

플라즈마 단백질의 고스트 적혈구 흡착 특성

†김 동 옥 · *차 운 오 · **Richard L. Beissinger

인제대학교 공과대학 화학공학과, *선경 Industries 석유화학연구소

**Dept. of Chemical and Environmental Engineering, Illinois Institute of Technology

Adsorptive Binding of Plasma Proteins to Red Blood Cell Ghosts

DongUk Kim[†], WoonOu Cha^{*}, and Richard L. Beissinger^{**}

Department of Chemical Engineering, Inje University, Kimhae, Kyongnam 621-749, Korea

*Sunkyong Industries, Petrochemical Research Center, Suwon, Kyungki 440-948, Korea

**Department of Chemical and Environmental Engineering, Illinois Institute of Technology,
Chicago, IL 60616 U.S.A

ABSTRACT

Blood plasma proteins dissolved in isotonic phosphate-buffered saline were found to be adsorbed to red blood cell ghosts suspended in the solution. This was evidenced by concentration reduction of the plasma proteins in the bulk solution. For initial concentration of 0.1mg/mL immuno globulin, concentration reduction increased from 14% to 45% as the volume fraction of red blood cell ghosts in the solution increased from 5% to 45%. For initial concentration of 0.075mg/mL albumin, the concentration reduction increased from 12% to 47% as the volume fraction of red blood cell ghosts in the solution increased from 5% to 70%. The concentration reduction of plasma proteins in hardened red blood cell ghosts was higher than that in red blood cell ghosts. The number of adsorbed protein molecules per a red blood cell ghost were reduced as volume fraction of the ghosts in the solution increased.

서 론

인공장기 등의 생체재료가 인체 내에 이식되었을 때, 생체재료 표면에 혈액이 응고되는 현상(thrombosis)이 자주 발생하며, 이는 인공장기의 장기적인 사용을 가로막는 중요한 인자가 된다(1). 생체재료에 흡착된 물질은 주로 혈소판, 지방, 콜레스테롤, 지방단백질(lipoprotein), 세포질 및 단백질 등이며, 특히 혈소판의 흡착은 먼저 흡착되어진 단백질에 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있다(2). 따라서 생

체표면에 대한 단백질 흡착 연구는 혈액-생체재료와의 관계를 이해하는데 아주 중요한 역할을 한다. 혈액 내에서는 적혈구 등의 유동으로 인하여 세포성분이 없는 경우에 비해 최고 100배 이상 단백질의 물질전달 계수(effective diffusivity)가 증가하는 것으로 보고되어 졌다(3). 따라서 생체재료 표면의 단백질흡착에 관한 연구에서는 세포성분의 분산이 반드시 필요하다. 혈액중 적혈구는 전체부피중 40~45%를 차지하고 세포성분의 90~95%를 차지하므로(4) isotonic phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)에 분산된 적혈구 용액을 혈액의 대용으로 혈액-생체재료의 관련 연구에서 사용해 왔다(5, 6).

† Corresponding Author

그러나 최근 다양한 플라즈마 단백질의 적혈구 표면의 흡착 가능성에 관한 상반된 몇 건의 보고가 있었다. Rehfeld 등(7)은 알부민이 적혈구의 표면에서 수소결합을 형성하여 단층으로 흡착되어진다고 제안하였고, Victoria 등(8)과 Sorette 등(9)은 몇 개의 항체들이 적혈구 표면에 흡착된다고 보고하였다. 그러나 Brash 등(10)은 25%의 적혈구 분산에서 용액중의 알부민과 피브리노겐의 농도변화를 측정된 결과 흡착정도는 아주 적어서 무시할 만하다고 발표하였다. 만일 많은 양의 단백질이 적혈구 표면에 흡착되면, 이것은 용액중의 단백질의 농도를 감소시켜 플라즈마 단백질의 생체재료 표면흡착에 큰 영향을 미칠 수 있다.

