

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0099767 (43) 공개일자 2014년08월13일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>G01Q 60/24</i> (2010.01) <i>G01N 33/483</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2013-0012579 (22) 출원일자 2013년02월04일 심사청구일자 2013년02월04일	(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교) (72) 발명자 박현국 서울 동대문구 무학로34길 8, (용두동) 이기자 서울 노원구 마들로 31, 104동 1504호 (월계동, 그랑빌아파트) 이영주 서울 동대문구 회기로12길 42, 201호 (회기동) (74) 대리인 손민

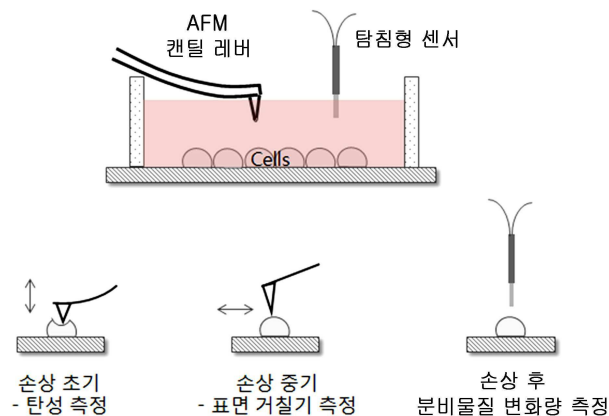
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **AFM과 탐침형 센서를 이용한 세포독성의 정량적 평가시스템 및 방법**

(57) 요약

본 발명은 원자력 현미경(atomic force microscopy; AFM); 및 탐침형 센서를 포함하는 세포독성의 정량적 평가 시스템 및 (a) 원자력 현미경을 이용하여 세포의 탄성(elasticity) 또는 세포표면의 거칠기(roughness)를 측정하는 단계; 및 (b) 탐침형 센서를 이용하여 세포분비물질 또는 세포소모물질의 농도 변화의 농도를 시간에 따라 모니터링하는 단계를 포함하는 것인 세포독성의 정량적 평가 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A110216

부처명 보건복지부

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 손상조직 치료용 천연물 기반 고기능성 생체접착제의 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2011.05.01 ~ 2014.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

원자력 현미경(atomic force microscopy; AFM); 및 탐침형 센서를 포함하는 세포독성의 정량적 평가 시스템.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 원자력 현미경 및 탐침형 센서는 평가하고자 하는 세포에 대해 동일한 방향으로 구비된 것인 시스템.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 원자력 현미경은 평가하고자 하는 세포의 손상 초기단계에서 세포의 탄성(elasticity)을 측정하고, 세포의 손상 중기단계로부터 세포표면의 거칠기(roughness)를 측정하는 것인 시스템.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 탐침형 센서는 세포 손상 시 세포에 의해 분비 또는 소비되는 물질의 농도 변화를 검출하는 것이 특징인 시스템.

청구항 5

제1항에 있어서,

세포의 탄성(elasticity), 세포표면의 거칠기(roughness) 및 세포분비물질 또는 세포소모물질을 동시에 측정하는 것이 특징인 시스템.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 세포에 의해 분비되는 물질은 글루코스, 글루타메이트 및 일산화질소로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 시스템.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 탐침형 센서는 글루코스 또는 글루타메이트의 검출을 위한 효소가 고정된 것인 시스템.

청구항 8

제4항에 있어서,

상기 탐침형 센서는 일산화질소 또는 산소 특이적 가스투과막을 포함하는 것인 시스템.

청구항 9

(a) 원자력 현미경을 이용하여 세포의 탄성(elasticity) 또는 세포표면의 거칠기(roughness)를 측정하는 단계; 및 (b) 탐침형 센서를 이용하여 세포분비물질 또는 세포소모물질의 농도 변화를 시간에 따라 모니터링하는 단계를 포함하는 것인 세포독성의 정량적 평가 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 (a) 단계 및 (b) 단계는 동시에 수행되는 것인 평가방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 탐침형 센서는 글루코스 또는 글루타메이트의 검출을 위한 효소가 고정된 것인 평가방법.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 탐침형 센서는 일산화질소 또는 산소를 선택적으로 투과시키는 가스투과막을 구비하여 손상 후 세포에 의해 변화되는 일산화질소 또는 산소의 양을 측정하는 것인 평가 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 원자력 현미경(atomic force microscopy; AFM); 및 탐침형 센서를 포함하는 세포독성의 정량적 평가 시스템 및 (a) 원자력 현미경을 이용하여 세포의 탄성(elasticity) 또는 세포표면의 거칠기(roughness)를 측정하는 단계; 및 (b) 탐침형 센서를 이용하여 세포분비물질 또는 세포소모물질의 농도 변화의 농도를 시간에 따라 모니터링하는 단계를 포함하는 것인 세포독성의 정량적 평가 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 독성이란 "화학적, 물리적 또는 생물학적 작용물이 생명체와 생태계에 끼치는 악영향"을 의미한다. 따라서, 충분한 수량이 소비되는 물질은 무엇이던 간에 독성 여부를 검증하는 것을 원칙으로 한다. 우리가 먹는 식품, 식품 첨가물, 의약품, 신약, 산업용 화학물질, 연구용 화학물질 등의 모든 물질은 시판되기 전에 독성 검사를 받는다. 예컨대, 물질 투여량에 따른 생체반응정도를 확인하는 실험을 수행하는데, 이것이 '독성평가실험'이다.

