



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학박사 학위논문

담관 결찰 및 담낭 손상을 유도한 쥐
모델을 대상으로 나노-생체 기반의 표면
증강 라만 분광을 이용해 조기 담관 손
상 측정 개발을 위한 실험 연구

An experimental study to develop an early bile duct damage detection using nano-in vivo-based surface-enhanced Raman spectroscopy in mouse bile duct ligation and gallbladder damage model

울산대학교대학원

의학과

조유정

담관 결찰 및 담낭 손상을 유도한 쥐
모델을 대상으로 나노-생체 기반의 표면
증강 라만 분광을 이용해 조기 담관 손
상 측정 개발을 위한 실험 연구

지도교수 남궁정만, 김준기

이 논문을 의학박사 학위논문으로 제출함

2022년 7월

울산대학교대학원

의학과

조유정

조유정의 의학박사 학위 논문을 인준함

심사위원장 홍석경 (인)

심사위원 남궁정만 (인)

심사위원 김준기 (인)

심사위원 김민규 (인)

심사위원 신성 (인)

울산대학교 대학원

2022년 7월

국문요약

서론

1. 연구 배경

간 이식 후 간담도 기능 장애의 조기 진단과 적절한 치료 조치는 이식된 간의 비가역적 손상을 예방하는데 도움이 될 수 있다. 간 이식 초기에는 높은 면역 억제제 용량을 유지하게 되는데 이때 감염의 위험이 높다. 따라서 면역 억제제를 필요 이상으로 많이 투여하면 심각한 감염 합병증을 유발할 수 있는 반면, 이식편 거부 반응이 있을 경우 반대로 면역억제제를 용량을 증가해야한다. 이식된 간의 거부 반응과 감염을 모니터링 및 구별하기 위해 여러 생체 화학적 간 기능 검사는 이식 후에 일상적으로 수행된다. 그러나 이러한 검사 중 어느 것도 거부 반응에 특이적이지 않으며 거부반응은 간외담도폐쇄, 상행 담관염, 바이러스 감염과 같은 빈번한 합병증과 결정적으로 구별할 수가 없다. 이를 위해 간 생검은 여전히 이 과정에서 중심적 역할을 한다. 그러나 간 생검은 샘플링 오류, 비용에 대한 부담 및 침습적인 시술로 혈액학적으로 불안정한 환자의 경우에 심각한 합병증을 유발할 수 있는 단점이 있다. 따라서 이식편의 모니터링을 위한 비침습적이고 실시간 합병증 진단이 가능한 기술의 개발의 필요성이 커지고 있다.

이와 관련하여 진동 분광 진단은 비침습적이며 세포 조직을 보존하며 추가 라벨링이 필요하지 않은 몇가지 이점이 있다. 적외선 및 라만 분광법과 같은 진동 분광법은 생물학적 시료의 화학적 및 분자적 변화를 조사하는데 현재 많은 연구 및 응용이 되고 있다. 이 접근 방식은 추가적인 라벨링이나 정제 없이 실시간으로 생체 분자 구성을 fingerprint 만들 수 있다. 라만 분광법은 샘플에 입사하는 광자의 비탄성 산란을 기반으로 한다. 입사 에너지가 각각의 분자에 따라 고유의 진동 모드에 의해 전환되기 때문에 스펙트럼의 개별 피크에는 구조 및 형태 정보가 포함된다. 따라서 라만은 질병을 진단할 수 있는 훌륭한 도구가 될 수 있다.

2. 연구 목적

이 연구의 목적은 간 이식 후 환자에게서 발생 가능한 담도 합병증 및 면역억제제 복용과 관련하여 감염 여부를 수술장 및 병실에서 조기에 진단 할 수 있는 나노 및 분광 융합 기술 시스템을 개발하는 것이다. 이를 위해 담도 염증 및 감염 상태를 대변하는 동물 실험을 진행하고 염증을 진단하기 위한 생체지표를 라만분광 기반 센싱칩을 이용해 측정하고 분석하는 실험을 진행하였고, 이 실험의 결과는 이 기술의 간 이식 환자 관리의 임상적 적용을 위한 가장 기초적 결과가 될 것이다.

