

세포 및 생체조직에서 확산에 관한 이해

김중경[†]

Understanding Diffusion in Cells and Living Tissues

Jung Kyung Kim

Abstract. Macromolecule diffusion in cells and tissues is important for cell signaling, metabolism and locomotion. Biophysical methods, including non-invasive or minimally invasive in-vivo photobleaching techniques and single quantum-dot tracking, have been used to measure the rates of macromolecule diffusion in living cells and tissues, including central nervous system and tumors. Mathematical modeling and statistical analysis of experimental data revealed various modes of diffusion, which are strongly coupled with spatiotemporal changes in nanoscale structures and material properties.

Key Words: Diffusion(확산), Cell(세포), Tissue(조직), FRAP, Single Particle Tracking(단일입자추적), Quantum Dot(양자점), Mathematical Modeling(수학적 모델링), Monte Carlo Simulation

1. 서 론

2000년대에 들어서면서 생명과학 분야에서는 과거에 주로 서술적으로 기술되고 환원적인 방식으로 연구되어온 생명현상을 보다 전체적인 시각에서 정량적으로 파악하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 생명체의 기본 단위인 세포를 하나의 시스템으로 보고 이를 구성하는 여러 성분들 간의 역동적인 상호작용을 정량적으로 분석하려는 접근방법이 사용되는데, 이 경우 세포는 마치 자동차와 같은 복잡한 시스템으로 간주되고, 세포를 구성하는 수많은 단백질은 자동차의 각종 부품에 비유되기도 한다. 또한, 세포 내에서 발생하는 신호 전달 체계를 전기회로와 유사한 형태로 표현하여 해석하곤 한다. 그러나, 살아있는 세포는 자동차 부품과 같은 공간적으로 고정된 구성 성분을 갖지 않으며, 따라서 세포 내 신호전달을 전기회로와 같은 방식으로 분석하기에는 적합하지 않은 매우 역동적인 시스템이라고 볼 수 있다. 세포의 형태뿐만 아니라 세포를 구성하는 생체분자의 위치도 주로 확산에 의해 시공간적으로 변하게 되며, 이에 따른 다양한 반응의 총체적인 결과

에 의해 세포 기능이 조절된다.

최근들어 생명현상에 관한 근본적인 질문 중의 하나인 세포의 형태와 기능 사이의 관계에 대한 논의가 활발히 진행되고 있으며, 세포 내부 또는 외부 공간에서 생체분자의 확산이 둘 사이의 관계를 설명하는 중요한 요소가 될 수 있음을 보여주는 연구결과가 속속 발표되고 있다.

본 논문에서는 살아있는 세포 및 조직에서 생체분자의 확산에 영향을 미치는 형태학적 특징에 관한 선행 연구결과를 소개하고, 생체분자의 확산 측정 및 해석 기법과 실제 적용 예를 기술하고자 한다.

2. 형태에 따른 확산 제어와 기능 발현

세포와 조직의 형태 및 크기에 따라 생체분자의 확산이 특정한 패턴으로 제어되어 결과적으로 세포 운동성, 조직의 분지 형태형성, 세포 신호전달 등에 영향을 미친다고 보고된 바 있다.

2.1 세포 운동성

세포가 이동할 때, 진행방향으로 돌출된 형태를 가지게 되는데, 이러한 비대칭적인 세포형태가 세포이동 방향을 결정하게 됨을 보인 연구결과가 있다. Verkhovskiy

[†]국민대학교 기계자동차공학부
E-mail: jkkm@kookmin.ac.kr

등¹⁾은 물고기 비늘로부터 채취한 상피세포에서 핵이 포함되지 않은 세포질의 일부 조각을 떼어냈다. 초기에 원형이었던 세포질 조각의 형태를 공기압력을 가해 비대칭적으로 만들었더니 놀랍게도 이 세포질 조각은 Fig. 1과 같이 돌출된 방향으로 진행하기 시작했고, 움직임은 한동안 지속되었다. Jiang 등²⁾은 자기조립 분자박막을 이용해 개별 세포를 다양한 초기 형태로 구속하였다. 전기화학적 탈착을 통해 자기조립 분자박막을 제거해주고 세포의 이동방향을 측정한 결과, 초기에 서양배와 같은 비대칭적 형태인 경우 돌출된 방향으로 진행한다는 것을 알아내었다.

이러한 현상은 세포이동에 관여하는 단백질인 액틴(actin)과 미오신(myosin)이 세포 이동에 필요한 추진력을 발생시킬 수 있도록 세포 내에 적절히 분포되어 액틴-미오신 네트워크를 형성하고, 이동 중에도 이러한 네트워크가 안정하게 유지되기 때문이다. 이동 전 세포의 초기 형태가 액틴과 미오신 단백질의 확산 패턴을 조절했을 것으로 추정할 수 있다.

