

< 논문 >

전반사 형광 이미지 분석을 통한 세포 부착점의 운동 특성에 관한 연구

이용구* · 진승완** · 구상모* · 유정열†
(2006년 10월 23일 접수, 2007년 1월 29일 심사완료)

On the Dynamic Characteristics of Cell Contact by Analyzing TIRF Images

Yongku Lee, Songwan Jin, Sangmo Koo and Jung Yul Yoo

Key Words : Cell Adhesion(세포 부착), Close Contact(근접점), Evanescent Wave(소멸파), Focal Contact(접착반), Metamorphosis(변성), Total Internal Reflection Fluorescence(전반사형광)

Abstract

We carried out an image analysis of living cells forming their contacts at the bottom of the cell culturing substrate. In order to visualize the contact area selectively, we adopted total-internal-reflection-fluorescence (TIRF) method, which can illuminate the specimen volume within only several hundred nano-meters above the substrate. From the fluorescent intensity of the TIRF image, we could calculate the distance of the cell surface from the substrate. As a result, we visualized the origin of cell contacts, their movements, and the change of cell-contact type from the close-contact into focal-contact with information of its vertical displacement representing the temporal evolution process of the three-dimensional cell-surface-profile near the contact area during this metamorphosis.

기호설명

- d_p : 소멸파(evanescent wave)의 특성 깊이 (nm)
- I : 소멸파의 세기 (W)
- n : 굴절률
- z : 바닥면으로부터의 거리 (nm)
- λ : 빛의 파장 (nm)
- θ_i : 입사각 (°)
- θ_r : 반사각 (°)
- θ_t : 임계각 (°)

1. 서론

다양한 약물 환경에서 적응 또는 부적응 반응을 하는 세포의 양상을 가시화함으로써 그 결과를 임상 진단 또는 기존의 동물 실험 등의 단계를 대신한 신약 개발에 적용하고자 하는 시도는 전통적인 실험 과정에서 소요되는 막대한 비용과 시간을 획기적으로 절약할 수 있다는 점에서 최근 산업계와 학계의 큰 관심을 끌고 있다.⁽¹⁾

혈구 등을 제외한 대부분의 동물 세포는 바닥 또는 다른 세포와 결합하여 생명 활동을 유지하는 부착성 세포로 이들의 환경 적응 상태는 부착성의 정도를 가지고 판단이 가능하다고 알려져 있다.^(2,3) 기존의 방법으로 이러한 부착성의 정도를 판단하는 것은 부착 반응 후 배양 및 세척을 반복함으로써 부착면에 남아 있는 세포 수의 통계적인 처리를 통해 부착의 정도를 판단하는 노동 집약적인 과정

† 책임저자, 회원, 서울대학교 기계항공공학부, 서울대학교 정밀기계설계공동연구소
E-mail : jyyoo@snu.ac.kr
TEL : (02)880-7112 FAX : (02)883-0179

* 회원, 서울대학교 기계항공공학부

** 회원, Univ. of California, San Francisco, USA

을 통해서 가능하였으며, 그 과정에서는 단일 세포의 부착성 정도나 부착의 과정을 알 수는 없다. 또한 형광 프로브(fluorescent probe)를 이용하여 접착반을 관찰하는 방법도 있으나 이는 결합된 프로브가 세포 내 구조물의 운동성에 영향을 줄 수 있고 무엇보다도 세포 고정 과정을 필요로 하기 때문에 세포의 부착 과정을 지속적으로 살펴볼 수 없는 한계를 가지고 있다.

이에 본 연구에서는 전반사형광 (total internal reflection fluorescence(TIRF))기법^(4,5)을 이용하여 세포가 결합하는 부착면과 세포 사이의 수 십 nm 영역에서 관찰되는 세포 부착점⁽⁶⁾의 동적 거동을 정량적으로 기술하고자 하였다. TIRF 기법을 이용한 기존의 연구에서는 세포 부착점의 일종인 접착반(focal contact)의 정적인 양태만을 기술하거나 제한적인 변화만을 다루는 연구가 있었을 뿐이고, 접착반 형성 이전 형태인 근접점(close contact)에 대한 구체적인 연구나 변이 과정을 실시간으로 다룬 연구는 없었다. 본 연구에서는 근접점의 형성과 이동 그리고 그 과정에서 변성하는 부착점의 3 차원 형상 변화를 시간에 따라 살펴보고자 한다.