이론적 배경 및 연구 방법

1. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS)의 적용 및 ZnO nanorods 생성

라만 분광법은 조사된 샘플의 매우 좁은 스펙트럼 특징을 생성하는 진동 전이를 기반으로 화학 및 생물학적 시료의 식별과 분자 구조를 확인 할 수 있다. 하지만 라만 산란은 효율이 매우 떨어지는 단점이 있기 때문에 나노 크기의 금속 표면에 분자가 흡착되어 발생하는 surface-enhanced Raman scattering 효과로 라만 산란 신호를 크게 향상시켜 검출의 민감성을 극대화 시키는 표면 강화 라만 분광법 (Surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS)이 개발되었다. SERS는 다양한 스펙트럼 정보와 낮은 수분 간섭, 그리고 매우 민감하고 분자에 따라 특이적인 fingerprint를 생성하기 때문에 복잡한 생화학적 조성을 가지고 주로 물을 포함하는 생체 검체를 위해 사용될 수 있다.

라만 효과를 최대화하기 위해서는 기판의 금속 구조 사이의 간격을 최적화하고 균일하게 배열된 금속 헤드 나노 구조를 가진 SERS 기판을 사용하는 것이 중요하다. 또한 개별 세포 구성 요소는 소량이고 낮은 라만 산란을 나타내기 때문에 높은 감도를 얻기 위한 효율적인 기판이 필요하다. 이를 위해 ZnO 나노로드를 성장시키고 코팅하여 선택적 생체 지표의 라만 분광 측정이 가능한 나노 구조체 기반 표면 증강 라만 센싱칩을 제작하였다. 현미경에 라만 분광 시스템을 설치하여 마이크로 단위의 포지션이 가능한 시스템을 구성하고, 제작된 표면 증강 라만 (SERS) 칩 탑재에 적합하도록 세팅하였다.

2. 쥐의 담관 결찰과 담낭 손상을 통한 담관 협착 모델 실험군/열 손상 모델 실험군 생성

간이식 환자의 담도염증 및 감염을 대변하기 위해 담관 협착 모델 동물 실험군과 간이식 후 있을 수 있는 열 손상을 모방한 동물 실험군을 제작하였다. 대조군으로서의 염증이 없는 동물의 담즙 검체 및 담관 협착 실험군과 열 손상 실험군의 라만 신호를 근간으로 분석된 결과와 생체지표 검출 결과를 비교하여 표면증강라만을 통한 진단의 유효성을 검토해 보았다.

3. 비표지 라만 신호의 분석을 실시하기 위한 기존 라이브러리를 확보하고, 획득 된 신호로부터 진단 기준을 마련하기 위한 PCA(Principal Component Analysis) 등의 통계분석을 실시하였다.

연구결과

대조군, 담관 협착 모델, 열 손상 모델 각각 쥐 10마리씩 실험하였다. 간 조직병리학 과 혈액 총 빌리루빈, 아스파르트산 아미노전이 효소 (aspartate aminotransferase, AST), 알라닌 아미노전이 효소 (alanine aminotransferase, ALT)을 통해 간 기능을 평가한 결과, BDL 쥐에서 간기능이 급격히 감소하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 간 조직에서 lipocalin-2, vimentin 수치를 측정하여 검증되었다. 반면 담낭의 H/E 염색을 통해 열소작에 의한 손상의 경우에만 담낭의 상피가 소실되는 것을 확인하였다. 그리고 시리우스 레드 염색을 통해서도 소실된 상피에서 담낭 내부로 콜라겐 조직이 노출되는 것을 확인하였다. 정상, BDL, 담낭 소작 모델의 검체에 대해 라만 스펙트럼을 얻었고, 담낭 소작 검체 에서만 의미 있는 피크가 나타났다. 이러한 피크의 대부분은 페닐 알라닌을 포함한 콜라겐 관련 공급원에서 발생하며, 이는 주로 생체 검체에서 발견된다. 이러한 라만 신호 할당 결과는 시리우스 레드 염색에서 볼 수 있듯이 상피 소실로 인한 고밀도 콜라겐 영역의 노출 결과와 일치한다. 주성분 분석을 통해 담낭의 열 손상 감지하는 기준을 확보하였다.