2.2 조직의 분지 형태형성

젓샘을 포함한 인체의 여러 기관에서 나무가지 형태의 구조를 관찰할 수 있는데, 이 구조는 상피로부터 유래하는 분지 형태형성에 의해 발생한다. Nelson 등³⁾은 미세가공기술을 이용하여 콜라겐 젤에 세포를 특정한 3차원적 형태로 구속하고, 이렇게 형성된 3차원 조직에서 분지 형태형성이 활발한 영역을 관찰하였다. 전산해석을 통해서 얻은 3차원 조직 주위의 자기분비 형태형성 억제물질의 농도분포와 공초점주사현미경을 통한 분지 형태형성 관찰 결과를 종합적으로 분석하였다. 그 결과 3차원 조직의 기하학적 구조에 따라 분포되는 형태형성 억제물질의 농도가 국소적으로 최소가 되는 지점에서 분지 형태형성이 시작됨을 알아내었다.

이러한 연구결과는 조직의 3차원 구조가 자기분비

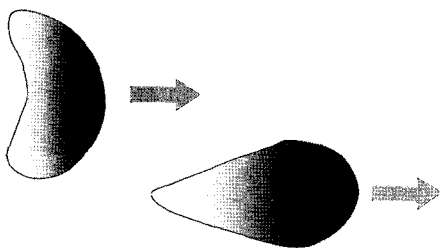


Fig. 1. Self-polarization and directional motility.

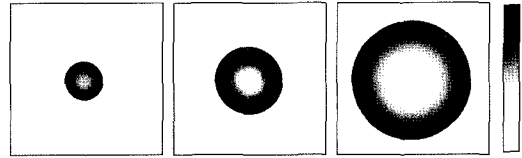


Fig. 2. Control of signaling pathways by cell size.

형태형성 촉진억제물질의 확산을 제어하여 특정한 농도분포를 발생시킴으로써 기관의 형태형성을 조절할 수 있음을 의미한다.

2.3 세포 신호전달

세포 표면에서 활성화된 신호전달물질이 세포 내부에 있는 목표물을 향해 이동할 때 주로 세포질에서의 확산에 의존하게 된다. 확산 과정 중에 세포질에 존재하는 활성화감소제를 만나게 되면 전달되는 신호는 약해지면서 세포막과 세포질 사이에 농도구배가 발생한다. 실제로 이러한 신호전달물질의 농도구배가 실험적으로 관찰된 바 있으며, Meyers 등⁴⁾은 세포의 크기와 모양에 따라 농도구배가 조절될 수 있음을 이론적으로 밝혔다. 특히, 전체적인 농도분포의 변화뿐만 아니라, 세포의 역동적인 형태 변화에 따라 신호전달물질의 농도가 국소적으로 증가하는 영역이 발생할 수 있음을 보였다. Fig. 2는 세포의 크기에 따른 신호전달물질의 농도구배 변화를 나타낸다.

이러한 계산결과는 적어도 이론적으로는 세포의 크기나 모양 등의 형태학적 요소만으로도 신호전달 경로를 전체적으로 또는 국소적으로 제어할 수 있다는 사실을 의미하며, 이는 세포 형태에 따라 생체분자의 확산이 조절될 수 있기 때문이라고 해석할 수 있다.

3. 세포 및 조직에서 확산 측정 및 해석

유전자, 단백질 등을 포함하는 거대분자의 확산은 세포 신호전달, 대사작용, 세포운동에서 중요한 역할을 한다. 세포 내/외 공간에서 확산은 확산되는 물질의 물리화학적 성질뿐만 아니라 매질의 성분, 구성, 기하학적 구조 등에 따라 달라지며, 이는 생체기능 유지와 매우 밀접한 관련이 있다. 그동안 뇌의 세포외공간, 암조직 등의 생체 다공성 매질에서 약물 또는 생체분자의 확산을 평가하는 다양한 연구가 시도되었으나, 비침습적 또는 최소침습적인 정량적 측정기법이 개발될 필요

가 있으며, 살아있는 세포 및 조직에서 측정된 확산 현상을 이론적으로 설명할 수 있는 엄밀한 계산모델이 제시되어야 한다.

3.1 확산 측정을 위한 현미경 이미징 기법

살아있는 세포 및 조직에서 생체분자의 거동 측정을 위해 개발된 다양한 현미경 이미징 기법을 Table 1에 분류 정리하였다.