[0003] 한편, 이러한 독성평가실험에 있어서 쥐나 토끼와 같은 동물모델을 이용하여 실험을 수행하면서 많은 동물이 희생된다는 점에서 윤리적 문제가 제기되었다. 이에 세포를 이용하여 간단히 독성 여부를 확인하는 시험법들을 개발하였다. 그러나 이러한 세포독성 시험법들은 대부분이 노동집약적이며 복잡한 실험과정을 요구하여 실험적인 오차 발생율이 높고, 염료 등을 이용하는 비색법 또는 형광분광법을 이용한 검출에 의한 간접적인 시험법은 별도의 염료를 표지하는 과정을 필요로 하는 정성적 시험법으로 신뢰성과 편의성이 떨어지는 단점이 있다. 따라서, 정확한 세포독성의 평가를 위해서는 자극물질에 반응하여 세포에서 발생하는 변화들을 직접적이고 정량

적으로 측정할 수 있는 방법이 요구된다.

[0004] AFM(atomic force microscope)은 나노수준의 고분해능으로 세포형태 및 특성을 파악할 수 있는 장치로서, 세포 표면의 형성뿐만 아니라, 세포 내 기관, 세포 골격 등의 분자적 정보를 제공할 수 있고, 힘-거리간 곡성을 통한 탄성 등의 물성측정이 가능하다. 무엇보다도 특별한 전처리나 표지물질 없이도 대기 중에서 뿐만 아니라 액체 내의 시료에 대해서도 측정이 가능하여 배양 중인 세포에 적용가능하므로 생물학적, 의학적인 연구에 활용되고 있다. 그러나, 높낮이의 변화를 통해 이미지화 하므로 세포 표면에 발현된 단백질이나 유전자의 식별은 가능하나 동정은 불가능하여 세포로부터 분비되는 대사물질이나 신호전달물질과 같은 생화학적 변화는 분석하기 어렵다.

[0005] 이에 본 발명자들은 세포에 대한 자극물질의 독성을 정량적으로 분석함에 있어서, 배양세포를 전처리하거나 표지물질로 처리하는 과정 없이 직접 분석하여 형태 및 특성에 대한 정보를 얻는 동시에 자극에 대하여 세포로부터 분비되는 물질을 동정하고 정량할 수 있는 시스템 및/또는 방법을 발굴하고자 예의 연구 노력한 결과, 세포의 형태 및 특성을 고해상도로 분석할 수 있는 AFM에, 자극에 대해서 세포가 분비하는 물질을 실시간으로 모니터링할 수 있는 탐침형 센서를 추가로 구비한 장치를 제작하였으며, 이를 이용하여 세포 자극물질 처리시 세포 손상정도 측정함으로써 세포독성을 정량적으로 분석할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 하나의 목적은 원자력 현미경(atomic force microscopy; AFM); 및 탐침형 센서를 포함하는 세포독성의 정량적 평가 시스템을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 (a) 원자력 현미경을 이용하여 세포의 탄성(elasticity) 또는 세포표면의 거칠기(roughness)를 측정하는 단계; 및 (b) 탐침형 센서를 이용하여 세포분비물질 또는 세포소모물질의 농도 변화의 농도를 시간에 따라 모니터링하는 단계를 포함하는 것인 세포독성의 정량적 평가 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 원자력 현미경(atomic force microscopy; AFM); 및 탐침형 센서를 포함하는 세포독성의 정량적 평가 시스템을 제공한다.

[0009] 본 발명의 용어 "원자력 현미경(atomic force microscopy; AFM)"은 일반적인 광학적 회절한계 보다 1000배 높은 나노미터 수준의 해상도를 갖는 고해상도의 주사탐침현미경(scanning probe microscopy)이다. AFM은 주사터널링현미경(scanning tunneling microscopy)의 단점을 극복하기 위해 제작된 것으로, STM은 양자터널링(quantum tunneling) 개념에 기초하므로 전도성 탐침을 필요로 하며, 전도성 또는 반도체성 시료에 적용할 수 있는 반면, AFM은 원자간력을 이용하므로 어떤 형태의 표면 예컨대, 고분자, 세라믹, 복합물, 유리 및 생물학적 시료에 널리 사용할 수 있다. 일반적으로 AFM은 캔틸레버 말단에 위치한 탐침을 포함하며, 상기 탐침의 말단과 시료표면 간에 작용하는 힘을 측정한다. 구체적으로, 이는 탐침이 위치한 캔틸레버의 용수철 상수에 의존한다. 예를 들어, 캔틸레버의 용수철 상수(약 0.1 내지 1 N/m)가 시료표면과의 상호작용보다 작으면 캔틸레버는 휘어져서 굴절(deflection)이 관찰된다.

[0010] AFM은 시료와 AFM 탐침 간의 접촉 여부에 따라 1) 접촉모드(contact mode), 2) 간헐모드(또는 두드림 모드, intermittent mode or tapping mode) 및 3) 비접촉모드(non-contact mode)의 세 가지 다른 모드로 작동가능하다. 먼저 접촉모드에서 탐침과 시료표면은 0.5 nm 미만의 거리를 가지며, 이들 간에는 반데르발스 척력(repulsive van der Waals force)이 작용한다. 빠른 측정이 가능하며 거친 시료에 적합하여 마찰력(friction) 분석에 이용되는 장점이 있으나, 부드러운 시료는 손상되거나 변형될 수 있는 단점이 있다. 다음으로 간헐모드에서는 캔틸레버가 일정한 공명주기로 진동하여 탐침이 시료표면과 0.5 내지 2 nm의 거리에서 움직인다. 손상되기 쉬운 시료나 표면에 약하게 결합된 시료를 고해상도로 분석할 수 있으며, 생물학적 시료분석에 적합한 장점이 있다. 반면, 액체상에서 이미징이 어렵고 스캔속도가 느린 단점이 있다. 마지막으로 비접촉모드에서 탐침은 시료표면과 0.1 내지 10 nm의 거리를 유지하며 직접 접촉하지 않으며, 탐침과 시료표면 간에는 반데르발스

인력(attractive van der Waals force)이 작용한다. 시료 상에 피코 뉴턴(10^{-12} N) 수준의 매우 적은 힘이 가해 지므로 탐침수명이 길다. 다만, 다른 모드와 비교하여 해상도가 낮으며 시료표면 상의 오염층에 의해 분석능이 저해될 수 있어 최상의 이미지를 얻기 위해서는 초고도의 진공상태를 요구한다는 단점이 있다.

