

원자현미경 (AFM)을 이용한 환경오염물질에 노출된 HeLa 세포의 표면변화 연구

이 시 원, 이 수 일¹, 최 진 희*

서울시립대학교 도시과학대학 환경공학과, ¹서울시립대학교 공과대학 기계정보공학과

Research of Detection Method for Cytotoxic Effects of Environmental Pollutants Using Atomic Force Microscopy (AFM) in HeLa Cells

Si-won Lee, Soo il Lee¹ and Jinhee Choi*

*Faculty of Environmental Engineering, College of Urban Science,
University of Seoul, Seoul, Korea*

¹*Department of Mechanical and Information Engineering, College of Engineering,
University of Seoul, Seoul, Korea*

ABSTRACT

The toxicity of environmental pollutants was measured between a image of the surface topography in HeLa cells using atomic force microscopy for the possibility of toxic effect measurement and environmental monitoring. A image of the surface topography by AFM were estimated as toxic endpoints. The surface topography by AFM was observed a change of the cell surface in the environmental pollutants, but the standard of the measurement requires for the dose-effect degree. The overall results indicate that the possibility of measurement using AFM were confirmed a dose-effect degree related toxic effects, but it requires correlation between more various biomarker and AFM's measurements if the possibility of the toxic effect measurement was established.

Key words : atomic force microscopy (AFM), environmental pollutants, HeLa cells, toxicity

서 론

산업과 과학이 발전함에 따라, 세포 및 생물체의 관찰 및 독성에 대한 영향을 관찰하는 도구는 계속 발전되어 왔으며, 특히 물체의 세부부분 및 세

포의 소기관 등을 시각으로 관찰할 수 있다는 점에서 현미경의 발전은 더욱 집중할 필요가 있다. 1655년 로버트 후크에 의하여 광학현미경을 이용하여 세포의 구조를 관찰한 이후부터 현재에 이르기까지 광학, 전자파, 레이저 등을 이용한 현미경이 개발, 세포의 표면의 구조 및 독성물질의 영향 관찰에 이용되었다. 그러나, 이러한 현미경은 배울의 한계, 전처리 및 관찰과정의 복잡성 등에 의한 측정의 어려움이 존재하며, 2차원 구조의 관찰만이

* To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-2-2210-5622, Fax: +82-2-2244-2245
E-mail: jinhchoi@uos.ac.kr

가능하다는 단점이 있다(Alberts *et al.*, 2002).

한편, 1986년 Binnig(Binnig *et al.*, 1986) 등에 의해 개발된 AFM(atomic force microscopy)은 SPM(scanning probe microscope)의 한 종류로 나노스케일의 형상이나 재료의 특성을 측정하기 위하여 개발된 것으로서, 기존에 개발되었던 STM(scanning tunneling microscope)과 달리 도체뿐 아니라 실리콘으로 제작된 반도체 또는 섬유 등과 같은 부도체의 표면의 구조 및 형상 등도 나노스케일로 관찰할 수 있는 측정기구이다. 이외에 동적인 측정 방법들, 즉 탭핑 모드(tapping mode)와 비접촉모드(non-contact mode)가 개발된 이후(Jalili and Laxminarayana, 2004), 기존의 금속, 섬유, 목재 등과 같이 캔틸레버에 의하여 표면의 손실이 일어나지 않는 재료의 나노스케일 측정뿐 아니라, 캔틸레버에 의하여 쉽게 표면의 모양이 변형될 수 있는 부드러운 시료의 나노스케일 형상의 측정도 가능하게 되었다. 또한, AFM은 SEM(scanning electron microscopy), TEM(transmission electron microscopy)과 같은 기존에 개발된 다른 고해상도의 현미경 측정 방법과는 달리 일반 공기 중과 액체 내에서도 측정이 가능하며, 3차원 구조의 측정도 가능하기 때문에 생체에 관련된 물질의 측정도 가능하므로 세포, virus 및 미생물의 관찰, 미생물의 독성물질의 영향에 따른 세포의 변화 관찰, 염색체 및 DNA의 세포 내 구조물의 직접적 관찰에 유용하게 사용되고 있다(Ahimou *et al.*, 2003; Malkin *et al.*, 2003; Yoshimura *et al.*, 2003; Santos and Castanho, 2004; Franz and Muller, 2005; McNamee *et al.*, 2006).

