



THEME 01

AFM을 이용한 세포의 기계적 특성 연구

이 상 명 | 강원대학교 화학공학과, 전임 강사

윤 의 성 | 한국과학기술연구원 바이오마이크로시스템연구단, 단장 | e-mail : esyoon@kist.re.kr

이 글에서는 AFM을 이용한 다양한 세포 모델의 기계적 특성 분석 기술과 이를 바탕으로 한 의학적 응용 기술에 대해 알아보려고 한다.

세포는 세포질(cytoplasm) 내에 액틴 섬유(actin filament), 중간 섬유(intermediate filament) 그리고 미세소관(microtubule) 등 구조적으로 정교하게 배열되어 있는 단백질 섬유들을 가지고 있다. 이들은 3차원 구조의 세포 골격(cytoskeleton)을 형성하고 있는 주요 요소이며, 살아있는 세포가 이동, 접촉 및 분화 할 때 역동적으로 조합(polymerization/assembly)과 분해(depolymerization/disassembly)를 반복한다. 그리고 세포 골격은 세포 모양과 기계적 강도를 유지할 뿐만 아니라 세포간 신호 전달과 세포 내 물질 전달에도 중요한 역할을 하고 있다. 따라서 외부의 어떤 자극에 의해 세포 골격이 변하게 되면 세포 탄성(cell elasticity 또는 cell stiffness) 역시 변화를 일으키게 된다. 이런 배경에서 세포역학에 관한 연구들이 다양한 기기를 이용하여 수행되고 있으며 더 나아가 세포의 기계적 특성과 인간의 질병과의 상관관계를 밝히는 연구들이 최근 들어 활발히 이루어지고 있다.

세포의 기계적 특성 측정

세포의 기계적 특성은 Atomic

Force Microscopy(AFM), Cytoindentation, Magnetic Twisting Cytometry(MTC), optical tweezer, micropipette aspiration 등의 다양한 기법을 통해 분석되고 있다(그림 1). 특히 마이크로/나노기술의 발달과 함께 AFM은 세포역학 분야에서 새로운 전기를 맞이하게 되었다. 일반적으로 living cell의 경우 형광 염색법을 이용하여 세포 골격의 변화와 반응을 관찰하고 분석했다고 한다면, AFM을 이용해서는 living cell의 이동, 분열 및 외부적 자극에 대한 세포 골격의 모습을 실시간으로 관찰하고 물리적 특성의 변화를 총체적으

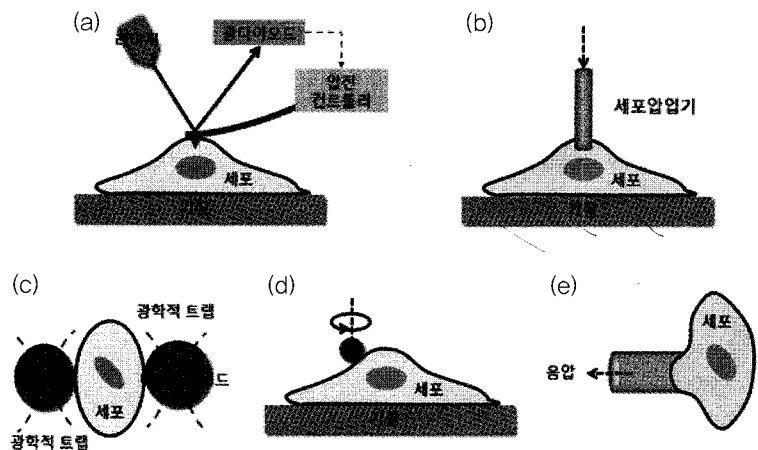
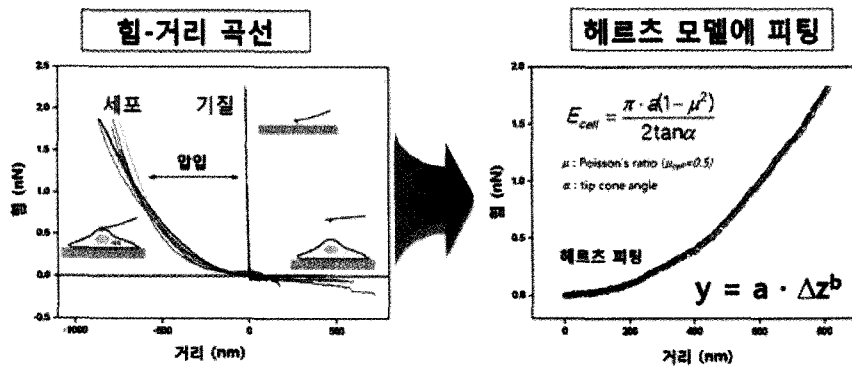
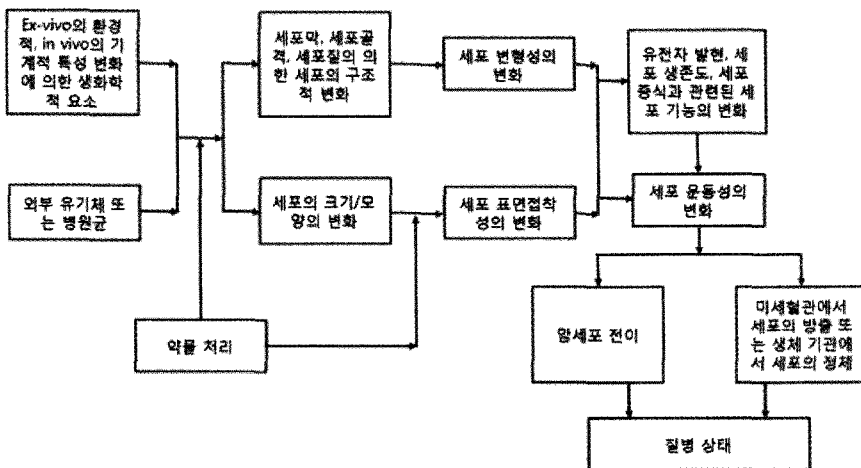