- [0011] 본 발명에서는 AFM을 이용하여 자극에 의한 세포의 손상여부 및/또는 손상정도를 측정하고 이를 정량적으로 분석함으로써 자극의 세포독성을 정량적으로 평가할 수 있다. 상기 자극은 식품 첨가물, 의약품, 신약, 산업용 화학물질, 연구용 화학물질 등에 의한 것일 수 있다. 바람직하게는 의약품, 신약 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0012] 상기 본 발명의 용어 "세포독성(cytotoxicity)"은 화학적, 물리적 또는 생화학적 작용물이 세포에 끼치는 악영향을 의미하는 것으로 예컨대, 평가대상물질을 처리한 세포에서 절반의 생존율을 나타내는 농도인 IC_{50} 값 등으로 표기할 수 있다. 원칙적으로 신체에 적용되는 물질 예컨대 우리가 섭취하는 식품, 이에 포함되는 식품첨가물, 의약품, 신약 및 취급하는 산업용 또는 연구용 화학물질 등 모든 물질은 시판되기 전에 독성검사가 수행되어야 한다. 그러나 인체에 직접 적용하여 검사하는 것이 불가능하므로, 쥐나 토끼 등의 동물모델을 이용하였으나 많은 동물이 희생된다는 윤리적 문제가 제기되어 세포 수준에서 독성 여부를 판단하는 방법을 개발하고 있다. 그러나 현재 수행되고 있는 세포독성 시험법들은 대부분이 노동집약적이며 복잡한 실험과정을 요구하고 형광물질 등의 염료분자를 표지하는 과정을 필요로 하며 실험적인 오차 발생율이 높다는 단점이 있다. 이에 반해 본 발명에 따른 원자력 현미경을 포함하는 세포독성 평가 시스템은 배양세포의 형태 및/또는 특성을 직접적으로 측정하므로 검출을 위한 염료 표지 등의 과정을 필요로 하지 않으며 별도의 전처리를 필요로 하지 않는 간편한 방법이다. 또한 독성물질에 의한 세포 손상의 정량적 측정이 가능하다. 구체적으로, AFM을 사용하여 세포의 탄성 및/또는 세포표면의 거칠기를 측정함으로써 자극물질에 의한 세포독성을 정량적으로 평가할 수 있다.
- [0013] 바람직하게 본 발명에 따른 세포 손상의 정량적 평가 시스템은 상기 원자력 현미경을 이용하여 평가하고자 하는 세포의 손상 초기단계에서 세포의 탄성(elasticity)을 측정하고, 세포의 손상 중기단계로부터 세포표면의 거칠기(roughness)를 측정할 수 있다. 한편 상기 탐침형 센서는 세포 손상 시 세포에 의해 분비 또는 소모되는 물질의 농도 변화를 검출할 수 있다.
- [0014] 상기 본 발명에서 세포의 손상 초기단계는 상대적으로 적은 양의 자극에 노출된 경우를 의미하는 것으로, 예컨대 낮은 농도의 독성물질에 노출되었거나 독성물질에 짧은 시간 노출된 경우일 수 있다. 유사하게 세포의 손상 중기단계는 보통의 양의 자극에 노출된 경우를 의미하는 것으로, 예컨대 높은 농도의 독성물질에 노출되었거나 긴 시간 노출된 경우일 수 있으며, 세포 사멸 전까지를 포함한다.
- [0015] 예를 들어, 자극물질이 본 발명의 구체적인 실시예에 사용된 라우릴황산나트륨(SLS)인 경우, 0.05 mg/ml 이하의 농도로 처리한 경우를 세포 손상 초기단계로, 0.05 내지 1 mg/ml의 농도로 처리한 경우를 세포 손상 중기 단계로 구분할 수 있다. 그러나, 상기 농도 범위에 따른 손상단계 구분은 해당 자극물질에 관한 것이며, 이는 가해지는 자극물질의 종류 및 독성 정도에 따라 달라질 수 있을 것이다.
- [0016] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 접촉모드를 이용하여 세포탄성 변화를, 비접촉모드를 이용하여 세포표면의 거칠기 변화를 측정하였다.
- [0017] AFM을 이용하여 세포손상 초기단계에서 세포의 탄성을 측정하는 방법은 접촉모드를 이용하여 탄성계수를 측정함으로써 수행될 수 있다. 한편, AFM을 이용하여 세포손상 중기단계 이후에서 세포표면 거칠기를 측정하는 방법은 비접촉모드를 이용하여 나노미터 수준의 세포표면 거칠기 평균값을 측정함으로써 수행될 수 있다. 바람직하게는 도 1에 개시된 방법으로 측정하는 것이다.
- [0018] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 독성물질에 의한 세포손상 정도를 정량적으로 판단하기 위하여 세포독성시험을 위한 추천 세포주인 마우스 섬유아세포(mouse fibroblast) L929 세포와 독성물질로서 라우릴황산나트륨(sodium lauryl sulfate, SLS)을 이용하였다. 상기 SLS는 농도를 달리하여 세포의 손상정도를 다르게 하였고 이에 따른 세포 탄성 및 표면의 거칠기 변화를 측정하고 이로부터 IC_{50} 값을 측정하였다. 상기 계산된 IC_{50} 값은 기존의 세포독성 분석방법에 의한 결과와 유사한 값을 나타냄을 확인하였고(표 3), 따라서 본 발명의 평가 시스템을 이용하여 별도의 처리과정없이 간편하게 세포독성을 측정할 수 있음을 확인하였다.
- [0019] 본 발명에서는 자극물질을 처리한 세포에서 AFM을 사용하여 탄성 및 세포표면 거칠기를 측정한 결과를 상기 자극물질의 세포독성 평가에 이용할 수 있음을 처음으로 밝힌 것에 특징이 있다.
- [0020] 본 발명의 용어 "센서"는 물리적 양을 측정하는 변환기로서 검출기라고도 하며, 상기 물리적 양을 관찰자 또는