본 연구에서는 일정 농도의 IgG(immunoglobulin G)와 알부민(albumin)을 각각 5~70%의 적혈구 용액에 첨가하여 일정 시간 경과후 용액 내에 남아있는 단백질의 농도를 측정함으로써 단백질의 적혈구 표면흡착에 관한 정확한 자료를 얻고자 하였다. 흡착된 단백질의 농도를 측정하기 위해서는 전체용액을 원심분리하여야 하는데, 원심분리시 적혈구내의 헤모글로빈(hemoglobin)이 용액으로 상당량 유출됨으로 인하여 용액내의 정확한 플라즈마 단백질의 농도를 측정할 수 없다. 따라서 본 연구에서는 적혈구를 플라즈마 단백질의 흡착표면으로 사용하지 않고, 내부의 헤모글로빈이 제거된 고스트 적혈구(red blood cell ghosts)를 흡착표면으로 사용하였다. 적절한 방법으로 준비된 고스트 적혈구의 세포막은 적혈구의 세포막과 동일한 것으로 여러 연구결과 밝혀졌다(11). 세포막의 특성에 대한 단백질의 흡착정도를 알아보기 위해 세포막을 glutaldehyde로 고정화한 hardened 고스트 적혈구(hardened red blood cell ghosts)를 용액에 분산시켜 단백질 흡착정도를 측정하였다. 또한 흡착시간의 변화에 대한 용액의 농도감소를 측정하고 적혈구당 흡착된 플라즈마 단백질의 분자수를 계산하였다.

재료 및 방법

플라즈마 단백질

본 연구에서 사용한 플라즈마 단백질은 IgG(immunoglobulin G)와 알부민인데, IgG는 다양한 면역작용에 관여하고 글로부린중 가장 많은 양을 차지하며, 알부민은 플라즈마의 양과 혈액의 pH를 조절하는 역할을 한다(4). IgG(bovine IgG, $M_w=159,000$ g/mol, 99%, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)와

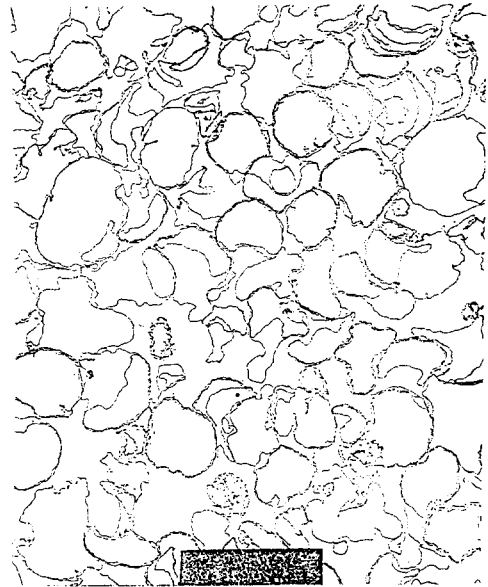


Fig. 1. TEM photograph of red blood cell ghosts (original magnification $\times 3,000$).

알부민(bovine albumin, $M_w=66,210$ g/mol, 99%, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)은 결정화된 형태로 구입하여 사용하였으며, PBS 용액으로 희석하여, 감마글로부린의 용액내 초기농도는 0.1mg/mL, 알부민의 초기농도는 0.075mg/mL로 하였다.

고스트 적혈구의 준비

고스트 적혈구는 Fairbanks 등(12)과 Deziel 등(13)의 방법에 따라 준비되었다. 기간이 지난 혈액을 구입하여, PBS 용액과 혼합하고 4°C에서 2,700 rpm으로 원심분리기(Beckman, Arlington Height, IL)를 사용하여 10분간 원심분리한 후 적혈구만을 수집하였다. 적혈구는 내부의 헤모글로빈을 제거하기 위해 40배의 5mM phosphate 용액과 혼합 후 4°C, 9,000rpm에서 15분간 원심분리하였다. 튜브의 상등액인 헤모글로빈을 조심스럽게 제거한 후 고스트 적혈구를 모으고, 고스트 적혈구를 완전한 적혈구의 형태로 유지하기 위해 0.1% dextrose(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)와 혼합하였다. 고스트 적혈구의 전자현미경 사진이 Fig. 1에 있는데 그 형태가 정상적인 적혈구와 유사하며, 세포막이 완전히 붕합되어진 것을 알 수 있다. 고스트 적혈구의 크기는 digitizer(Scitel, Columbus, OH)를 사용하여 측정하였으며, 평균직경은 6.6 μ m이었다(3).