3.2 세포 외 공간에서 확산 측정

뇌의 세포 외 공간에서 확산은 신경신호 전달과 세포 간의 신호교환을 위해 중요한 역할을 한다. Papadopoulos 등⁵⁾은 살아있는 세포 내/외 공간에서 발생하는 생체분자 확산현상을 정량적으로 측정하고자 기존 FRAP(Fluorescence Recovery After Photobleaching) 기법을 변형한 새로운 Elliptical surface photobleaching 기법을 개발하고, 이를 적용해 mouse spinal cord 세포 외 공간(ECS)에서 나타나는 비등방성 확산 현상을 정량적으로 측정하였다. Monte Carlo Simulation 기법을 적용하여 3차원 공간에서 생체분자의 브라운 운동을 모사하고, 레이저광으로 인한 광표백(photobleaching)에 이어 발생하는 형광신호 회복과정을 이론적으로 계산하였다.

이 연구는 ECS에서 생체물질 확산에 영향을 주는 두 가지 요소인 세포외기질 점성효과와 ECS 기하학적 구조로 인한 비틀림(tortuosity) 효과를 구분하여 각각의 기여도를 처음으로 정량적으로 측정했다는 데에 의의가 있다. 앞으로 ECS 뿐만 아니라 세포 내에서도 DNA, 단백질, 약물 등의 비등방성 확산을 정량적으로 측정하는 도구로 활용이 기대된다.

Table 1. Live cell imaging techniques for diffusion measurements

Point Measurement Techniques
-Fluorescence Correlation Spectroscopy
-Fluorescence Recovery After Photobleaching
-Fluorescence Resonance Energy Transfer
Field Imaging Techniques
-Time Lapse Microscopy
-Confocal Microscopy
-Total Internal Reflection Microscopy
-Fluorescence Ratio Imaging
Particle Tracking Techniques
-Single Particle Tracking
-Multiple Particle Tracking Microrheology

3.3 암 조직에서 확산 측정

현재 임상에 적용되는 암 치료법과 각 치료법이 효능을 나타내기 위해 암조직에 전달되어야 하는 물질(약물)은 Table 2와 같이 정리할 수 있다.

개발된 약물 중에서 배양세포모델을 대상으로 한 실험에서 효능이 확인된 약물이라도 동물실험이나 임상에서 약효가 확인되지 않는 경우가 빈번하다. 이러한 원인 중의 하나는 배양세포모델과 달리 실제 생체모델에서는 약물이 암조직으로 효과적으로 전달되지 않기 때문이다.

암조직에서 약물전달효율을 좌우하는 약물의 확산에 영향을 미치는 인자로는 분자량, 형태, 용해도와 같은 약물의 물리화학적 성질 뿐만 아니라, 암조직의 기하학적 구조, 공극율, 세포외기질의 점성 효과 등이 있다. 이러한 암조직 내 약물전달을 방해하는 다양한 인자를 고려하여 약물의 확산을 통합적 관점에서 정량적으로 평가할 수 있는 이론적/실험적 기법이 확립된다면, 암조직으로의 약물전달 메커니즘 이해를 통해 약물전달효율을 증진시키고 약효를 향상시킬 수 있는 전략을 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

Thiagarajah 등⁷⁾은 암조직 깊이 위치한 암세포에 치료약물이 전달되는 효율을 좌우하는 암조직에서의 확산을 측정하고자 새로운 광학측정 기법인 Micro-fiberoptic Epifluorescence Photobleaching 기법을 개발하였다. 수 um 지름을 갖는 광섬유를 암조직에 삽입하여 기존 방법으로는 그동안 측정이 불가능했던 암조직 깊은 지역(표면에서 200 um 이상 떨어진 지점)에서 확산율이 10배 이상 감소한다는 의미있는 실험결과를 얻을 수 있었다.

3.4 세포막에서 확산 측정

Haggie 등⁸⁾은 양자점이라고 불리는 형광 나노입자를 세포막에 존재하는 염소이온 통로인 CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator)

Table 2. Therapeutic agents delivered to tumor cells⁶⁾

Cancer Treatment	Therapeutic agents
chemotherapy	cytotoxic agent
radiation therapy	oxygen
photodynamic therapy	photosensitizer
antiangiogenesis therapy	antiangiogenic agents
immunotherapy	antibodies conjugated with toxins or radioisotopes
gene therapy	vectors(macromolecules or nanoparticles)

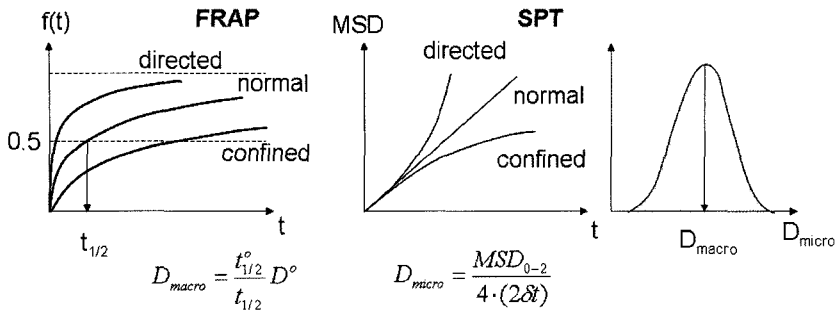


Fig. 3. Diffusion coefficients determined by FRAP and SPT techniques.