측정기기에 의해 읽힐 수 있는 신호로 변환한다. 예컨대 물리적 에너지를 전기신호로 변환하여 전극으로부터 읽어들이 수 있게 한다. 예컨대 "탐침형 센서"는 센서의 말단에 검출부를 포함하는 센서를 의미한다. 상기 검출부는 전기신호로 변환된 시료로부터의 물리적 에너지를 읽어들이 수 있도록 전극을 포함할 수 있다.

- [0021] 본 발명에 따른 세포독성 평가 시스템은 탐침형 센서를 포함함으로써 자극물질에 의한 형태 및/또는 특성에 있어서 세포손상을 정량적으로 평가함과 동시에 손상에 의해 세포로부터 분비 또는 소모되는 물질의 양적인 변화를 실시간으로 모니터링할 수 있다.
- [0022] 바람직하게 본 발명에 따른 세포 손상의 정량적 평가 시스템은 상기 원자력 현미경 및 탐침형 센서를 평가하고자 하는 세포에 대해 동일한 방향으로 구비할 수 있다.
- [0023] 바람직하게, 상기 원자력 현미경을 이용한 세포의 탄성(elasticity) 및 세포표면의 거칠기(roughness) 변화 측정, 및 탐침형 센서를 이용한 세포분비물질 또는 세포소모물질 농도 측정은 동시에 수행될 수 있다. 자극물질 처리 후 시간의 경과에 따른 세포손상 정도를 원자력 현미경을 이용한 실시간 이미징과 세포탄성 측정을 수행하는 동시에, 자극에 의해 배양액으로 방출되는 세포분비물질 또는 세포소모물질의 양을 측정함으로써, 자극으로 인한 세포 자체의 변화 즉, 형태적 및/또는 물성 변화를 직접적으로 관찰할 수 있을 뿐만 아니라, 이를 신호물질분비량 변화와 연관시켜 상관관계를 확인함으로써 자극에 의한 손상 및 신호전달 기전을 규명할 수 있다.
- [0024] 바람직하게 본 발명에 따른 세포 손상의 정량적 평가 시스템에서 탐침형 센서로 분석할 수 있는 자극에 의해 세포로부터 분비되는 물질은 글루코스, 글루타메이트 또는 일산화질소일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0025] 상기 글루코스는 세포의 주요 에너지원으로, 건강한 세포의 성장을 위해서는 최적의 글루코스 농도를 필요로 한다(Biotechnol., Prog., 2008, 24: 691-697). 따라서, 비정상적인 글루코스의 증가나 감소는 세포손상의 징후 또는 세포손상의 유발인자로 작용할 수 있다. 상기 글루타메이트는 주로 신경손상과 관련하여 분비되는 물질로써, 뇌허혈시 흥분독성을 가지는 대표적인 물질이며, 글루타메이트 양이 많을수록 뇌손상이 큰 것으로 알려져 있다(Korean J. Physiol. Pharmacol., 2009, 13: 23-26; Physiol. Meas., 2010, 31: 439-450; Brain Res., 2010, 1342: 160-166; PLoS One, 2010, 5(12): e15192). 상기 산화질소는 이의 세포 내 분비에 관여하는 합성 효소의 종류에 따라 손상 또는 보호기전으로 작용할 수 있다. 예컨대, 허혈-재관류 손상시 내인성으로 방출되는 양이 다르며, 허혈자극시 분비되는 양(약 수백 nM)이 증가할수록 재관류 후 손상이 감소하는 것으로 알려져 있다(Sensors and Actuators B: Chemical, 2012, 161: 480-485). 또한 염증반응에 관여하는 경우 대식세포는 μM 이상의 수준으로 일산화질소를 분비하며, 염증반응이 심할수록 상기 일산화질소의 분비량이 증가하는 것으로 알려져 있다(Interdisc Toxicol., 2008, 1(3-4): 214-217).
- [0026] 이에 따라, 상기 탐침형 센서는 글루코스 또는 글루타메이트의 검출을 위한 효소가 고정된 것을 사용하는 것이 바람직하다. 또는, 상기 탐침형 센서는 용액 중의 일산화질소 또는 산소만이 가스투과막을 통과하여 전극에 전달될 수 있도록 일산화질소 또는 산소 특이적 가스투과막을 포함하는 것을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0027] 상기 글루코스 또는 글루타메이트의 검출을 위한 효소의 비제한적인 예는 글루코스 산화효소(glucose oxidase), 글루타메이트 산화효소(glutamate oxidase), 과산화효소(horseradish peroxidase) 또는 글루타메이트 탈수소효소(glutamate dehydrogenase)일 수 있다.
- [0028] 한편, 일산화질소 특이적 가스투과막은 소수성을 가짐으로써 친수성 간섭물질의 효과를 배제하고 소수성 일산화질소 분자만을 투과시킬 수 있는 물질로 제조된 막을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 일산화질소 특이적 가스투과막을 제조하기 위한 소재의 비제한적인 예는 폴리카바졸(polycarbazole), 콜로디온(collodion), 나피온(Nafion), 셀룰로스 아세테이트(cellulose acetate), 폴리테트라플루오로에틸렌(poly(tetrafluoroethylene)), 폴리디메틸실록산(polydimethylsiloxane a.k.a. silicone rubber) 등이다. 바람직하게는 플루오르화된 작용기가 치환된 졸-겔 유도 NO 투과막(sol-gel derived NO permeable membranes with fluorinated functional groups)을 사용할 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 측정에 사용할 수 있는 세포의 종류는 제한되지 않으며, 독성을 평가하고자 하는 자극물질에 의해 형태 또는 특성변화가 나타날 수 있는 세포를 제한없이 사용할 수 있다. 본 발명의 세포독성 평가 시스템은 대기 중 또는 액체 중에서도 측정가능하므로 고체 배지 또는 액체 배지를 사용하는 세포 배양 시스템에 모두 직접 적용가능하다. 또한 본 발명의 세포독성 평가 시스템에는 세포손상 측정에 필요한 다른 장치를 추가로 포함할 수 있다.