2. 연구 방법

2.1 재료

2.1.1 세포 가시화 및 유지

본 연구에서 사용한 세포는 사람의 신장 세포에서 분리 증식한 HEK(human embryonic kidney)-293Cell 이다. 모세포군으로부터 분양된 세포를 적절하게 분주하고 배양하기 위해서 세포의 양분 공급원인 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium)을 사용하였으며 여기에 바닥 면과 세포의 부착을 용이하게 하기 위한 FBS(fetal bovine serum) 10 %와 특정 세포 이외의 증식을 막고 오염을 방지하기 위한 50 u/ml 의 페니실린 (penicillin)을 첨가하였다.

세포의 형광 가시화를 위해서 해당 세포 내에 녹색 형광 단백질(GFP: green fluorescence protein)을 생성할 수 있는 특정 유전자를 주입시켰다. GFP는 해파리의 일종인 아쿠오리아 빅토리아(Aequorea Victoria)나 바다 판지(sea pansy)등에서 추출한 단백질로 녹색 형광을 발한다. 일반적으로 유전공학 연구시 유용한 단백질을 생산하기 위한 특정 유전자를 박테리아 등의 세포에 주입할 때 GFP 유전자를 함께 주입하여 시각적으로 원하는 세포를 구

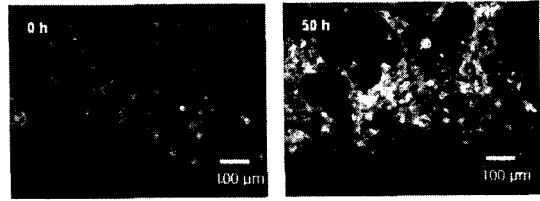


Fig. 1 Fluorescence enhancement by transfection of adenovirus containing GFP gene

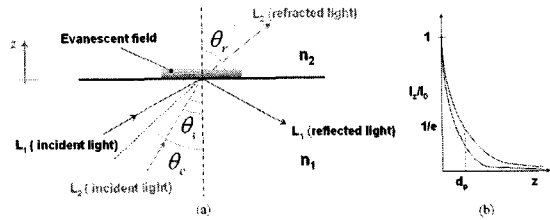


Fig. 2 (a) Schematics of evanescent field generation by TIRF microscopy and (b) its intensity decline in the z direction. It vertically extends several hundred nanometers into the medium

분하고자 할 때 주로 사용되는 방법이다. 일반적인 GFP는 395 nm의 보라빛에 여기되어 509 nm의 녹색빛을 방출한다. 본 연구에서는 광학적 특성인 여기 파장대와 발산 파장대가 알맞게 조정되어 형광 실험에 용이한 eGFP(enhanced GFP)를 선정하였다. 이 단백질은 488 nm 근방의 파장에서 여기하여 508 nm의 파장의 빛을 발산하며 GFP보다 35배 정도 더 밝다고 알려져 있다. 본 실험에서는 전반사한 빛에 의해 형성된 약한 강도의 전자기파내에서도 적절한 형광 밝기가 필요하기 때문에 eGFP 유전자를 가진 기능성 바이러스(adenovirus)를 이용하여 형광 발현을 증대시켰다. 이 바이러스 첨가 후 50 hr 이 지난 세포 형광 발현의 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 동일한 광원에서 보다 향상된 형광 밝기로 변화 되었음을 확인할 수 있다.

2.1.2 세포 부착점

세포 부착점은 형태, 기능, 그리고 구성 물질에 따라 다양하게 분류할 수 있다. 본 연구에서 고려하는 접착반(focal contact)과 근접점(close contact)은 세포가 바닥에 결합하는 방식과 바닥과의 거리에 따른 분류이다. 접착반은 바닥과 구조적으로 결합하는 다분히 지속적인 결합이며 빈쿨린(vinculin), 액틴(actinin) 등의 다양한 결합 단백질들이 관련된다고 알려져 있다.^(7,8) 이러한 결합 단백질들은 세포가 이동하거나 분리될 때 해체되었다가 다른 근접점이 형성 될 때 재활용되어 쓰이게 된다. 이에 반해 근접점은 구조적인 결합이라기 보다 접착반