그림 1 세포의 기계적 특성 분석을 위한 기법들 (a) 원자현미경(atomic force microscopy), (b) 세포압입법(cytoindentation), (c) 광학집계(optical tweezer), (d) 자기 비틀림 세포측정법(magnetic twisting cytometry), (e) 미세피펫 흡입법(micropipette aspiration)



AFM을 이용한 세포의 탄성계수 측정



세포의 구조-특성-기능-질병 간의 상관관계도(Suresh 등, Acta Biomaterialia, 2007에서 인용)

로 관찰할 수 있다. AFM을 이용해서 세포 탄성을 측정하는 과정은 cytospin법 또는 ex vivo culture법을 통해 표면에 고정된 세포의 일부를 AFM 팁으로 눌렀다가 회복될 때(approaching-retracting) 보이는 AFM 팁의 힘을 Force-Distance(F-D) curve로 그리게 되고 이를 Hertz 모델에 적용함으로써 세포의 탄성계수(Young's modulus)를 구할 수 있다(그림 2). Hertz 모델이 이상적인 물질(isotropic, homogeneous and uniformly thick)의 탄성계수를 추정하는 모델식이긴 하지만 통계적으로 볼 때 세포 분석에 적용하기에 무리가 없다. 뿐만 아니라 분석 세포의 종류가 같을 경

우 세포의 고정 방법에 상관 없이 탄성계수에는 큰 차이가 없다고 알려져 있다. 다만, ① AFM 팁을 누르는 위치가 세포핵 주위의 중심부인지 아니면 세포의 가장자리인지에 따라 기저 표면에 의한 오차가 발생하고, ② AFM 팁의 모양(구형 vs 피라미드형)에 따라 Hertz 모델식이 달라지기 때문에 측정상, 해석상의 노하우가 필요하다. 뿐만 아니라 ③ Live cell의 탄성도는 세포의 타입과 기능에 따라 수십 Pa에서 100Pa로 다양하기 때문에 분석 대상의 탄성 계수에 맞는 AFM 팁을 고르는 것 또한 중요하다.

MIT의 S. Suresh(Acta Biomaterialia, 2007)는 세포역학과 관련된 '구조(structure)-특성(property)-기능(function)-질병(disease)' 간 상관도를 주장하였다(그림 3). 외부적인 자극에 세포가 반응을 하여 어떻게 구조와 기능에 변화를 일으키며 결국 정상 세포가 어떻게 질병 세포로까지 연결되는지에 대해 세포역학적인 해석을 제시하고 있다. 지금까지의 AFM을 이용하여 세포의 기계적 특성을 분석한 연구 결과들은 Suresh 교수가 제시한 이 상관도의 범주를 크게 벗어나지 못하고 있다. 약물을 이용해 특정 세포를 자극하거나 또는 외부의 생화학적 요소, 미생물 또는 바이러스의 영향을 받은 세포를 화학적으로 자극함으로써 세포 골격의 기계적 특성, 세포의 크기 및 형태의 변화

에 대한 연구가 많이 이루어졌다. 또한 전이성 암이나 질병에 관한 세포 역학적 진단 기법으로서 AFM이 이용되어 왔다.