- [0030] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 원자력 현미경을 이용하여 세포의 탄성(elasticity) 또는 세포표면의 거칠기(roughness)를 측정하는 단계; 및 (b) 탐침형 센서를 이용하여 세포분비물질 또는 세포소모물질의 농도 변화의 농도를 시간에 따라 모니터링하는 단계를 포함하는 것인 세포독성의 정량적 평가 방법을 제공한다.
- [0031] 상기한 바와 같이 원자력 현미경을 이용하여 세포의 탄성 또는 세포표면의 거칠기를 측정하는 (a) 단계 및 탐침형 센서를 이용하여 세포분비물질의 농도를 모니터링하는 (b) 단계는 각각 독립적으로 동시에 수행할 수 있다.
- [0032] 진술한 바와 같이 바람직하게 상기 탐침형 센서는 글루코스 또는 글루타메이트의 검출을 위한 효소가 고정되어 자극에 의해 세포로부터 분비되는 글루코스 또는 글루타메이트를 검출할 수 있는 것이거나, 일산화질소 또는 산소를 선택적으로 투과시키는 가스투과막을 구비하여 손상 후 세포에 의해 변화되는 일산화질소 또는 산소의 양을 측정할 수 있는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0033] 본 발명에 따른 AFM 및 탐침형 센서를 포함하는 세포독성 평가 시스템을 이용하여 기존의 노동력과 시간을 요구하는 세포독성 평가방법과 비교하여 빠르고 간편하게 수행될 수 있으면서, 유사한 결과를 얻을 수 있음을 확인하였다. 따라서 상기 세포독성 평가 시스템은 신약 개발 등에 있어서 필수적인 독성평가에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0034] 도 1은 본 발명에 따른 세포 손상의 정량적 평가 시스템에 이용되는 장치 및 이를 이용한 다중 동시측정법을 개략적으로 나타낸 도이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 세포 손상의 정량적 평가 시스템으로 측정한 독성물질 처리에 따른 세포의 형태 및 나노구조 변화를 나타낸 도이다.
- 도 3은 본 발명에 따른 세포 손상의 정량적 평가 시스템으로 측정한 독성물질 처리 농도에 따른 세포 표면 거칠기 변화를 나타낸 도이다.
- 도 4는 본 발명에 따른 세포 손상의 정량적 평가 시스템으로 측정한 독성물질 처리 농도에 따른 세포 탄성 변화를 나타낸 도이다.
- 도 5는 종래 세포독성 평가 시스템에 의한 세포독성 분석 결과를 나타낸 도이다.
- 도 6은 본 발명에 따른 세포 손상의 정량적 평가 시스템으로 측정한 독성물질 처리에 따른 일산화질소 분비량의 변화를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0035] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0036] 실시예 1: 독성물질 처리에 따른 세포 형태 및 세포표면 거칠기의 변화

- [0037] AFM을 이용하여 독성물질 처리에 따른 세포의 형태변화 및 세포표면 거칠기의 변화를 정량적으로 측정하였다.
- [0038] 독성을 테스트할 세포 및 세포를 자극시킬 독성물질로는 한국식품의약품안전청(KFDA)에서 제시한 국제공통기준 규격 ISO 10993 가이드라인에 명기된 추천 세포주인 마우스 섬유아세포(mouse fibroblast) L929 세포 및 라우릴 황산나트륨(sodium lauryl sulfate, SLS, CAS # 151-21-3)을 이용하였다.
- [0039] 구체적으로, L929 세포 1×10^4 세포에 라우릴황산나트륨(SLS)을 4가지 다른 농도 즉, 0.025 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.075 mg/ml 및 0.1 mg/ml로 처리하고 24시간 후에 2.5% 글루타르알데하이드(glutaraldehyde)로 고정하여 세포

의 국소적 이미지(topographic image)를 AFM Nanostation II(Surface Imaging Systems, Herzogenrath, Germany)으로 기록하였다.

[0040] 기록된 이미지를 도 2에 나타내었다. SLS 농도가 증가함에 따라, 섬유아세포의 뾰족한 말단을 갖는 경계부분이 모호해지면서 둥그스름한 형태로 변화하는 것을 확인하였다. 즉, 세포손상이 심할수록 섬유아세포 특유의 세포 형태를 유지하지 못하고 변형되는 것을 확인하였다.

[0041] 또한 주사 탐침 이미지 처리기(Scanning Probe Imaging Process; SPIP™, ImageMetrology, Horsholm, Denmark)를 이용하여 상기 획득한 이미지로부터 거칠기 매개변수 즉, 거칠기 평균(roughness average; S_a) 및 제곱근 평균제곱(root mean square; S_q)을 도출하였다. 이들을 하기 표 1에 요약하고 도 3에 나타내었다.