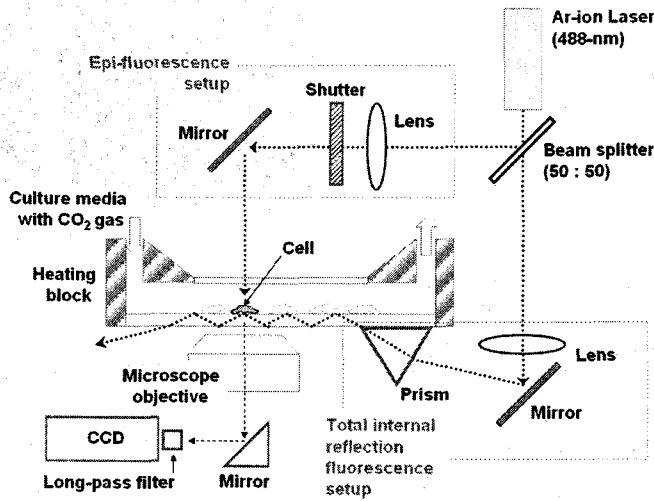


Fig. 3 Schematic drawing of the experimental setup. The beam from the Ar-ion laser source travels by being splitted into two pathways, one for epi-fluorescence (EF) and the other for total internal reflection fluorescence (TIRF). The beam for EF setup becomes focused through a convex lens in order to intensify the exciting light on the cell, while the other beam for TIRF setup travels by being focused through a convex lens and reflected toward the glass plate attached by the prism for refracting the beam. If the shutter in EF setup is closed, only near-surface images can be obtained thanks to TIRF without being interfered with bulk fluorescence. Then, the emission light from the cell is detected by the microscope objective lens and sent to CCD camera with a long pass filter in front of its inlet for diminishing noise from other wavelength band. Culture media with CO₂ gas was supplied and heating block was installed for the purpose of maintaining metabolism of the cell

이 형성되기 전 세포와 바닥간의 접촉 정도의 의미가 강하다. 접촉반을 형성하지 않고 사라지거나 다른 영역으로 이동할 수가 있다고 알려져 있다.⁽⁹⁾ 근접점은 구조적인 결합이 아닌 까닭으로 끊임 없이 이동하거나 변형한다. 정지된 촬영 이미지만으로는 근접점과 접촉반을 구분하기는 매우 힘들다. 정지된 이미지로 구분하기 위해서는 접촉반을 이루는 구조 단백질(vinculin 등)의 labeling이 필요한데 이는 세포를 고정하거나 활동성의 영향을 주는 방법으로 본 실험에 맞는 방법은 아니며, 접촉반과 근접점을 구분하는 유일한 방법은 활동성이다.

2.2 원리와 방법

2.2.1 전반사형광(TIRF) 기법

Fig. 2와 같이 빛이 밀(密)한 매질(굴절률 n_1 인 매질)에서 소(疎)한 매질(n_2 인 매질)로 진행할 때 입사각이 두 매질 간의 굴절률 비에 따라 특정한 각도 이상이 되면 입사된 빛이 전반사 한다. Snell의 법칙에 의해서 이 특정한 각도(θ_c)는 식 (1)과 같이 표시할 수 있다. 이 경우 전반사가 일어난 매질의 반대 방향으로 미세한 전자기장이 형성되

는데 이를 소멸파장(evanescent field)이라고 한다. 이 영역은 입사광의 파장, 입사각 그리고 굴절률에 따라 변하며 관계는 식 (2)와 같다.

$$\theta_c = \sin^{-1}(n_2/n_1) \tag{1}$$

$$d_p = \frac{\lambda}{4\pi n_1 \sqrt{\sin^2 \theta_i - (n_2/n_1)^2}} \tag{2}$$

$$I_z = I_0 \exp(-z/d_p) \tag{3}$$

한편, 이 전자기장은 바닥으로부터 수백 nm 이내의 영역의 형광만을 여기 시키는 특징⁽¹⁰⁾이 있으므로 세포의 부착점 등과 같이 바닥 근처의 형광만을 선택적으로 가시화할 때 사용이 가능하다. 이 경우의 광학적 특징을 Fig. 2(b)에서 보여주고 있다. 소멸파장 안에서 형광 물질이 이동할 때 여기 되는 형광의 밝기는 바닥으로부터의 거리가 증가함에 따라서 지수함수적으로 감소하는 특징이 있다. 식 (3)으로부터 서로 다른 두 밝기를 발하는 부분이 얼마나 바닥으로부터 떨어져 있는지를 계산해 낼 수가 있다.

일반적으로 전반사 형광 현미경에는 크게 대물 렌즈 기반과 프리즘 기반의 전반사 기법이 사용된다.

2.2.2 실험 장치

Fig. 3은 본 실험에서 사용한 장치의 개념도이다. 기존의 여러 TIRF장치와는 달리 세포의 부착 과정을 장시간 촬영 할 수 있도록 배양 장치와 일체형으로 제작하였다. 또한 프리즘을 통해 슬라이드 글라스로 진입한 광선이 내부에서 여러 번 전반사 하면서 이른바 multi-area evanescent field 가 형성되며 이는 여러 곳의 세포를 전반사형광으로 관찰하기에 편리하도록 고안하였다.