에 생화학적으로 결합시킨 후, 배양된 세포 표면에서 나노입자의 분포와 거동을 형광이미징 기법으로 관찰하여 CFTR의 확산을 정량적으로 분석하는 단일입자 추적기법(SPT)을 개발하였다. 나노입자 움직임을 시뮬레이션하는 컴퓨터 프로그램과 통계분석 기법을 개발하여, 획득한 나노입자 이미지로부터 정량적인 다양한 확산모드를 얻어내었다. Fig. 3에 FRAP과 SPT 측정법을 통해 얻어지는 확산계수를 비교하였다.

4. 결 론

살아있는 세포 및 조직에서 생체분자의 확산을 정량적으로 측정하고 이론적으로 해석할 수 있는 컴퓨터 시뮬레이션 기법이 확립된다면, 생체조직 내에 존재하는 영양분, 대사산물, 성장인자, 억제제, 신호전달물질 등의 다양한 생체분자의 이동현상과 분포를 정량적으로 평가함으로써, 생체조직을 이루는 세포의 성장, 분화, 이동 메커니즘을 파악하고 이러한 기초자료를 조직공학에 활용할 수 있게 될 것이다. 또한, 뇌 세포외공간에서 각종 신호전달을 담당하는 신호전달물질의 거동을 파악하고 이를 중추신경계의 기능과 연관시켜 설명할 수 있게 될 것이며, 암조직 내에서 약물이동에 영향을 미치는 다양한 인자를 정량적으로 파악함으로써, 약물전달효율 증진방안을 도출하여 암치료 시 약효를 향상시킬 수 있게 될 것이다.

후 기

본 연구는 2007년도 국민대학 교내연구비와 산업자원부 21세기 프론티어 기술개발사업인 지능형마이크로시스템개발사업 (<http://www.microsystem.re.kr>)의 연구비지원을 받아 수행되었음.

참고문헌

- 1) Verkhovsky, A. B., Svitkina, T. M. and Borisy, G. G., 1999, "Self-polarization and Directional Motility of Cytoplasm," *Curr. Biol.*, Vol.9(1), pp.11~20.
- 2) Jiang, X., Bruzewicz, D. A., Wong, A. P., Piel, M. and Whitesides, G. M., 2005, "Directing Cell Migration with Asymmetric Micropatterns," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.102(4), pp.975~978.
- 3) Nelson, C. M., Vanduijn, M. M., Inman, J. L., Fletcher, D. A. and Bissell, M. J., 2006, "Tissue Geometry Determines Sites of Mammary Branching Morphogenesis in Organotypic Cultures," *Science*, Vol.314(5797), pp.298~300.
- 4) Meyers, J., Craig, J. and Odde, D. J., 2006, "Potential for Control of Signaling Pathways via Cell Size and Shape," *Curr. Biol.*, Vol.6(17), pp.1685~1693.
- 5) Papadopoulos, M. C.*, Kim, J. K.* and Verkman, A. S., 2005, "Extracellular Space Diffusion in the CNS: Anisotropic Diffusion Measured by Elliptical Surface Photobleaching," *Biophys. J.*, Vol.89(5), pp.3660~3668. (*Authors contributed equally)
- 6) Truskey, G. A., Yuan F. and Katz, D. F., 2004, *Transport Phenomena in Biological Systems*, Pearson Prentice Hall, New Jersey, pp.690.
- 7) Thiagarajah, J. R.*, Kim, J. K.*, Magzoub, M. and Verkman, A. S., 2006, "Slowed Diffusion in Tumors Revealed by Microfiberoptic Epifluorescence Photobleaching," *Nat. Methods*, Vol.3(4), pp.275~280. (*Authors contributed equally)
- 8) Haggie, P. M., Kim, J. K., Lukacs, G. L. and Verkman, A. S., 2006, "Tracking of Quantum Dot-Labeled CFTR Shows Near Immobilization by C-terminal PDZ Interactions," *Mol. Biol. Cell*, Vol. 17(12), pp.4937~ 4945.