Hardened 고스트 적혈구는 Wang 등(5)과 Morel 등(14)의 방법으로 준비하였다. Glutaldehyde 용액을 고스트 적혈구 1mL 당 3% glutaldehyde 용액 20mL의 비로 1.5%의 고스트 적혈구 용액에 첨가하였고, 급격한 삼투압의 차이를 피하기 위해 glutaldehyde 용액을 천천히 혼합시킨 후, 22°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 이 반응으로 고스트 적혈구의 세포막이 glutaldehyde와 반응하여 적혈구의 표면이 굳어졌다. 혼합용액을 4°C, 2,700rpm에서 10분간 원심분리하여 반응이 되어지지 않은 glutaldehyde를 제거하였다. Hardened 고스트 적혈구의 평균직경은 6 μ m이었다(3).

단백질의 농도측정

Juliano 등(11)은 isotonic salt 용액으로 처리된 고스트 적혈구는 알부민과 같은 거대 고분자물질에 대해서 비투과성을 가진다고 보고하였다. 따라서 적절한 부피비의 고스트 적혈구 용액에 일정한 농도의 플라즈마 단백질을 첨가한 후, 일정 시간 동안 정제하여 흡착전과 흡착 후에 용액 내에 존재하는 플라즈마 단백질의 농도를 측정하면, 그 차이가 고스트 적혈구에 흡착된 단백질의 양이 된다. 흡착된 플라즈마 단백질의 양은 Lowry(15)의 방법을 이용한 assay kit(Sigma Diagnostics, P5656, St. Louis, MO)를 사용하여 750nm에서 흡광도를 측정함으로써 얻어졌으며, 그 구체적인 실험방법은 다음과 같다.

일정 부피의 고스트 적혈구 용액만을 10mL 튜브에 넣고, 9,000rpm으로 원심분리하여 상등액에 있는 부서진 고스트 적혈구 세포막으로부터 나오는 단백질의 양을 Lowry법으로 측정하였다. 일정 농도의 플라즈마 단백질을 위와 동일한 부피비의 고스트 적혈구 용액에 첨가한 후, 전체용액을 30분 동안 정제시킨 후, 용액을 같은 조건에서 원심분리하였고, 상등액중 1mL를 취하여 Lowry법으로 단백질의 양을 측정하였다. 얻어진 전체 단백질의 농도에서 부서진 고스트 적혈구 세포막으로 인한 단백질의 농도를 빼면 그 차이는 흡착 후에 용액에 남아있는 단백질의 농도가 되며, 이 값과 처음에 고스트 적혈구 용액에 첨가한 플라즈마 단백질의 농도를 비교하여서, 플라즈마 단백질의 적혈구 표면 흡착여부와 흡착정도를 측정하였다.

결과 및 고찰

고스트 적혈구와 hardened 고스트 적혈구의 분산

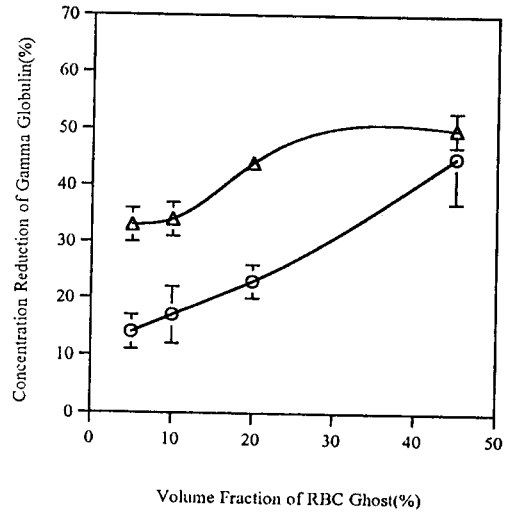


Fig. 2. IgG concentration reduction to initial concentration for red blood cell ghosts(○) and hardened red blood cell ghosts suspensions(△). Initial concentration of gamma globulin was 0.1mg/mL.

시 IgG의 농도감소가 Fig. 2에 나타나 있다. Fig. 2에서 농도감소(%)는 $(C_0 - C)/C_0 \times 100$ 을 의미하는데 C_0 는 용액중 단백질의 초기농도를 의미하며, C 는 30분간 흡착후의 단백질농도를 의미한다. 용액중 적혈구의 부피비가 증가할수록 농도감소는 컸고, hardened 고스트 적혈구의 분산시 농도감소가 고스트 적혈구의 분산시보다 더 컸다. 이는 적혈구의 부피비가 증가함에 따라 더 많은 고스트 적혈구의 세포막이 단백질 흡착에 이용될 수 있어서 전체 단백질의 흡착량이 증가하여, 용액내의 단백질농도가 감소한 것으로 판단된다. 각 실험치는 3~8개의 자료를 이용하여 t-test(16)로 분석하였으며, 평균치와 표준편차가 Fig. 2에 나타나 있다.