배양기 밖에서 세포를 일정기간 보존시키기 위해서는 적절한 대기 온도(37°C) 와 이산화탄소(CO₂) 농도(5%)를 유지하는 관류(perfusion) 장치가 필요하다. 이를 위하여 전도체인 ITO(indium tin oxide)로 코팅된 배양 바닥 면과 상용 제어 장치(T-Culture system; Bioptechs®, USA)를 연계하여 히터로써 작용시켰으며 유체-비접촉식 연동 펌프(peristaltic pump)를 연결하여 이산화탄소-배양기(CO₂-incubator) 내부 챔버로부터 적절한 농도의 이산화탄소가 포함된 배양액이 적절하게 유입 되도록 하였다.

광원으로는 eGFP를 여기 시킬 수 있는 488 nm 파장의 빛을 방출하는 아르곤-이온 레이저(Ar-ion laser)(Stabilite 2017; Spectra-physics® Co., USA)를 사용하였으며, 전반사에 필요한 입사각을 구현하기 위하여 대물렌즈 기반의 전반사 형광 현미경보다 구성과 광학적 정렬이 편리한 프리즘(Edmund® Co., USA) 기반의 방법을 선택하였다.

세포의 전반사 형광의 전체적인 변화를 알아보기 위하여 10X의 대물 렌즈(UPlanFL 10X, Olympus® Co., Japan)를 사용하였고 보다 세부적인 전반사 형광 이미지의 변화를 관찰하기 위해서 50X의 대물

렌즈를 이용하였다. 이 때 프리즘에 의한 간섭을 줄이기 위하여 작동거리(working distance)가 10 mm 이상인 렌즈(M Plan Apo 50X, Mitutoyo® Co., Japan)를 사용하였다. 대물렌즈를 통한 빛은 필터(HQ520LP, Chroma® Co., USA)를 통해 여기된 파장대 이외의 노이즈를 제거한 후 CCD카메라로 들어가게 된다. 강제 냉각식(cooled-CCD) 고해상도 카메라(PCO Sensicam CE, Cooke® Co., USA)로 획득한 영상은 카메라와 연계된 영상처리 소프트웨어인 Camware®(Spectra-physics® Co., USA)로 저장하였다. 이미지의 분석은 상용 소프트웨어인 매트랩(Matlab®, MatWorks® Co., USA)을 이용하였다.

3. 결과 및 토의

3.1 세포 부착점의 형성

Fig. 4는 배양중인HEK293 세포가 다양한 광학 조건에서 어떻게 보여지는지를 나타내 주고 있다. 세포를 바닥에 부착시키기 위해서 살포 배양한 지 1 hr 이후의 영상이다. 할로겐램프(halogen lamp)로 조사(照射)할 때 관찰되던 일부 세포[Fig. 4(a)에서 상단과 우측 하단에 위치하는 세포]는 Fig. 4(b)에서와 같이 머큐리 램프(mercury lamp)로 형광을 발현하여 관찰할 때는 나타나지 않았다. 이는 eGFP가 제대로 발현되지 않은 세포, 즉, 원하는 유전자를 함유하고 있지 않은 세포거나 다른 물질임을 의미한다. 또한, 머큐리 램프가 비추는 상황에서 형광을 발하던 일부 세포[Fig. 4(b)에서 왼쪽 위치]가 아르곤-이온 레이저를 이용한 전반사형광에서는 나타나지 않았는데 그것은 해당 세포가 바닥에 적절하게 부착하고 있지 않음을 의미한다. 다시 말해서 일반적인 표면 형광 관찰을 통해서서는 원하는 세포의 유무만 알 수 있을 뿐이고 전반사 형광을 통해서서는 해당 세포의 원활한 성장도 미루어 짐작할 수 있다는 점을 주목하게 된다. 이 때 전반사형광 이미지에서 보여지는 작은 점[Fig. 4(c)]들은 세포 부착점(근접점 또는 접착반)을 나타낸

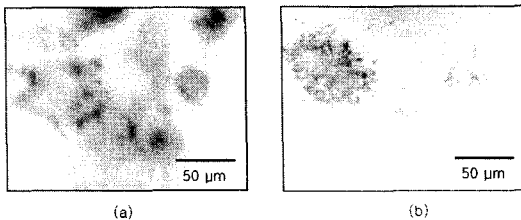


Fig. 4 Negative images for the field of view of culturing cells: darkness is correlated with fluorescence. (a) EF and (b) TIRF microscopy image in which focal contacts are shown scattered as like dots where the cells adhere to the substratum properly