결론

쥐 BDL 모델을 이용하여 담관 협착으로 인한 간 손상을 유도, 소작을 통해 담낭 손상으로부터 담낭 (담관)에 대한 선택적 손상을 위한 샘플을 제조하여 그에 따른 라만 스펙트럼을 얻었고, 담낭 열 손상 모델에서만 의미있는 신호가 나오는 것을 확인하였다. 이 연구에서 성공적으로 얻어진 라만 신호 데이터의 분석 결과를 기반으로 기존의 배양 및 표지를 통해 진단하는 시간을 비약적

으로 줄일 수 있고 임상 시료의 응용을 통한 진단의 민감도 및 특이도 향상에 대한 SERS 칩 기술의 가능성을 확인할 수가 있었다. 이식 초기의 전기 소작으로 인한 담관 손상을 SERS 를 이용하여 현장에서 실시간 모니터링하여 조기 진단을 할 수 있다면 간이식 후 환자 관리에 큰 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다. 더 나아가 뚜렷한 결과를 얻기 위해 추후 다양한 매개변수 (SERS 기질, 이온 함량, 레이저 파장 등)를 조절하여 간 손상에 대해서 라만 스펙트럼 연구가 시행될 예정이다.

목차

국문요약	i
목차	iv
서론	1
이론적 배경	4
연구방법	9
연구결과	17
고찰	23
결론	27
참고문헌	28

서론

1. 연구 배경

1.1. 간이식 수술 후 환자의 실시간 합병증 모니터링 기술 개발의 필요성

생체 간이식 (Living donor liver transplantation, LDLT)은 병에 걸리거나 기능 장애가 있는 간을 제거하고 살아있는 기증자의 건강한 간 일부로 교체하는 외과적 과정이다. 간 이식 후 오랫동안 면역억제제를 복용하게 되는데, 이식 초기에는 높은 용량의 면역 억제제를 복용하기 때문에 감염 위험이 매우 높다. 이는 수술 초기에 환자가 사망하는 대부분의 이유이다. 주로 세균이나 바이러스성 감염이 많고 진균 감염도 높은 비율을 차지하게 된다. 수술 시 원활한 담즙 배액을 위하여 배액관을 설치하게 되는데 이로 인해 감염에 노출되어 있다. 간 이식 후 담도 합병증은 생체 간이식에서 많이 발생하는 합병증으로, 수술 후 담도 분합부 주위에서 담즙이 새거나 문합부가 좁아지는 증상이다. 황달, 소양감(가려움증), 간 기능 부전 등을 유발하는 담관 협착의 경우, 이를 넓혀주는 시술을 하게 된다. LDLT 과정에서 우엽 이식편과 수술기법을 이용한 생체공여 간 이식 시술이 간동맥, 간정맥, 문맥, 하대정맥 및 담관 등의 문합에 활용되고 있다. 수술 후 이러한 혈관의 개통이 원활하지 않으면 간 기능이 떨어지며, 혈관의 적절한 기능을 평가하기 위해 일정한 간격으로 간 도플러 초음파 검사 및 혈관 재건 컴퓨터 촬영을 시행하여 조기에 합병증을 발견하여 치료해야한다. 임상적으로 간이식 환자의 면역 억제제 사용 및 항생제 등의 약물 처리를 위해서는 정확한 감별진단이 수행되어야 한다. 간 수치 상승, 열 발생과 같은 같은 증상에 대해 담도염과 이식편에 대한 거부반응을 감별해야 하고 진단 결과에 따라 정반대의 의료방향을 수행하게 된다. 하지만 이를 위해서는 많은 시간이 소요된다. 신속한 감별진단을 실시하고 치료할 수 있는 모니터링 기술의 기술이 필요성이 요구되며, 이러한 시스템이 구성되면 환자의 안전성을 향상될 수 있다.