고스트 적혈구와 hardened 고스트 적혈구의 분산시 알부민의 농도감소가 Fig. 3에 나타나 있다. 적혈구의 부피비가 5%에서 70%까지 증가함에 따라 농도감소는 증가하였고, hardened 고스트 적혈구의 분산시 농도감소가 고스트 적혈구의 분산시보다 더 컸다.

10% 고스트 적혈구 용액에서 4~60분간의 흡착 시간에 따른 IgG의 농도감소가 Fig. 4에 나타나 있는데, 흡착시간에 대한 변화는 관찰되지 않았다. 이는 IgG의 적혈구 세포막으로의 흡착속도가 대단히

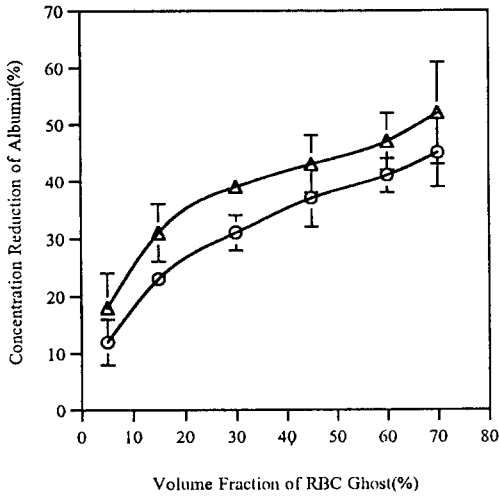


Fig. 3. Albumin concentration reduction to initial concentration for red blood cell ghosts(○) and hardened red blood cell ghosts suspensions(△). Initial concentration of albumin was 0.075mg/mL.

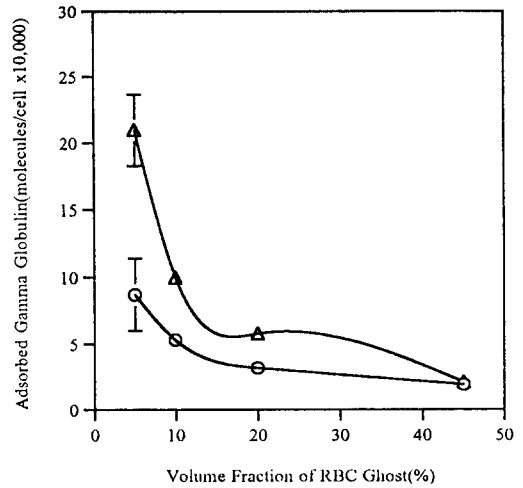


Fig. 5. The number of adsorbed IgG molecules in red blood cell ghosts(○) and hardened red blood cell ghosts suspensions(△) as a function of red blood cell ghost volume fraction.

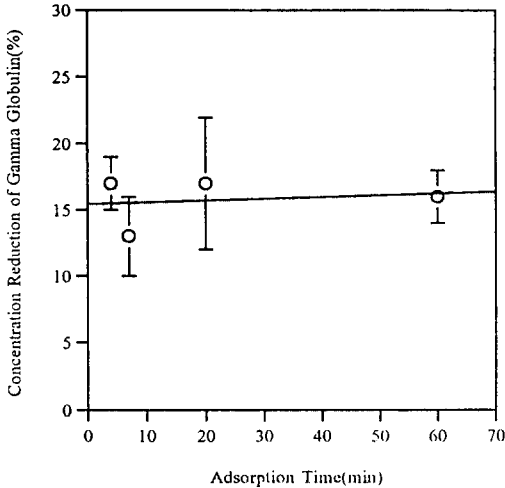


Fig. 4. IgG concentration reduction to initial concentration in 10% red blood cell ghosts suspensions as a function of adsorption time.

빠르다는 것을 의미한다.