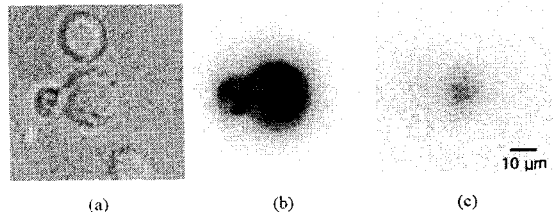


Fig. 5 Microscopic negative images of human kidney cells with eGFP after 1-hour perfusion: (a) Bright field image (halogen lamp), (b) Epi-Fluorescent (EF) image (mercury lamp), (c) TIRF image (Ar-ion laser)

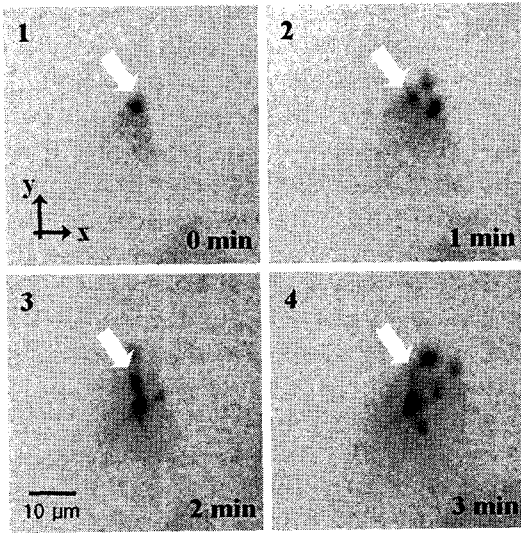


Fig. 6 Time-series TIRF microscopy negative images of a cell forming its close contacts when it starts to adhere to substratum. The arrow represents the same close contact that moves with time varying its intensity

다.(이미지 해상도의 한계로 명확한 크기는 알 수 없고 1 μm 이내라고 짐작할 수 있다) 세포는 바닥에 부착할 때 전체 면을 접촉하는 것이 아니라 이처럼 몇 개의 점으로만 부착을 하게 된다.

Fig. 5는 50X의 대물렌즈로 관찰한 일반 표면 형광과 전반사 형광 이미지를 비교한 영상의 역상 이미지로 살포 배양후 24 hr 이후의 상태이다. 10X의 영상보다 세포의 부착 유무 지역과 접촉반의 형태를 보다 자세하게 관찰 할 수 있다. Fig. 5(a)는 일반 표면 형광 이미지로 1 hr 경과하였을 때와 비교하여 세포의 경계를 구분할 수 없을 만큼 주변 세포와 연결 되어 있다. 이는 기존의 세포가 증식하여 주변으로 영역을 넓혔기 때문이다. 이 경우에도 Fig. 5(b)를 살펴보면 바닥과 여러 접촉반을 조밀하게 형성하고 있는 영역[Fig. 5(b)의 좌측 상단]이 있는가 하면 전혀 형성하고 있지 못한 영역[Fig. 5(b)의 중하단과 우상단]도 있다

세포와 바닥 사이에 접촉반이 생성되기 전에는 부착점의 초기형태인 근접점이 형성된다. 이러한 근접점은 이동하고 변화하며 때로는 접촉반을 형성하지 못하고 사라지기도 한다. Fig. 6은 시간에 따른 근접점의 생성 과정의 한 예를 보여주고 있다. 각 영상의 간격은 1 min으로 초기 생성된 근접점 근처에 점차적으로 다른 근접점들이 생성되고 있음을 관찰할 수가 있었다. Fig. 4(c)에서 관찰된 접촉반과 비교하여 상대적으로 영역이 크다는

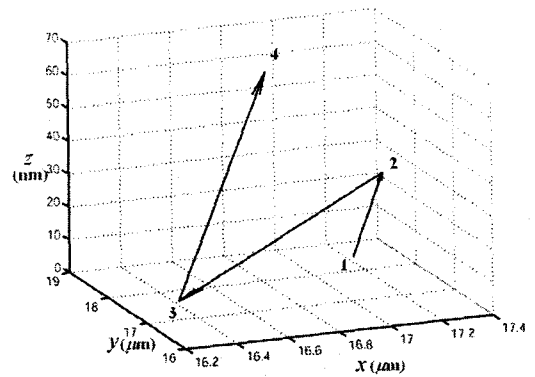


Fig. 7 Three-dimensional displacement of the center of the close contact area arrowed in Fig. 6. Each point has 1-min time interval

것을 관찰할 수 있다. 이는 향후 근접점의 형태 변화에 관한 고찰에서 보다 더 자세하게 다루게 된다.