1.2. 간이식 환자의 생체 부산물 내 생체지표를 통한 진단 기술 개발의 필요성

기존 장기 및 조직의 병리적 염증 여부 판단은 해당 조직의 생검을 통한 hematoxylin-eosin (H&E) 및 immunohistochemistry 염색 결과로부터 진단하게 된다. 하지만 이는 침습적이고 작은 부위만 생검을 시행하기 때문에 조직 검사를 시행한 검체가 염증 발생 지역을 확보했다는 보장을 하기가 어렵다. 생체 내에서 검출의 대상이 되는 생체지표는 그 크기에 따라 세포 (~수십um), 적혈구 (~8 um), 박테리아 (~1 um), 바이러스 (~400 nm), 엑소좀 (수nm ~수십 nm) 및 단백질 등으로 구분되어 있으며, 크기가 작을수록 적은 양의 혈액 및 소변 등에 분포되어 존재할 가능성이 높다. 실질적으로는 생체 부산물에서 다양한 생체지표들이 혼재되어 있는 경우도 많기 때문에 나노미터 생체지표를 선별적으로 검출할 수 있다면 잡음이 적은 결과를 획득하여 정확성을 향상시킬 수 있다. 간담도 관련 염증 발생을 모니터링하는 인자로 IL-2, TNF- α 및 IL-18 등의 inflammatory cytokine로 진단해왔으나 검출 및 분석에 시간적 한계가 존재함. 따라서 이러한 인자를 신속히 검출 할 수 있는 장치의 개발이 요구된다.

1.3. 라만 분석 장치의 환자 합병증 모니터링 적용에의 필요성

PCR 및 배양 등의 방법으로 특정 질환을 식별하고 정량화하기까지는 많은 시간과 비용이 소모되고 있으며, 이에 따라 빠르고 정확하게 검출할 수 있는 고감도 바이오 센서에 대한 수요는 꾸준히 증가하고 있다. 이러한 수요에서 높은 민감도와 특이도를 갖는 다양한 물리적, 전기적, 광학적 센서들이 개발되어 왔으나, 실질적인 진단 및 측정에 사용되기에는 민감도, 안전성과 같은 문제점이 여전히 존재한다. 최근 라만 분광 시스템은 다양한 장기에서 발생하는 암 진단 기술로써, 레이저 광원 및 광검출기, 분광기 등의 구성 광학계 성능 및 주변 기술이 급격히 향상됨에 따라 재조명 받고 있다. 라만 분광 기술은 신호의 선폭 (Bandwidth)이 좁아 수십 가지 이상 다중 검출 및 기능성을 가지고 있다는 장점으로 생체 등의 복잡한 유기체 내에서 질환을 진단하는 fingerprinting 기술로서 가장 강력한 응용 가능성을 가지고 있다. 생체에서 얻어진 신호에 대한 peak reference를 참고하여 간이식 환자의 배액관을 통한 배액되는 담즙내에 존재하는 혈액 응고 인자 및 염증 인자를 모니터링 할 수 있으면 환자의 건강 상태를 정확하게 판단할 수 있을 것이다.

2. 연구 목적

이 연구의 목적은 담관 결찰 (bile duct ligation, BDL) 동물 모델을 제작하여 간이식 시 발생하는 담도 폐색에 의한 손상을 시뮬레이션하여 정상 동물 모델과 비교해 라만 신호의 변화를 측정하였다. 또한 소작술로 담낭 손상을 발생시킨 동물 모델을 통해 간 이식 중 발생할 수 있는 열 손상을 시뮬레이션하여 이에 대한 라만 신호의 변화를 측정하였다. 이러한 분석 결과를 통해 표면 강화 라만 생체 센싱칩의 임상적 적용을 위한 가장 기초적인 결과를 얻음으로써 추후 간 이식 환자로부터 배액된 담즙에서 환자의 상태를 모니터링할 수 있는 생체지표 검출 기반의 표면 강화 라만 생체 센싱칩의 유효성 검토를 하기 위한 기반을 마련할 것이다.