표 1

SLS 처리 농도 (mg/ml)	거칠기 (Roughness)	
	S_a (nm)	S_q (nm)
0	54.12 ± 12.59	68.34 ± 15.20
0.05	63.41 ± 20.42	80.20 ± 25.09
0.075	84.43 ± 26.67 ^{**,\$}	106.72 ± 32.78 ^{**,\$}
0.1	93.06 ± 26.29 ^{**,\$§}	118.60 ± 32.59 ^{**,\$}

^{**}p<0.001 대 0 mg/ml SLS 군
[§]p<0.005, ^{§§}p<0.001 대 0.05 mg/ml SLS 군

[0042]

[0043] 세포표면의 거칠기는 신호분자에 대한 세포의 반응을 모니터링하고, 표면의 조성변화를 평가하는데 사용될 수 있다. 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 손상이 심화될수록 즉, 높은 농도의 독성물질에 노출될수록 세포표면의 거칠기는 증가하였다. 이로부터 농도 구간별 증가경향을 분석해보면, 0.05 mg/ml 이하의 농도에서의 농도변화에 대한 표면 거칠기 변화에 비해, 0.05 내지 0.075 mg/ml 농도범위에서의 거칠기 변화폭이 현저히 크다. 이로부터 손상 초기 또는 손상이 미미한 경우보다 손상 중기 이후 또는 중간 정도의 손상을 평가하는데 표면 거칠기 인자가 효율적인 것으로 확인되었다.

[0044] 실시예 2: 독성물질 처리에 따른 세포의 물리적 특성변화 측정

[0045] 상기 실시예 1과 동일한 조건으로 독성물질을 처리한 세포의 탄성변화를 정량적으로 측정하기 위하여, AFM을 이용하여 힘-거리 곡선(force-distance curve; FD curve)를 측정하고, 세포탄성계수(cellular spring constant; K_{cell})를 계산하여 그 결과를 하기 표 2와 도 4에 나타내었다.

표 2

SLS 처리 농도 (mg/ml)	계산된 탄성계수 (calculated spring constant)
	K_{cell} (N/m)
0	0.027 ± 0.002
0.05	0.021 ± 0.003
0.075	$0.015 \pm 0.001^{**,\$}$
0.1	$0.012 \pm 0.003^{**,\$,\text{†}}$

^{**}p<0.001 대 0 mg/ml SLS 군
^{\$}p<0.005, ^{\$§}p<0.001 대 0.05 mg/ml SLS 군
[†]p=0.001 대 0.075 mg/ml SLS 군

[0046]

[0047]

세포의 탄성은 주로 세포막, 미세관(microtubule) 및 액틴섬유소(actin fiber) 등의 세포골격성분(cytoskeletal components)의 고유성질에 의존한다. 상기 자극물질로 사용된 SLS는 단백질을 변성시키는 음이온성 계면활성제로서 세포막을 녹여 빠른 세포사를 유발하는 것으로 알려져 있다. 상기 표 2에 나타난 바, 세포독성물질 즉, SLS의 농도가 높을수록 손상정도가 심해지고 그 결과 세포탄성계수가 감소하는 것을 확인하였다. 다시 말해, SLS 처리농도가 증가함에 따라, 세포막 손상정도가 증가하였다. 농도 구간별 증가경향을 분석해보면, 0.05 mg/ml 이하에서 탄성변화가 가장 크고, 0.075 mg/ml 이상에서는 변화도가 감소하였다. 따라서, 상기 세포탄성변화는 손상초기 또는 손상이 미미한 경우 효과적인 세포손상 평가가 가능함을 확인하였다.

[0048]

비교예 1: 기존의 세포독성 시험법에 의한 독성평가

[0049]

세포독성을 평가하기 위한 방법으로 일반적으로 수행되고 있는 하기의 4가지 세포독성 시험법을 이용하여 SLS의 독성을 측정하여 본 발명에 따른 세포독성 평가방법에 의한 결과와 비교하였다: MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 에세이, WST(2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium) 에세이, 뉴트럴 레드 흡수 에세이(neutral red uptake assay) 및 LIVE/DEAD 생존율/세포독성 에세이(LIVE/DEAD viability/cytotoxicity assay).

[0050]

독성을 테스트할 세포 및 세포를 자극시킬 독성물질로는 상기 실시예에서와 동일하게 마우스 섬유아세포(mouse fibroblast) L929 세포 및 라우릴황산나트륨(sodium lauryl sulfate, SLS, CAS # 151-21-3)을 이용하였다.

[0051]

구체적으로, L929 세포 1×10^4 세포에 라우릴황산나트륨(SLS)을 4가지 다른 농도 즉, 0.025 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.075 mg/ml 및 0.1 mg/ml로 처리하고 24시간 후에 회수하여 각각의 방법으로 세포 생존율을 측정하였다.

[0052]

세포 생존율 측정을 위한 시약으로는 MTT(Sigma), 세포 계수 키트-8(Cell counting kit-8, Sigma), 뉴트럴 레드(Neutral red, Sigma) 및 LIVE/DEAD 생존율/세포독성 키트(LIVE/DEAD viability/cytotoxicity kit, Molecular Probes, Eugene, OR)를 구입하여 이용하였다. 흡광도를 측정하여 정량하였으며, 흡광도는 멀티-마이크로플레이트 리더(Synergy HT multi-mode microplate instrument, BioTek, USA) 장비로 측정하였다. 측정과장은 MTT 에세이 및 뉴트럴 레드 흡수 에세이에 대해서는 595 nm, WST 에세이에 대해서는 450 nm로 조절하였다. LIVE/DEAD 생존율/세포독성 에세이는 생존 세포에 대해 칼신-AM(Calcein-AM)의 초록색 형광이, 사멸 세포에 대해서는 에티디움 동중이량체에 의한 빨간색 형광이 관찰되는 현상에 기초하는 것으로, 상기 형광 이미지는 Zeiss LSM-700 공초점 현미경 시스템(Jena, Germany) 형광 현미경으로 획득하였다. 상기 이미지를 이용하여 수동으로(manually) 세포를 계수하여 그래프를 작성하였다. 각각의 분석방법에 의해 측정된 결과를 도 5에 나타내었다.