3.2 세포 부착점의 이동

세포가 다수의 근접점을 형성해 가면서 적절한 위치에 접촉반을 형성하기 전까지는 근접점은 근처 영역으로 이동하기도 하고 크기도 변하고 사라지기도 하는 것이 본 실험을 통해서 관찰되었다. Fig. 6에서 화살표로 표시된 근접점의 형광은 시간에 따라 흐려지거나 밝아지고 크기가 변하며 중심이 이동하기도 한다. 2.2절의 식 (2), (3)을 이용하여 밝기의 변화로부터 근접점의 수직 방향 변위를 계산해 낼 수 있다. 또한 수평 방향의 변위는 영상의 픽셀의 크기를 고려하면 쉽게 구할 수가 있다. 계산에 사용된 상수 값은 표1에서와 같다. 이를 통해서 근접점 중심의 3차원 움직임을 Fig. 7에서와 같이 나타내었다. 근접점의 중심은 수평 방향으로로는 800 nm가량의 움직임을 보였고 수직 방향으로로는 60 nm 정도의 이동이 있었다고 계산되었다. 각 점의 간격은 모두 1 min이므로 그림에서 보여지는 화살표는 변위 벡터이면서 속도 벡터로 볼 수 있다. 이 중심을 찾기 위하여 2차원 가우시안 피팅(Gaussian Fitting) 기법을 이용하였기 때문에 중심의 위치는 최대 단위 픽셀의 크기의 오차가 생길 수 있다. 상술하자면 근접점이 정확히 구형이 아니므로 피팅시에 유효 반지름을 지정하기가 어렵다. 그러므로 최대 픽셀의 해당 길이의 절반, 즉 약 0.13 μm의 오차가 존재하게 된다.

본 실험에서는 세포가 무작위로 부착하고 이동할 때의 상황을 관찰한 것이지만 향후 세포가 특정 방향으로 이동할 때의 근접점의 변화는 다분히

규칙성을 가질 것으로 예상되며 이는 유동이나 주화성을 이용한 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

3.3 세포 부착점의 변이

전술한 바와 같이 전반사 형광의 밝기의 변화는 소멸과장(*evanescent field*)이 형성되는 바닥으로부터의 높이 변화의 정보를 담고 있다. 그러므로 세포 형광의 전반사 이미지로부터 3차원 표면 형상을 유추할 수가 있다. Fig. 8은 적절한 환경에서 부착을 증식하며 영역을 확장하고 있는 세포를 2 min 간격으로 50X 대물렌즈를 이용하여 전반사 형광으로 관찰한 영상의 역상들이다. 그림을 살펴보면 형광 영역, 즉 부착 지역이 시간이 지남에 따라서 많아 지고 있음을 볼 수 있다. Fig. 1에서 처럼 세포 개체수가 많이 인접한 경우에는 세포 간의 경계가 모호하여 이 영역이 몇 개 세포의 거동이라고는 말하기는 힘들지만 일반적인 HEK293 세포의 크기(50 μm 전후)와 그림의 스케일바(scale bar)의 길이를 통해 1~3개의 세포가 모여 있는 것

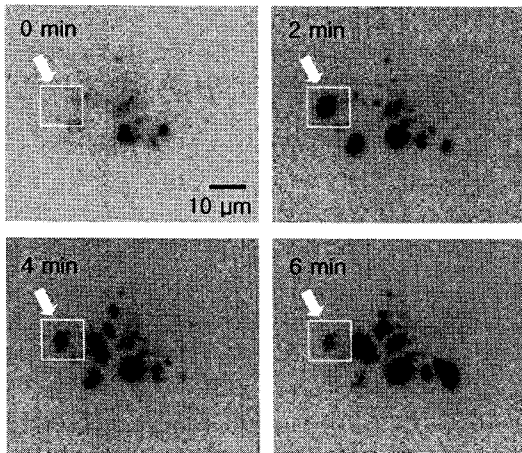


Fig. 8 Time series TIRF microscopy negative images of cell forming its close contacts and changing its shape. We can see the birth of the close contact and its metamorphosis in arrowed area. Initially a cell forms a close contact (0 min), it covers a large area (2 min) and then its area becomes smaller and sharper (4 min, 6 min)

으로 추정할 수 있다. 이 때 EF 장치를 통해서 세포의 윤곽을 살펴볼 수는 있겠지만 입사 광량과 노출 시간을 조정해야 하며 이 과정에서 급격한 광탈색(*photo-bleaching*) 현상을 막을 수 없다.