Paraquat(PQ)는 과거에 제초제로 이용되었던 농약류로서, 지금은 사용중지가 되었지만, 잔류성이 있기 때문에 현재 토양에 상당부분 잔류하여 식물 및 식물을 섭취하는 동물에 영향을 주고 있는 물질이다(Suntres, 2002; Bromilow, 2003). Endosulfan(ES)은 유기인계 살충제로서, 독성영향이 매우 높아 WHO에서도 독성물질로 규정되어 있으며, 최근에는 내분비계교란물질로도 알려져 있다(Roberts *et al.*, 2003; Schoeters *et al.*, 2008). Nonylphenol(NP)과 bisphenol A(BPA)는 알킬페놀류로서 내분비계교란물질로 잘 알려져 있는 물질이다(Chen *et al.*, 2001; Ying *et al.*, 2002). Carbon tetrachloride(CCl₄)는 PAH류로 대표적인 간독성 물질로 잘 알려져 있는 물질로서, 주로 기체상태로 존재하며 산화

적 스트레스도 일으키는 물질로 알려져 있다(Basu, 2003). Cadmium chloride(CdCl₂)는 중금속류로서 배터리, 플라스틱 안정제, 산화방지제등으로 광범위하게 쓰이고 있는 물질이지만, IARC(International Agency for Research on Cancer)에서는 이 물질을 1급 발암물질로 규정하고 있으며(IARC, 1993), 포유류 세포에 변이원성을 일으키는 물질로 알려져 있다(Friberg *et al.*, 1986; Kasuya *et al.*, 2000).

이에 따라 본 연구에서는, 환경유해물질로 알려진 화학물질에 노출된 HeLa 세포의 영향을 세포 표면 변화의 관찰을 통하여 확인하였다.

재료 및 방법

1. 시험물질

시험에 사용된 화학물질은 sigma aldrich(St. Lois, MO, USA)에서 구입한 PQ(Cat. NO. M2254), ES(Cat. NO. 36750), NP(Cat. NO. 46018), BPA(Cat. NO. 15138), CCl₄(Cat. NO. 270652), CdCl₂(Cat. NO. 287652)를 사용하였다.

2. 세포 배양 및 화학물질 처리

시험 노출 세포주로 이용된 자궁경부암 세포주 HeLa 세포는 10% fetal bovine serum, 1% antibiotics가 포함된 RPM1640 배지에 37°C, 5% CO₂ 조건으로 CO₂ incubator에서 배양하였다. 각 실험에 사용되는 화학물질 중 NP, BPA 그리고 CdCl₂의 경우에는 노출될 solvent로 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 사용하였고, PQ, ES, CP 그리고 CCl₄는 증류수를 solvent로 사용하였다.

3. AFM을 이용한 HeLa cells의 이미지 측정 시험

AFM을 이용한 이미지 측정시험을 위하여 2×10⁵개의 HeLa 세포를 24시간 동안 배양한 뒤 시험 물질을 24시간 동안 노출시킨 세포를 1회용 1 mL sylenge로 buffer를 모두 제거한 후, 2시간 상온에서 건조 후 PSIA사의 AFM(XE-100TM)을 사용하여 이미지를 측정하였다. 측정 캔틸레버는 비접촉모드에 사용하도록 설계된 고유진동수 259 kHz, 스프링 계수 20 N/m인 마이크로 캔틸레버(NCHR:

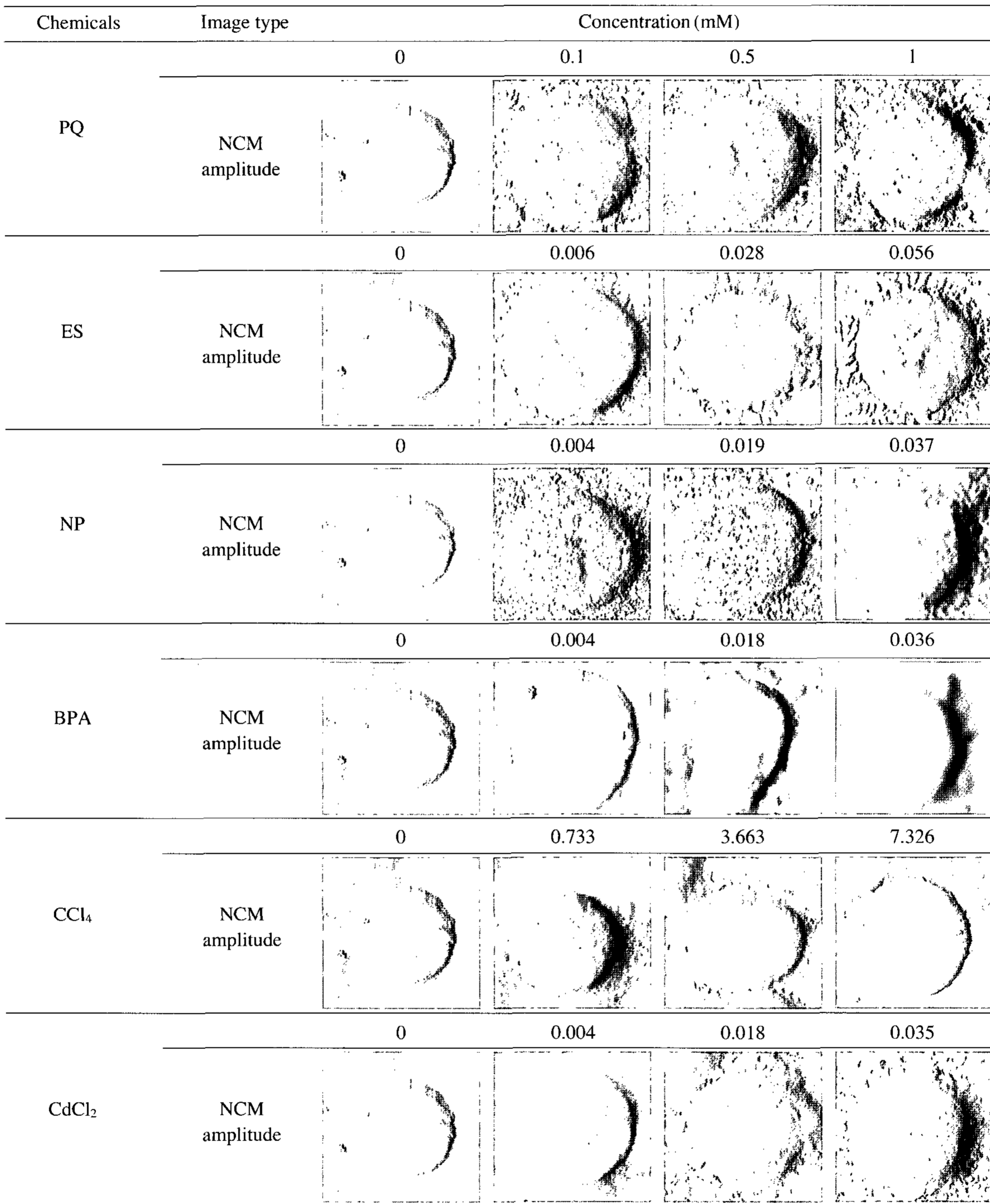


Fig. 1. The effects of environmental contaminants on the morphology of HeLa cells were investigated by NC-mode (non-contact mode) in the AFM. The effect concentrations were 1/10, 1/2 of IC₅₀ and IC₅₀.

Nanosensors™)를 사용하였다. 시험물질의 농도는 세포독성시험에서 구해진 IC₅₀의 농도를 이용하여 무처리군, IC₅₀의 1/10, 1/2, IC₅₀ 농도에서 25 μm × 25 μm ~ 35 μm × 35 μm 사이의 범위를 측정범위로 하여 시험을 진행하였다.