이론적 배경

1. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS)

1.1. SERS의 개요

객관적이고 정량적인 진단 정보를 적시에 이용할 수 있게 되면 질병을 진단하는데 있어 의료의 질은 향상될 수 있으며, 생물 의학 기술의 발전은 이러한 정보를 제공할 필요에 의해 진행되었다. 라만 산란, 형광, 반사율과 같은 분광학의 새로운 생체 의학 응용은 분자 수준에서 조직의 구성에 대한 필수적 정보를 제공할 수 있다. 이 기술들 중, 라만 분광학은 조직의 화학적 구성에 관한 상세한 정보를 제공할 수 있다. 질병의 진행됨에 따라 화학적 변화가 수반되는데 라만 분광학은 이러한 점을 예민하게 탐지하여 질병 진단을 위한 정보를 제공할 수가 있다.

1928년 물리학자 Chandrashekhara Venkata Raman은 라만 효과로 알려진 빛의 비탄성 산란 현상을 발견하였다. 이는 입사한 빛의 주파수와는 다른 주파수를 갖는 분자가 산란되며 파장의 변화를 일으키고 이는 분자의 화학적 구조에 따라 달라진다¹. 라만 분광학은 이 산란광을 이용하여 분자의 구조, 대칭, 전자 환경 및 결합에 관한 정보를 제공할 수 있는 분자 진동에 대한 지식을 얻음으로써 개별 화합물의 양적, 질적 분석을 가능하게 한다.

분자에 대한 단색광을 주입하게 되면 광자 주파수의 변화가 없거나 파장과 에너지의 변화가 없는 탄성 산란이 발생하거나 광자가 일정량의 에너지를 잃거나 에너지를 얻는 비탄성 산란이 일어난다. 광자가 일정량의 에너지의 변화를 갖게 될 경우 광자 주파수의 변화를 동반한다². 라만 분광계는 광원, 단색계, 검체 홀더 및 검출기로 구성된다. 라만 스펙트럼 분석에 영향을 미치는 요인에는 높은 신호 대 잡음비, 기기 안정성 및 충분한 분해능이 포함된다.

SERS는 1977년 Jeanmaire 과 Albrecht에 의해 제시되었다^{3,4}. 라만 산란 신호를 크게 향상시켜 검출의 민감성을 극대화 시키는 기술로 금속 표면과 관련된 전자기적 향상과 분석물의 화학 흡착 또는 분석물과 금속 표면과의 화학적 결합에 의한 화학적 강화 이 두가지 메커니즘이 라만 산란

신호를 향상에 영향을 미치는 요인이다. 정상적인 라만 산란으로 얻은 신호 (예: 분자당 10^{-30} cm^2)¹는 보통 매우 약하기 때문에 더 많은 신호를 얻기 위해 SERS 기술을 선호한다. 이 기술은 분자가 표면과 상호작용하는 방법에 대한 정보를 제공할 수 있으며, 이는 매우 낮은 농도의 분석물을 검출할 수 있게 한다.

SERS 효과는 일반적으로 구조화되지 않은 기판과 비교하여 SERS 신호 증가의 크기를 정량화하는 EF (Raman enhancement factor)를 특징으로 한다⁵. SERS 효과의 EF는 주로 전자기장의 영향을 받는다. 전자기장의 향상은 local surface plasmon resonance (LSPR)의 영향을 받으며, 이는 입사한 빛과 금속 나노 입자의 표면 전자 사이의 상호 작용에 의해 차례로 발생한다. 나노입자군에서 LSPR이 발생하면 나노 입자 사이에서 hot-spot이 발생하여 결과적으로 EM이 크게 향상되고 SERS 효과가 향상된다. 효과적인 SERS를 위해서는 금속 구조 사이의 간격을 최적화하고, LSPR의 향상이 최대화되도록 균일한 입자를 생성하기 위해서 균일하게 배열된 금속 헤드 나노 구조를 가진 SERS 기판을 사용하는 것이 중요하다⁶⁻⁸.