Fig. 8의 사진들에서 화살표 지역의 밝기 정보를 높이 정보로 환산하여 3차원으로 재구성한 그래프가 Fig. 9이다. 이 경우 같은 높이에서 모든 형광의 밝기는 동일하고 오직 수직 방향 변위에 의해서만 밝기가 변한다고 가정해야 한다. 다시 말해서 전반사를 일으키는 약한 소멸과장 하에서는 광탈색이 일어나지 않는다고 가정하며 형광 단백질은 세포질 내부에 골고루 분포하여 그 밀도에 따라서 형광의 밝기가 달라질 수 있는 가능성은 무시하였다. 여기서 계산에 사용된 상수 값은 표1에서 50X 일 때이다. 이와 같은 방법으로 시간에 따른 근접점의 형상에서 접촉반의 형상으로의 변성(*metamorphosis*)과정을 시간에 따라서 나타내었다. Fig. 9에서 높이 약 15 nm 가 화면에서 가장 밝은 점을 기준 높이로 계산한 세포 표면과 근접점 최하부 사이의 거리라고 볼 수 있다. 실제 바닥과의 거리를 구하기 위해서는 세포가 생성하는 GFP와 같은 성질의 형광 물질을 바닥에 처리하여 그 밝기를 기준으로 해야 하지만 본 연구에서는 부착점의 절대적 위치보다도 위치 변화에 관심이 있으므로 기준점의 실제 위치는 주요하게 고려하지 않았다.

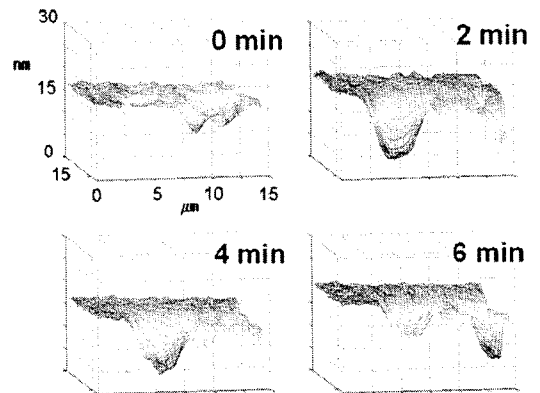


Fig. 9 Metamorphosis of cell-substratum contact; a close contact to a focal contact

Table 1 Variables for calculating the z coordinates with 10X or 50X

n_1	n_2	λ (nm)	θ_c (°)	θ_i (°) @ 10X	θ_i (°) @ 50X	d_p (nm) @ 10X	d_p (nm) @ 50X
1.59	1.33	488	57	65	84	70	45.5

2 min 경과한 그림에서는 초기에 전혀 나와있지 않은 왼쪽 영역의 중간에서 거의 기준 바닥까지 골 같은 형태의 근접점이 생성되는 것이 모델링되었다. 생성된 근접점은 앞서 상술한 바와 같이 위치를 이동하고 크기도 변한다. 이 때 근접점에 해당하는 돌기의 형상도 함께 변하는데 이 과정이 Fig. 9의 4 min 에 큰 돌기 안에 작은 돌기들이 서너 개 생성되는 것을 확인 할 수 있으며 6 min 경과 된 그래프에서는 돌기의 크기가 작아지는 것을 잘 확인할 수 있다. 한편 이 때 돌기의 최하단이 오히려 바닥과 떨어진 것처럼 보인다. 하지만 실제로 근접점보다 접촉반이 바닥에서 가깝다고 알려져 있다.⁽⁹⁾ 이는 접촉반으로 변하면서 영역이 급격히 좁아짐으로 인한 광량의 감소 때문이라고 생각되며 이 결과가 현재의 방법으로 완전히 모델링 되지 못하고 얇은 돌기의 형태로 왜곡되어 나타난 것으로 추정된다. 즉 10 μm 에 가까운 크기의 근접점이 1 μm 이하의 여러 spot으로 나누어 질 때 오는 오차가 있을 수 있기 때문이다. 이와는 달리 Fig. 7에서의 근접점의 이동은 1 μm 전후의 하나의 spot의 이동이므로 모여진 spot의 개수 변화가 가져오는 광량의 변화는 상대적으로 매우 작다고 예상할 수 있다. 추후 연구에서 전반사형광의 광량 변화와 함께 빛이 번지는 현상을 동시에 효과적으로 고찰함으로써 해결될 것이라 생각된다.

