

Encapsulation of enzymes within polymer spheres to create optical nanosensors for oxidative stress

김범상 (홍익대학교 화학공학과)

본 내용은 Se-Hwa Kim, Bumsang Kim, Vamsi K. Yadavalli, and Michael V. Pishko, 'Encapsulation of enzymes within polymer spheres to create optical nanosensors for oxidative stress', *Analytical Chemistry*, 77(21), 6828–6833 (2005)에서 발췌한 내용입니다.

서론

최근들어 생물학적 연구에서 단일세포 수준의 미세한 크기의 살아있는 시료 내부의 화학적, 물리적 요소들을 실시간으로 측정할 수 있는 방법에 대한 관심이 높아지면서 광학적 나노입자를 센서로 사용하는 방법이 Sasaki와 그의 동료들에 의해 소개되었다. 광학적 나노입자 센서는 불활성이고 생체적합성이 우수한 매트릭스 내부에 감응물질과 광학적 신호변환기를 포함하고 있는 것으로, 주로 사용되어지는 광학적 신호변환기는 형광 표시기이다. 그 이유는 형광 표시기가 가지는 우수한 감도와 측정의 수월성 때문이다. 광학적 나노센서 입자는 기존의 형광 표시기를 사용하여 세포를 직접 레이블하는 측정 방법에 비하여 여러가지 장점을 가지고 있다. (i) 하이드로젤 매트릭스가 감응물질의 유독성으로부터 세포를 보호해주고, (ii) 매트릭스는 감응물질이 세포에 의해 받을 수 있는 잠재적인 간섭을 차단해주고, (iii) 다수의 감응물질을 하나의 매트릭스 내부에 포함시킬 경우, 동시에 여러 가지 요소를 측정할 수 있는 멀티 나노센서의 제작이 가능하다.

지금까지 보고된 대부분의 세포내 과산화물(peroxide)을 감지하는 방법은

형광염료를 사용하는 것으로 예를 들면, 살아있는 세포 내부의 H_2O_2 를 측정하기 위하여 세포를 투과하여 내부에 침투할 수 있는 광학적 탐침인 peroxyfluor-1 (PF-1)를 합성하여 10~100 μM 농도범위의 H_2O_2 를 측정한 연구결과가 보고되었다. 그러나 형광염료의 경우 세포내 산화적 손상(oxidative stress)을 정량화 하는데는 한계가 있기 때문에 감응소자로서 효소, 항체와 같은 분자인식이 가능한 생체물질을 매트릭스 내부에 캡슐화시킨 광나노입자 센서를 개발하여 세포안에 있는 산화적 손상을 감지하고자 하는 연구가 시도되고 있다.

생체내 산화적 손상은 활성산소와 같은 산화제에 의해 생체내 산화-항산화 평형이 깨지는 것으로 인체에서 발생하는 많은 질병 예를 들면, 암, 혈관 질병, 신경의 퇴행 등과 관련이 있다. 따라서 산화적 손상의 감지는 이러한 질병들을 진단하고 예방하는 데 많은 도움이 될 것이다. 그러나 생체내 산화적 손상을 감지하는 방법은 아직 확립되어 있지 않은 상태이다.

세포가 가지고 있는 phagocytosis 기능을 이용하면 나노 또는 마이크로 입자를 세포 내에 삽입할 수 있다. Phagocytosis는 dendritic cells, neutrophils, 또는 macrophage와 같은 특정한 세포에서만 가능한 기능으로 macrophage의 경우 자신보다 큰 사이즈의 입자를 actin-depedent mechanism에 의해 세포 내부로 가져올 수 있다. Phagocytosis의 수행 단계를 보면 우선 phagocytic receptor가 세포 외부의 입자를 인지하면 이것은 세포 내부에 신호를 발생시켜서 receptor로 하여금 actin의 재배열과 중합에 의해 외부의 입자를 세포 내부로 가져오게 한다. 그 후 세포 내부에서는 입자를 포함시키는 phagosome을 생성한다.

본 연구에서는 세포 내부의 여러 가지 요소를 측정하기 위한 생체물질이 포함된 광나노입자 센서를 개발하기 위한 첫 단계로서, 세포내 H_2O_2 를 감지할 수 있는 효소인 horseradish peroxidase (HRP)를 함유한 poly(ethylene glycol) (PEG) 하이드로젤 나노입자를 역상 유화광중합을 이용하여 합성하였다. PEG 하이드로젤은

친수성이고 수용액상에서 팽윤할 수 있는 고분자 네트워크로 우수한 생체적합성을 가지고 있기 때문에 바이오메디칼과 약학 분야에서 오래전부터 사용되어지고 있는 물질이다. HRP가 포함된 PEG 하이드로젤 입자의 광마이크로 또는 광나노센서로서의 잠재적인 사용을 확인하기 위하여 고분자 입자의 크기와 형태 그리고 H_2O_2 와 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (Amplex Red) 간의 HRP 효소반응을 조사하였다. In vitro 실험으로 외부 또는 내부 요인에 의해 세포 내부에 H_2O_2 를 발생시키고 발생한 H_2O_2 를 macrophage 내부에 이식된 HRP가 포함된 PEG 하이드로젤 입자가 감지할 수 있는지를 조사하였다.

