℃에서 ANS의 형광강도를 측정한 결과 ANS의 형광강도가 약간 증가하여 ANS가 T_c 이상일 때 보다는 적은 양이 지질에 결합되고 있는 것으로 생각된다. 따라서 막 유동성이 증가되는 상전이 온도 이상의 영역에서 지질의 구조 변화에 의한 ANS의 지질분자에의 회합이 증가한 것을 알 수 있었다. DPPC/DTAB 혼합막도 같은 방법으로 실험하여 그 결과를 Table 1에 함께 정리하였는데 용액내에서의 형광변화는 DPPC와 비슷하게 나타냈다. 실험결과 막 이중층에 ANS 분자가 상전이 온도이하에서 결합될 때는 liposome의 외부층에 국한하여 결합하는 것을 의미한다. 그러나 상전이 온도 이상에서 형광강도가 증가되는 것은 ANS의 이동이 일어나는 것을 의미한다고 하겠다. 이는 Jacobson과 Papahadjopoulos 등도 넓은 온도의 범위에서 결합하는 ANS를 이용한 연구에서 거의 동일한 결론을 내렸다[18].

4. 결 론

본 연구에서는 막의 기능설계를 위하여 DPPC 지질과 DTAB 합성탄수화물을 이용하여 막을 제조였으며, 그 기본 물성인 막 구조 변화를 평가하기 위하여 상전이 온도 이상과 이하인 45℃와 20℃에서 실험을 수행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. DPPC liposome은 t_c 이상에서 형광강도가 증가되었으나 T_c 이하에서는 거의 변화가 없었다. 알코올에 대한 영향은 ethanol보다 iso-buthanol의 경우에 그 효과가 크고 T_c 이상에서 이같은 현상은 더욱 뚜렷하였다.

2. DPPC/DTAB 혼합막은 상전이 온도 이하에서 DPPC 막보다 형광강도가 낮게 나타났으며 T_c 이하에서는 같게 나타냈다. 알코올에 대한 영향은 ethanol보다 iso-buthanol의 효과가 더욱 크게 나타났는데 이효과는 T_c 이상에서 DPPC만의 liposome보다 컸다. 이상의 결과는 DPPC 만으로 형성된 liposome보다 DPPC/DTAB 혼합막의 경우에 더 안정한 구조를 취하는 것을 의미한다.

3. 제조된 막에 미치는 Ca^{2+}의 영향은 T_c 이상에서 5mM보다 10mM Ca^{2+}이 컸으며 T_c 이하에서 이같은 현상은 보이지 않았다.

4. ANS 형광변화는 T_c 이상에서 증가하였으며 그 이하에서는 감소되어 막유동성이 증가되는 상전이 이상 영역에서 지질의 구조 변화에 의한 형광의 증감이 있었다.

5. DPPC 리포좀의 상 전이온도는 41℃이었으며, DPPC/DTAB 혼합막의 상전이 온도는 32℃이었다.

참고문헌

1. S. J. Singer and G. L. Nicolson, *Science,* **175**, 720(1972).
2. A. D. Bangham, M. M. Standish and J. D. Watkins, *J. Mol. Biol.,* **13**, 238(1965).
3. J. M. Gebicki and M. Hicks, *Nature* **243**, 232 (1973).
4. W. R. Hargreaves and D. W. Deamer, *Biochemistry,* **17**, 3759(1978).
5. W. R. Hargreaves and D. W. Deamer, "Light Transducing Membranes Structure, Function and Evolution", 243, Academic Press, New York(1978).
6. S. Kimura, E. Ozeki, and Y. Imanishi, *Biopolymers,* **28**, 1235(1989).
7. J. Barbert, P. Machy, and L. D. Leserman, *Biochem. Biophys. Acta,* **772**, 347(1984).
8. J. Nimal, B. Stanislav, and L. R. Steven, *J. Am. Chem. Soc.,* **112**, 5844(1990).
9. K. M. W. Keough and P. J. Davis, *Biochemistry,* **18**, 1453(1979).
10. K. Ohki, T. Yamauchi, Y. Banno, and Y. Nozawa, *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **100**, 321(1981).
11. M. J. Janiak, D. M. Small, and G. G. Shipley, *Biochemistry,* **15**, 4575(1976).
12. T. Kunitake, Y. Okahata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.,* **51**, 1877(1978).
13. P. R. Cullis and B. D. Kruijff, *Biochim. Biophys. Acta,* **559**, 399(1979).
14. R. Y. Tsien, *Biochemistry,* **19**, 2396(1980).
15. S. Kimura, E. Ozeki, and Y. Imanishi, *Biopolymers,* **28**, 1235(1989).
16. H. Trauble, *Biomembranes,* **3**, 197(1972).
17. P. Overath and H. Trauble, *Biochemistry,* **12**, 2625(1973).
18. K. Jacobson and D. Papahadjopoulos, *Biophys. J.* **15**, 16(1975).