자극에 의한 세포의 기계적 특성 변화

화학적 자극은 일반적으로 액틴 섬유, 중간 섬유, 미세소관을 선택적으로 붕괴시킴으로써 세포의 변형(deformability)을 일으키고, 세포의 정상적인 이동, 분화, 신호 전달을 방해하게 된다. Cytochalasin, Latrunculin, jasplakinolide, nocodazole(이상 액틴 섬유), sphingosylphosphorylcholine(이상 중간 섬유), colchicines, colcemide, Taxol(이상 미세소관), 등이 세포 골격에 영향을 미치는 약물로 알려져 있다. 이와 관련된 연구는 1990년대 이전에도 진행되었으나 정량적이지 못하고 직접적인 결과를 보여주지는 못하였다. 이후 1990년대 들어 AFM이 본격적으로 세포 생물학에 적용되면서 세포 골격에 미치는 약물의 영향을 정량적이고, 총체적으로 분석한 연구 결과들이 보고되기 시작하였다.

C. Roch 등(Biophysical Journal, 2000)은 *in vitro*에서 배양된 3T3/NRK 두 종류의 fibroblast에 Cytochalasin B/D와 Latrunculin A, jasplakinolide을 처리하여 세포 골격의 변화를 AFM으로 실시간 이미징(5분 간격)했을 뿐만 아니라 탄성도 지도(elasticity map)를 통해 세포의 각 부분별 탄성도의 변화를 실시간으로 확인하였다. 5~30 μM 의 Cytochalasin B/D를 세포에 처리했을 때 액틴 섬유가 분해되어 탄성도가 컨트롤에 비해 약 30% 정도로 감소되는 것으로 관찰되었다. 특히 cytochalasin D의 경우에는 액틴 섬유가 분해 후 세포질 내에서 뭉쳐지는(aggregation) 현상을 보였다. Latrunculin A는 0.1 μM 의 비교적 적은 농도에서도 액틴 섬유의 분해를 유도하였고, 컨트롤에 비해 40~70%의 탄성도를 보여주었다. 또한

jasplakinolide는 fibroblast의 탄성을 농도에 따라 16~40% 정도로 떨어뜨렸지만 이는 액틴 섬유의 분해 때문이 아니라 액틴 섬유 뭉치가 풀림으로써 탄성도가 낮아진다고 보고하고 있다. W. Lam 등(Blood, 2007)은 좀더 의학적인 응용에 가까운 시도를 하였다. 급성 림프아세포종 세포(Acute Lymphoblastic Cell: ALC)와 백혈병 세포(leukemia cell)에 dexamethasone과 daunorubisin을 노출시킨 결과 세포들의 탄성도가 두 배 가까이 증가함을 확인하였고, 세포 자살(apoptosis)이 진행될 때 caspase가 활성화되기 직전에 탄성도가 변하기 시작하며 세포자살 메커니즘이 완료되면서 탄성도가 최고에 도달한다는 결과를 보여주었다. 뿐만 아니라 마이크로 채널 내에서 이 세포들의 이동속도가 느려짐을 증명하여 이 약물들이 잠재적으로 야기할 수 있는 혈관 질환의 위험성을 보고하고 있다.

세포 또는 조직의 기계적 특성 분석을 통한 질병 진단

'구조-특성-기능-질병' 상관도에서 봤을 때 최종 downstream에 해당하는 것은 '질병'이다. 즉 의학과 관련된 학문들의 최종적 용도는 질병의 진단과 치료 및 예측이다. 세포 역학 즉 세포의 기계적 특성을 측정하고 분석하는 연구 또한 이런 점에서 맥을 같이하고 있다. 그전까지는 AFM을 세포의 반응을 측정하고 생화학적 메커니즘을 밝히는 연구가 위주였다면 2007년 이후에는 나노역학적 도구를 의학적인 진단 도구로 이용하려는 적극적인 움직임이 있어 왔다.(그림 4)

S. Cross 등(Nature Nanotechnology, 2007; Nanotechnology 2008)은 AFM을 의학적인 진단 도구로서 이용하였다. 이들은 환자 7명의 늑막액(pleural fluid)으로부터 전이성 암세포(metastatic cancer cell)가 포함된 세포군을 추출한 후 12시간 동안 *ex vivo*에