[0053]

상기 4가지 기존 세포독성 분석방법으로 측정한 독성물질의 농도에 대한 세포 생존율 및 상기 실시예 1 및 2로

부터 측정된 독성물질의 농도에 대한 세포표면 거칠기 변화 및 탄성계수 변화로부터 세포에 대한 SLS의 IC₅₀ 값을 계산하여 하기 표 3에 나타내었다. 표 3에 나타난 바와 같이, 기존의 세포독성 분석방법에 의해 계산된 SLS의 IC₅₀ 값은 0.070 내지 0.080 mg/ml 였으며, 본 발명의 AFM을 이용한 표면 거칠기 및 탄성계수 변화로부터 계산한 SLS의 IC₅₀ 값은 각각 0.075 및 0.082로 기존의 방법에 의해 계산된 값과 유사한 값을 얻을 수 있었다. 따라서, 본 발명에 따른 AFM을 이용한 측정방법은 비침습적인 세포독성 측정방법으로써 활용될 수 있음을 확인하였다.

표 3

분석 방법	SLS에 대해 측정된 IC ₅₀ 값 (mg/ml)
MTT	0.071
WST	0.076
Neutral Red	0.070
Live/Dead	0.080
표면 거칠기 (Roughness)	0.075
K _{cell} (탄성 계수)	0.082

[0054]

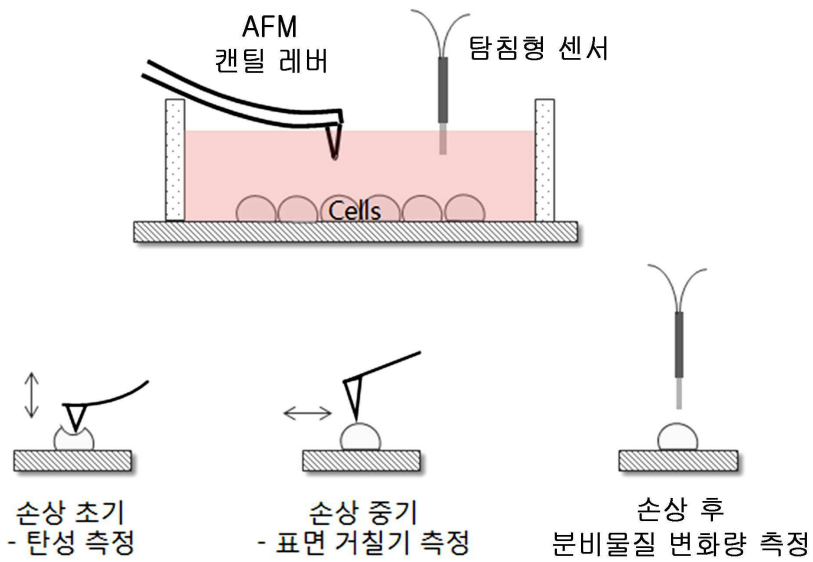
[0055] 실시예 3: 독성물질 처리에 따른 세포분비물질의 방출량 변화 측정

[0056] 상기 실시예 1 및 2에 따른 세포 표면 거칠기 및 탄성계수 측정과 더불어 본 발명에 따른 세포독성 분석장치에 구비된 일산화질소 검출용 탐침형 센서를 이용하여 배양액 중의 일산화질소를 실시간으로 모니터링하였다. 구체적으로, 세포 배양 배지에 탐침형 센서의 검출부가 잠기도록 담근 후 일정전위공급기(potentiostat)에 연결하여 0.85 V(은/염화은 기준전극 대비)를 가한 후 전류변화를 측정하였다. 측정 전 탐침형 센서는 배지 내에서 2 내지 3시간 정도 안정화시켰다. 자극물질로는 1 µg/ml 농도의 지다당류(lipopolysaccharide; LPS)를 처리하였다.

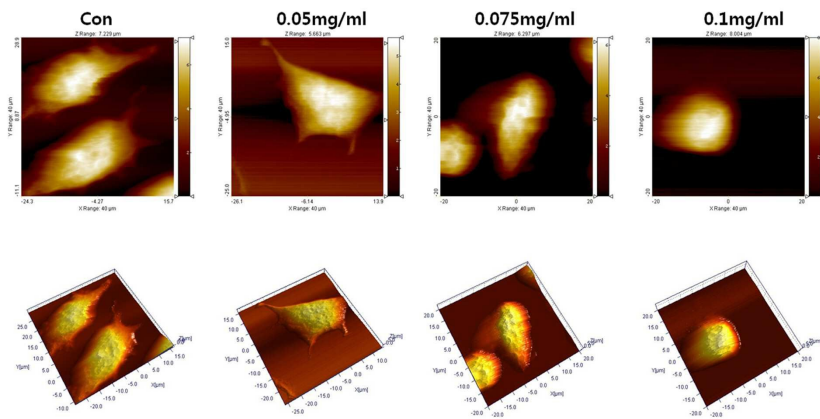
[0057] 그 결과는 도 6에 나타내었다. 도 6에 나타난 바와 같이, 세포독성물질인 LPS를 첨가한 후 일정시간이 지나고 일산화질소의 농도가 크게 증가하는 것을 확인하였다. 이는 독성물질 처리로 인해 세포가 손상되며 상기 손상 후 세포가 방출하는 일산화질소량이 증가한다는 사실과 일치하였다.