연구내용

HRP가 포함된 고분자 나노입자의 합성: 유화중합, 분산중합, 침강중합 등을 이용하여 고분자를 마이크로 또는 나노 크기의 입자로 합성하는 방법에 대한 연구는 활발히 이루어졌으나, 생체물질이 함유된 하이드로젤 나노입자를 합성하는 방법에 대한 연구는 많이 이루어지지 않았다. 그 이유는 중합과정에서 생체물질의 활성이 손실되고, 반응에 참여하는 다른 물질에 비해 상대적으로 큰 크기의 생체물질이 전체적인 반응 전환률을 저하시키는 등의 문제점이 있기 때문이다. 본 연구에서는 역상 유화광중합을 이용하여 효소, 항체와 같은 생체물질을 활성의 손실없이 고분자 입자안에 캡슐화시키는 방법을 개발하였다. 효소가 포함된 마이크로 또는 나노입자를 합성하기 위하여 효소와 PEG가 포함된 단량체, 광개시제로 구성된 수용성 혼합체를 실리콘 오일에 첨가하여 에멀전을 제조하였다. 제조된 에멀전 용액에 UV를 조사하면 개시제가 자유 라디칼을 생성하고 생성된 라디칼이 단량체의 아크릴레이트를 공격하여 중합반응이 시작된다. 반응 종료 후 HRP가 0.2 mg/g 함유된 크기 250~350 nm의 하이드로젤 입자가 생성되었다.

캡슐화된 HRP의 활성 조사: HRP가 포함된 입자가 분산된 용액을 원심분리

한 후 분리된 액상과 입자에 각각 Bradford 단백질 시약을 첨가하여 효소인 HRP의 존재 여부를 확인하였다. 분리된 액상은 595 nm에서 흡광도에 아무런 변화가 없었으나, 입자는 595 nm에서 흡광도의 변화를 보였다. 이것은 입자 내부에 단백질인 효소가 존재하고 입자 밖으로는 나오지 않았다는 것을 보여준다. 입자의 합성과정에서 HRP의 활성손실 여부를 조사하기 위하여 HRP와 H₂O₂의 효소반응을 이용하였고 효소반응을 측정하는 시료로 Amplex Red를 사용하였다. Amplex Red는 H₂O₂와 peroxidase의 효소반응을 측정할 수 있는 시약으로서 오래전부터 사용되어져 왔다. HRP의 존재하에 Amplex Red는 H₂O₂와 1:1로 반응하여 resorufin이라는 붉은 색의 형광산화물을 생성한다. 여기서 resorufin은 563 nm와 585 nm에서 각각 흡수파장과 방출파장을 갖는다. HRP가 함유된 PEG 하이드로젤 나노입자 내부에서 HRP와 H₂O₂에 의한 효소반응으로 생성되는 resorufin의 형광세기를 형광분광기를 사용하여 분석하였다. Resorufin의 형광분석은 들뜸파장(λ_{ex}) 565nm 그리고 resorufin의 최대 방출파장(λ_{em})인 585nm에서 이루어졌다. Amplex Red를 첨가한 하이드로젤 입자의 분산용액에 H₂O₂를 첨가한 시료와 첨가하지 않은 시료의 형광 스펙트럼 결과, H₂O₂를 첨가하지 않은 분산용액에서는 HRP의 효소반응에 의한 resorufin의 생성이 없기 때문에 585nm에서 관찰되는 피크를 볼 수 없는 반면에 H₂O₂를 첨가한 분산용액에서는 585nm에서 나타나는 커다란 피크를 볼 수 있었다. 그리고 다양한 H₂O₂의 농도 변화에 따른 HRP가 포함된 입자의 흡광도 세기의 변화를 관찰한 결과, H₂O₂의 농도가 500 nM에서 250 μ M 사이의 구간에서 변화함에 따라 입자의 흡광도가 변화함을 볼 수 있었다. 그러나 그 이상의 농도에서는 스펙트럼의 변화가 없었다. 이와 같은 결과는 HRP가 입자 내부에 캡슐화된 후에도 활성을 유지하고 또 H₂O₂의 농도변화를 감지할 수 있는 센서로 사용이 가능하다는 것을 확인해 주는 것이다.

HRP가 포함된 하이드로젤 입자의 In Vitro 실험: 합성된 나노입자를

macrophage와 함께 24시간 배양하여 macrophage 내부로 침투하게 한 후, 외부 또는 내부 요인에 의해 발생된 H_2O_2 의 감지 여부를 confocal microscopy를 이용하여 조사하였다. HRP가 포함된 하이드로젤 입자를 살균한 후, macrophage와 함께 배양하면 macrophage의 phagocytosis에 의해 외부에 있던 입자들이 macrophage 내부로 이동한다. 산화적 손상이 발생하는 부위에서는 활성산소들이 다량 발생하고 이러한 활성산소는 H_2O_2 의 형태를 가진다. 따라서 세포 내부에 H_2O_2 가 다량으로 존재하는 부위는 산화적 손상이 발생하는 부위를 의미한다. 외부에서 H_2O_2 를 투입하여 세포 내부에 H_2O_2 를 인위적으로 발생시킨 경우와 lipopolysaccharide (LPS)를 사용하여 세포가 자발적으로 H_2O_2 를 발생하게 한 경우 모두 macrophage 내부에 이식된 HRP가 포함된 하이드로젤 입자는 Amplex Red를 붉은 색의 형광산화물로 전환시키는 것을 관찰할 수 있었다.