이 변화 과정은 세포와 바닥 부착의 초기 단계인 근접점의 형태에서 접촉반으로 변성하는 과정이라 추정하고 있다. 하지만 Fig. 9의 결과만을 통해서 어느 단계에서 근접점이 접촉반으로 완전히 바뀌었는지를 예측하기는 힘들다. 이를 확인하기 위해서는 접촉반이 형성된 경우에만 관련하는 요소 물질, 즉 구성 단백질의 형광 타겟팅(targeting) 등과 같은 특정 단백질 검출 실험이 추가적으로 필요할 것이다.⁽¹¹⁾

4. 결론

본 연구에서 부착성 세포가 바닥과 결합할 때 일어나는 바닥근처 수백 nm 이내 영역의 물리적 현상들을 전반사형광 기법을 이용하여 관찰하고 정량화 하고자 하였다. 이를 위하여 살아있는 세포를 실시간으로 관찰할 수 있는 전반사형광 장치를 제작하고 소멸파의 물리적인 특징을 이용하여 세포 부착점의 수직 방향의 변화를 환산하였다. 본 실험을 통하여 세포가 부착할 때 근접점이 생성, 변화 그리고 운동하는 것을 실시간으로 관찰

하였다. 이 과정에서 근접점이 접촉반으로 변이 되는 과정을 세포 배면의 지형도로써 제시할 수 있었다. 본 연구의 결과로부터 세포가 주어진 환경에서 적절한 생명 활동을 하는지의 여부를 보다 정량적으로 제시할 수 있는 토대를 마련하였다고 평가한다. 즉, 살아있는 세포의 개별 부착 양상이 주어진 외부 환경 아래에서 다양하게 나타나는 현상을 실시간으로 정량화된 3차원 정보로 분석함으로써 약물 개발 및 다양한 생물학적 임상 실험에서 지금까지 수행 되고 있는 노동 집약적 및 시간 소모적인 동물 실험 등을 대체하는 새로운 개념의 실험 기법의 하나로서 의의를 가질 수 있을 것이다. 이는 최근 세계적으로 신약 후보 물질의 스크리닝(screening) 단계를 소형화, 자동화 및 간소화 하는 차세대 기술로서 주목을 받고 있기도 하다.

후 기

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구(R01-2005-000-10558-0)와 서울대학교 마이크로열시스템 연구센터의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- (1) Cooper, J. M. and Cass, A. E. G., 2002, "Miniaturized Screening Technologies for Drug Discovery," *Biochem. Soc. Trans.*, Vol. 30, part 4, pp. 802~806.
- (2) Newgreen, D. F., 1989, "Physical Influences on Neural Crest Cell Migration in Avian Embryos: Contact Guidance and Spatial Restriction," *Int. J. Dev. Biol.*, Vol. 131, No. 1, pp. 136~148.
- (3) Zygourakis, K., 1996, "Quantification and Regulation of Cell Migration," *Tissue Eng.*, Vol. 2, No. 1, pp. 1~26.
- (4) Gingell, D., Heavens, O. S. and Mellor, J. S., 1987, "General Electromagnetic Theory of Total Internal Reflection Fluorescence: the Quantitative Basis for Mapping Cell-substratum Topography," *J. Cell Sci.*, Vol. 87, No. 5, pp. 677~693.
- (5) Burmeister, J. S., Olivier, L. A., Reichert, W. M. and Truskey, G. A., 1998, "Application of Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy to Study Cell Adhesion to Biomaterials," *Biomaterials*, Vol. 19, pp. 307~325.
- (6) Axelrod, D., 1981, "Cell-substrate Contacts Illuminated by Total Internal Reflection Fluorescence," *J. Cell Biol.*, Vol. 89, pp. 141~145.
- (7) Burrige, K. and Fath, K., 1989, "Focal Contacts:

- Transmembrane Links Between the Extracellular Matrix and the Cytoskeleton," *BioEssays*, Vol. 10, No. 4, pp. 104~108.
- (8) Webb, D. J., Brown, C. M. and Horwitz, A. F., 2003, "Illuminating Adhesion Complexes in Migrating Cells; Moving Toward a Bright Future," *Current Opinion in Cell Biol.*, Vol. 15, pp. 614~620.
- (9) Izzard, C. S. and Lochner, L. R., 1980, "Formation of Cell-to-substrate Contacts During Fibroblast Motility: an Interference-reflexion Study," *J. Cell Sci.*, Vol. 42, pp. 81~116.
- (10) Toomre, D. and Manstein, D. J., 2001, "Lighting up the Cell Surface with Evanescent Wave Microscopy," *Trends in Cell Biol.*, Vol. 11, No. 7, pp. 298~303.
- (11) Smilenov, L. B., Mikhailov, A., Pelham Jr., R. J., Marcantonio, E. E. and Gundersen, G. G., 1999, "Focal adhesion motility revealed in stationary fibroblasts," *Science*. Vol. 286, pp.1172~1174.