도면

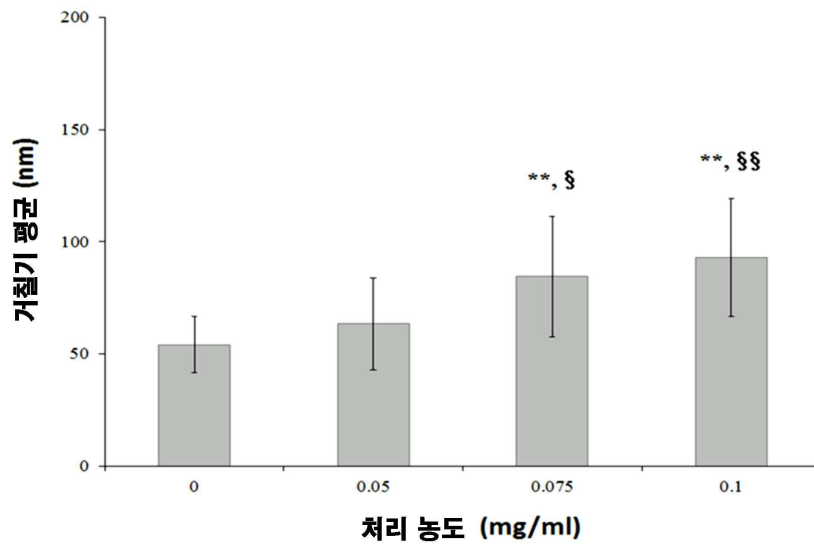
도면1



도면2

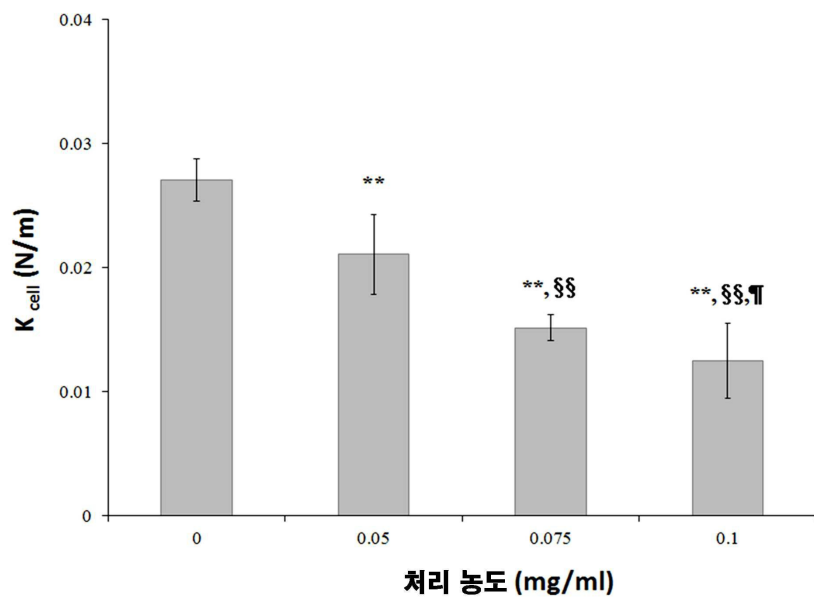


도면3



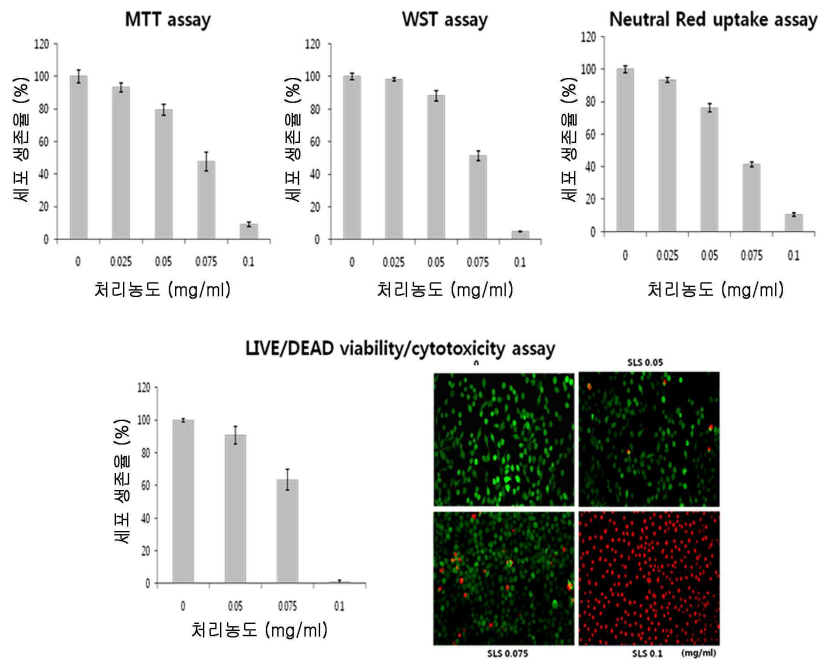
**p<0.001 대 0 mg/ml SLS 군
 §p<0.005, §§p<0.001 대 0.05 mg/ml SLS 군

도면4



**p<0.001 대 0 mg/ml SLS 군
 §p<0.005, §§p<0.001 대 0.05 mg/ml SLS 군
 ¶p=0.001 대 0.075 mg/ml SLS 군

도면5



도면6