결과 및 고찰

HeLa 세포 AFM 이미지 측정결과

각 유해물질의 IC₅₀ 및 IC₅₀의 희석농도에 노출시킨 HeLa 세포의 이미지 측정 시험결과이다. 무처리군에서는 세포의 주위 표면이 깨끗하고, 세포의 모양도 동그란 모양을 유지하고 있으나, 각 유해물질의 IC₅₀ 농도에 가깝게 노출된 세포일수록 세포의 모양이 변형되기 시작하며, 세포의 주위 표면 굴곡이 심해지는 경향을 보이는 것을 알 수 있다. 특히 ES, NP, BPA, CdCl₂에 노출된 세포의 경우, 유해물질의 농도가 높아질수록 세포 표면의 변화가 심하게 변형되는 것을 확인할 수 있다. 현재 AFM을 이용한 세포의 이미지 측정의 경우, 크게 액체 또는 배지 내에서 세포의 표면을 관찰하는 방법(Kasas *et al.*, 1993; Braet *et al.*, 1997; McNamee *et al.*, 2006)과 배지 또는 액체를 증발시킨 후 세포의 표면을 관찰하는 방법으로 이루어져 있다. 그 중 전자의 경우에는 고정액(ex. glutaraldehyde)으로 세포를 고정시킨 후 관찰하는 방법(Braet *et al.*, 1998)과 세포의 생리적 상태를 유지하면서 측정하는 방법(McNamee *et al.*, 2006)으로 이루어져 있다. 그러나, 고정액으로 세포를 고정시킨 후 세포의 표면을 측정할 경우, 액체 내에서 세포를 측정할 수는 있으나, 고정액의 영향으로 인하여 세포는 스트레스에 영향을 받은 상태가 되며, 고정액에 의하여 세포의 표면과 강성이 변화되며(Braet *et al.*, 1998; Hutter *et al.*, 2005), 생리적 상태를 측정하기 위하여 세포 표면 측정을 하기 위해서는 기존 상업용 캔틸레버에 새로운 기법을 도입할 필요가 있다(McNamee *et al.*, 2006). 반면 상온에서 배지 또는 액체를 제거 후 건조시킨 세포 측정방법의 경우, 액체 내에서 측정하는 실험에 비하여 강성이 약간 변화하는 경향은 있으나(McNamee *et al.*, 2006), 화학물질에 의하여 발생될 수 있는 표면영향의 변화가 무처리군에 비하여 매우 크기 때문에 공기 중

건조에 의하여 발생될 수 있는 표면영향은 크지 않다고 여겨진다. 그러므로 본 실험의 경우 환경유해물질에 노출된 세포를 건조시킨 상태에서 AFM으로 관찰하였으나, 세포의 건조에 의한 영향으로 발생될 수 있는 표면의 변화는 무시할 수 있는 수준이다. 그러므로 실험 결과를 통하여 나타난 HeLa cells의 표면의 변화는 환경유해물질에 노출된 결과로 여길 수 있으며, 이를 통하여 AFM을 이용하여 환경오염물질에 노출된 세포의 표면영향을 관찰하는 기법이 모니터링 기법으로 활용될 수 있는 가능성이 있다고 여겨진다.

한편, 모니터링 기법으로서 정립이 되려면, 표면변화 측정의 정량화가 필요하다. 최근의 연구에서 미생물의 표면영향을 AFM을 이용하여 측정한 연구에서 정립이 되고 있지만(Adya *et al.*, 2006; Canetta *et al.*, 2006), 포유류 세포에서는 적용이 되지 않은 상태이다. 향후 연구에서는 미생물에서의 표면 영향 정량화 기법을 이용하여 동물 세포 및 인체 세포에 적용하는 연구가 필요할 것이다.

결 론

AFM은 세포의 표면을 3차원적으로 측정할 수 있는 나노스케일의 장비이며 이를 이용하여 환경유해물질의 노출에 의한 HeLa 세포의 표면영향을 관찰한 결과, 세포에 영향을 미치는 독성농도가 높아질수록 세포 주위 표면의 굴곡이 심해짐을 알 수 있었다. 특히 ES, NP, BPA, CdCl₂의 경우에는 그 영향이 더욱 심하였다. AFM을 이용하여 세포표면의 영향을 관찰하는 기법은 정량화 기법의 도입과 화학물질의 민감성 측정 등을 이용한 모니터링 기법 정립이 필요하지만, 현재 결과를 통하여 모니터링 기법의 가능성이 존재함을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 환경부 차세대 환경 기술 개발 사업 지원으로 수행되었음에 감사드립니다.