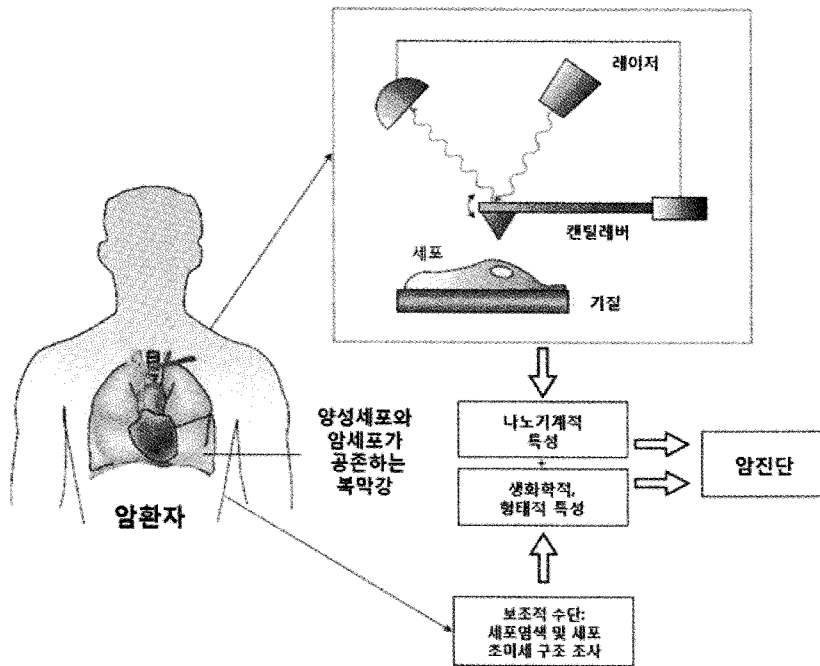


그림 4 복막간에 공존하는 암세포와 양성세포의 기계적 특성의 차이를 이용한 암 진단(S. Suresh 등, Nature Nanotechnology 2007 인용)

서 배양하거나 또는 1분 간 cytospin한 후 AFM으로 세포들의 탄성도를 측정하였다. Ex vivo의 경우 암세포가 정상세포보다 70% 정도 탄성도가 낮았으며, 세포의 분포도는 암세포가 정상세포에 비해 5배 정도 좁은 모습을 보였다. Cytospin의 경우도 거의 유사한 결과를 보여주었는데 암세포가 정상세포보다 80% 정도 탄성도가 낮았으며 세포의 분포는 암세포가 정상세포에 비해 6배 정도 좁았다. 이들의 나노역학적 결과는 종전의 면역염색법을 통한 결과와 일치하는 것으로 보아 AFM의 의학적 가능성을 넓혔다고 볼 수 있다. 이후 다른 그룹들에서 뇌종양 세포(C6 glioma), 유방암 세포(MCF-7), 급성 림프구성 백혈병(Jurkat)과 정상세

포들의 탄성을 비교한 보고들이 속속 발표되었다. 또한 신체의 조직 중 노화와 함께 퇴화하면서 직접적으로 질병화되는 것이 관절의 연골(articular cartilage) 조직이다. M. Stolz 등(Nature Nanotechnology, 2008) 관절염이 걸린 쥐의 고관절 연골을 이용하여 연령에 따른 연골 세포의 탄성도를 측정하였을 뿐만 아니라 7명의 퇴행성 관절염 환자로부터 연골 샘플을 채취하여 관절염 진행 정도와 연골 조직의 탄성과의 상관관계를 보여주었다. 이 결과로 볼 때, AFM이 실시간 관절경 검사(arthroscopy)에 결합되어 연골 조직의 탄성도를 이용하여 관절염의 진행 정도를 진단하

고, 퇴행성 관절염을 조기에 발견할 수 있는 날이 곧 올 것이다.

이상으로 AFM을 이용한 다양한 세포 모델의 기계적 특성 분석 기술과 이를 바탕으로 한 의학적 응용 기술에 대해 알아보았다. 아직 분석 대상에 따라 방법을 최적화해야 하는 까다로움이 있고, 환경의 영향을 많이 받는 기술이기 때문에 소형화하거나 의학적 용도로 사용하기에는 아직 무리가 있다. 하지만 NEMS/MEMS 기술의 발달과 보조 분석 기술과의 융합을 이룰 수 있다면 이러한 기대는 먼 미래의 이야기만은 아닐 것으로 생각된다.