특정 고스트 적혈구 부피비에서 적혈구 하나당 흡착된 단백질의 분자수는 다음의 방법으로 계산되었다(3). 예를 들어 30% 고스트 적혈구에 대한 알부민의 흡착의 경우, 실험에서 고스트 적혈구를 포함

하는 전체용액의 부피는 1.5mL이었고 용액중 고스트 적혈구가 차지하는 부피는 $1.5 \times 0.3 = 0.45\text{mL}$ 이다. 적혈구와 동일한 부피를 가진다고 가정한 고스트 적혈구의 부피는 $8.7 \times 10^{-11}\text{cm}^3(4)$ 이므로 용액중 존재하는 고스트 적혈구는 $0.45 / (8.7 \times 10^{-11}) = 5.2 \times 10^9$ 개이다. 적혈구를 제외한 순수한 용액의 부피는 $1.5 - 0.45 = 1.05\text{mL}$ 이고, 초기의 알부민의 농도는 0.075mg/mL이었고, 30분간 흡착 후 알부민의 농도는 0.052mg/mL이었다. 순수용액중의 알부민의 수는 다음과 같이 계산된다. $(0.075 - 0.052\text{mg/mL}) \times 10^{-3}\text{g/mg} \times 1.05\text{mL} / (66,210\text{g/mol}) \times 6 \times 10^{23}\text{molecules} = 2.2 \times 10^{14}\text{molecules}$. 따라서 고스트 적혈구 하나당 흡착된 알부민 분자는 $2.2 \times 10^{14}\text{molecules} / 5.2 \times 10^9\text{RBCs} = 4.2 \times 10^4\text{molecules/RBC}$ 이다.

고스트 적혈구의 부피비에 대한 적혈구당 흡착된 IgG의 분자수 변화가 Fig. 5에 나타나 있는데, 고스트 적혈구의 부피비가 증가할수록 적혈구당 흡착된 분자수가 감소하였다. 이는 적혈구의 부피비가 증가할수록 Fig. 2에 의하여 전체 흡착된 분자수는 증가하였으나, 용액중의 제한된 IgG분자가 보다 많은 수의 적혈구 표면에 흡착됨으로 인하여 적혈구당 흡착된 분자수는 감소한 것으로 해석된다. 또한 고스트 적혈구보다 hardened 고스트 적혈구에 더 많은 감마글로부린 분자가 흡착되었고, 적혈구의 부피비가

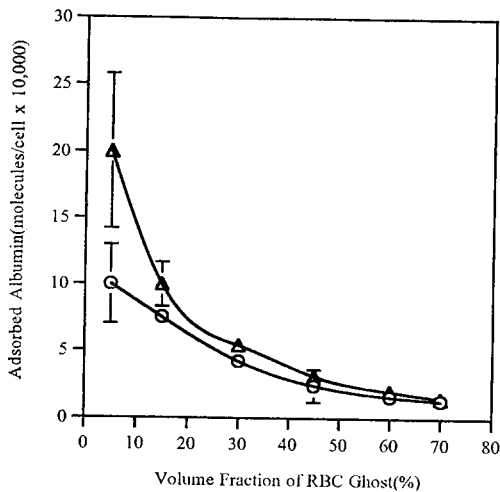


Fig. 6. The number of adsorbed albumin molecules in red blood cell ghosts(○) and hardened red blood cell ghosts suspensions(△) as a function of red blood cell ghost volume fraction.

증가할수록 그 차이는 줄어들었다. 따라서 적혈구당 흡착된 IgG의 분자가 많은 경우에는 고스트 적혈구와 hardened 고스트 적혈구의 세포막특성이 단백질 분자의 흡착에 영향을 미치는 반면, 흡착된 분자수가 적을 경우에는 세포막의 특성은 단백질의 흡착에 큰 영향을 미치지 못하였다. 이 결과는 흡착의 가장 전형적인 모델인 Langmuir isotherm(17)의 예측과도 일치한다.

고스트 적혈구의 부피비에 대한 적혈구당 흡착된 알부민의 분자수 변화가 Fig. 6에 나타나 있다. 고스트 적혈구의 부피비가 증가할수록 적혈구당 흡착된 분자수가 감소하였으며, 적혈구의 부피비가 45% 이하에서는 고스트 적혈구보다 hardened 고스트 적혈구에 흡착된 분자수가 더 많았고, 45% 이상에서는 큰 차이를 보이지 않았다.