참 고 문 헌

Adya AK, Canetta E and Walker GM. Atomic force micro-

- scopic study of the influence of physical stresses on *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*, *FEMS Yeast Res* 2006; 6(1): 120-128.
- Ahimou F, Touhami A and Dufrene YF. Real-time imaging of the surface topography of living yeast cells by atomic force microscopy, *Yeast* 2003; 20: 25-30.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P. *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed, Garland Science, New York 2002, pp. 562.
- Basu S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients, *Toxicology* 2003; 189(1-2): 113-127.
- Binnig G, Gerber C and Quate C. Atomic force microscope, *Phys Rev Lett* 1986; 56: 930-933.
- Braet F, De Zanger R and Wisse E. Drying cells for SEM, AFM and TEM by hexamethyldisilazane: a study on hepatic endothelial cells, *J Microsc* 1997; 186(1): 84-87.
- Bromilow RH. Paraquat and sustainable agriculture, *Pest Manag Sci* 2003; 60: 340-349.
- Canetta E, Adya AK and Walker GM. Atomic force microscopic study of the effects of ethanol on yeast cell surface morphology, *FEMS Microbiol Lett* 2006; 255(2): 308-315.
- Chen MY, Ike M and Fujita M. Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of bisphenol-A and other bisphenols, *Environ Toxicol* 2002; 17(1): 80-86.
- Franz CM and Muller DJ. Analyzing focal adhesion structure by atomic force microscopy, *J Cell Sci* 2005; 118: 5315-5323.
- Friberg L, Kjellstrom T and Nordberg GF Cadmium. In: L. Friberg L, Nordberg GF and Vouk VB, Editors, *Handbook on the Toxicology of Metals*, 2nd ed, Elsevier, Oxford 1986, pp. 130-184.
- Hutter JL, Chen J, Wan WK, Uniyal S, Leabu M and Chan BM. Atomic force microscopy investigation of the dependence of cellular elastic moduli on glutaraldehyde fixation, *J Microsc* 2005; 219(2): 61-68.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). *Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry*, International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 58, IARC Scientific Publications, 1993, pp. 119-237.
- Jalili N and Laxminarayana K. A review of atomic force microscopy imaging systems: application to molecular metrology and biological sciences, *Mechatronics* 2004; 14: 907-945.
- Kasas S, Gotzos V and Celio MR. Observation of living cells using the atomic force microscope, *Biophys J* 1993; 64(2): 539-544.
- Kasuya M, Teranishi H, Aoshima K, Katoh T, Horiguchi H, Morikawa Y, Nishijo M and Iwata K. Water pollution by cadmium and the onset of Itai-itai disease, *Water Sci Technol* 2000; 25: 149-156.
- Malkin AJA, McPherson A and Gershon PD. Structure of intracellular mature vaccinia virus visualized by in situ atomic force microscopy, *J Virol* 2003; 77(11): 6332-6340.
- McNamee CE, Pyo NY, Tanaka S, Kanda Y and Higashitani K. Imaging of a soft weakly adsorbing living cell with a colloid probe tapping atomic force microscope technique, *Colloids Surf B Biointerfaces* 2006; 47: 85-89.
- Roberts DM, Karunarathna A, Buckley NA, Manuweera G, Sheriff MH and Eddleston M. Influence of pesticide regulation on acute poisoning deaths in Sri Lanka, *Bull World Health Organ* 2003; 81(11):789-798.
- Santos NC, and Castanho MARB. An overview of the biophysical applications of atomic force microscopy. *Biophys Chem*, 2004; 107: 133-149.
- Schoeters G, Den Hond E, Dhooge W, van Larebeke N and Leijts M. Endocrine disruptors and abnormalities of pubertal development, *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 102(2): 168-175.
- Suntres ZE. Role of antioxidants in paraquat toxicity, *Toxicology* 2002; 180: 65-77.
- Ying GG, Williams B and Kookana R. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates-a review, *Environ Int* 2002; 28(3): 215-226.
- Yoshimura SH, Kim JB and Takeyasu K. On-substrate lysis treatment combined with scanning probe microscopy revealed chromosome structures in eukaryotes and prokaryotes, *J Electron Microsc* 2003; 52(4): 415-423.