적혈구당 흡착된 IgG와 알부민의 분자수를 비교해 보면 알부민의 용액내 초기농도는 IgG의 75%에 불과하였으나 동일 적혈구 부피비에서 알부민이 감마글로부린보다 흡착된 분자수가 40% 정도 증가하였다. 이는 IgG의 분자량이 알부민보다 2.4배 크므로 물질전달속도가 감소하여 흡착량이 감소된 것도 원인이 될 수 있다(18). Fig. 6의 결과를 Rehfeld 등(7)과 비교해보면 적혈구당 흡착된 분자수가 1/10 정도에 불과하였는데, 이는 그들의 실험에서는

알부민의 초기농도가 4mg/mL인 반면 본 연구에서는 초기농도가 0.075mg/mL인 점에서 오는 차이로 해석될 수 있다.

본 연구를 통하여 적혈구의 분산시 상당한 양의 플라즈마 단백질이 적혈구 표면에 흡착되는 것으로 나타났으므로 용액내의 단백질의 농도를 일정하게 유지하기 위해서는 흡착되는 양을 고려하여 추가로 단백질을 첨가하여야 용액의 농도를 일정하게 유지할 수 있으며, 이는 적혈구 분산시 단백질-biopolymer간의 흡착연구에 보다 정확한 자료 및 model을 제공할 것으로 사료된다.

요 약

IgG와 알부민이 고스트 적혈구의 분산하에서 적혈구의 세포막에 흡착되었다. 용액중 IgG의 농도가 0.1mg/mL일 때, 고스트 적혈구의 부피비가 5%에서 45%로 증가함에 따라 흡착으로 인한 용액중의 IgG의 농도감소는 14%에서 45%로 증가하였고, hardened 고스트 적혈구 분산시가 고스트 적혈구 분산시보다 더 많은 단백질이 흡착되었다. 용액중 알부민의 농도가 0.075mg/mL일 때, 고스트 적혈구의 부피가 5%에서 70%로 증가함에 따라 용액중의 알부민의 농도감소는 12%에서 47%로 증가하였다. 흡착시간에 대한 IgG의 농도변화를 측정된 결과 단백질의 흡착은 빠른 속도로 일어남을 알 수 있었고, 적혈구당 흡착된 단백질 분자수를 계산한 결과 용액내 적혈구의 수가 증가할수록 적혈구당 흡착된 분자수는 감소하였다.

참고 문헌

1. E. W. Davie and K. Fugikawa(1975), *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 799.
2. M. A. Packham, G. Evans, M. F. Glynn, and J. F. Mustard(1969), *J. Lab. Clin. Med.*, **73**, 686.
3. D. Kim(1990), "Augmentation of Macromolecular Mass Transport in Sheared Suspensions", Ph. D. Thesis, Dept. of Chemical and Environmental Engineering, Illinois Institute of Technology, Chicago.
4. D. O. Cooney(1976), *Biomedical Engineering Principles*, p. 39, Marcel Dekker, New York.
5. N. L. Wang and K. J. Keller(1985), *J. of Col-*

- loid Interface Sci.*, **103**, 210.
6. D. Kim and R. L. Beissinger(1993), *J. of Colloid Interface Sci.*, **159**, 9.
 7. S. J. Rehfeld, D. J. Eatough, and L. D. Hansen(1975), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **66**, 586.
 8. E. J. Victoria, S.W. Pierce, M. J. Branks, and S. P. Masouredis(1990), *J. Lab. Clin. Med.*, **115**, 74.
 9. M. P. Sorrette, U. Galili, and M. R. Clark (1991), *Blood*, **77**, 628.
 10. J. L. Brash and S. Uniyal(1976), *Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs*, **22**, 253.
 11. R. L. Juliano(1973), *Biochim. Biophys. Acta.*, **300**, 341.
 12. G. Fairbanks, T. L. Steck, and D. F. L. Wallach(1971), *Biochemistry*, **10**, 2606.
 13. T. E. Deziel and A. W. Girotti(1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 8192.
 14. F. M. Morel, R. F. Baker, and H. J. Wayland (1971), *J. Cell Biol.*, **48**, 91.
 15. O. H. Lowry(1951), *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.
 16. N. A. Weiss and M. J. Hassett(1987), *Introductory Statistics*, 2nd Ed., Addison-Wesley, Reading.
 17. W. L. McCabe, J. C. Smith, and P. Harriott (1993), *Unit Operation of Chemical Engineering*, 5th Ed., McGraw-Hill, NewYork.
 18. W. Cha(1993), "Red Blood Cell-Augmented Mass Transport of Albumin in Sheared Suspensions to Surfaces", Ph. D. Thesis, Dept. of Chemical and Environmental Engineering, Illinois Institute of Technology, Chicago.