SERS에서 가장 일반적으로 사용되는 금속은 금, 은 및 구리이다⁹. 금, 은 및 구리와 같은 나노입자가 특별히 준비된 금속 표면은 라만 신호의 강도를 최대 10^4 에서 10^6 배까지 증가시켜 생물학적 및 화학적 샘플을 더 빠르고 정확하게 검출할 수 있다¹⁰. 단백질, 지질, 핵산, 엑소좀, 대사물 및 기타 나노 크기의 생물학적 분자가 일반적인 생물학적 액체에 나타나는 대로 직접 측정함으로써 암, 염증 또는 기타 질병에 대한 정보를 수집할 수 있다¹¹⁻¹³ (Figure 1).

EF는 플라즈몬 형성을 지원하는 금속 입자 사이의 간격에 크게 의존하기 때문에¹⁴ 대부분의 SERS 실험은 매우 균일한 나노구조 기판 또는 콜로이드 용액을 사용한다. 금, 은과 같은 나노입자는 라벨링없는 SERS 검출을 위한 플라즈몬 활성 기질로 사용될 수 있을 뿐만 아니라 라만 리포트 분자 (SERS labels/nanotags) 및 항체와 같은 표적 특이적 리간드로 작용할 수 있다. 이에 따라 상응하는 나노입자-리간드 접합체는 복잡한 생물학적 시스템에서 표적 분자의 선택적 검출을 위해 상응하는 표적 분자를 인식할 수 있다. 금속 기질 표면 (label-free SERS) 또는 금속 표면의 라만 리포터 분자 (SERS labels)에서 매우 가까운 타겟에서 강력하게 강화된 라만 신호를 사용하여 타겟

분자를 효율적으로 감지하고 식별할 수 있다.

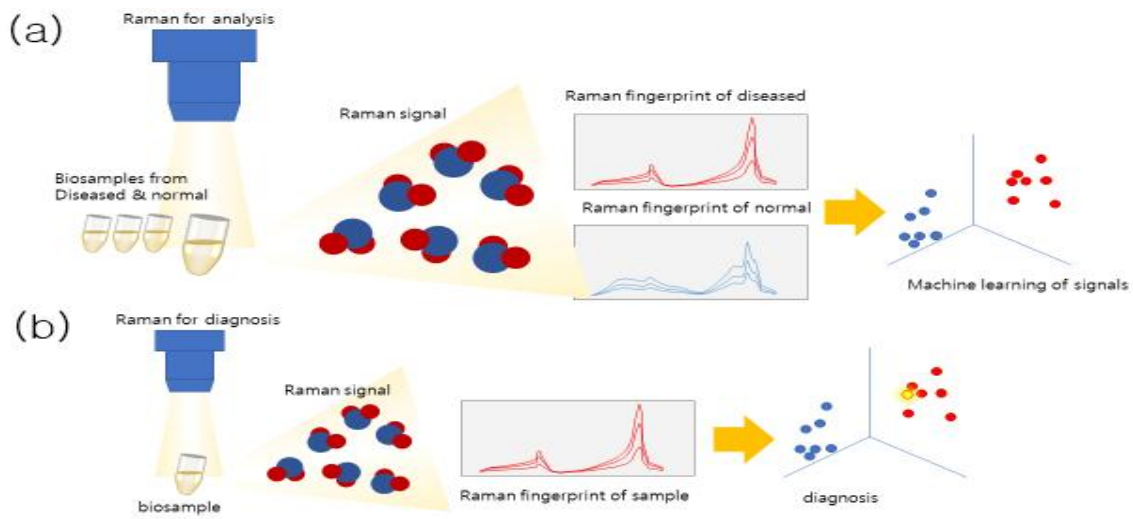


Figure 1. Schematic diagram showing the examination of normal and diseased biosample using Raman (a) differentiation between and characterization normal cell line and diseased cell line (b) diagnosis of diseases through Raman

1.2. SERS의 의학적 적용 분야

현재 연구 중인 라만 분광학의 진단적 응용은 광범위하다. 물 분자의 라만 산란 신호의 범위는 작기 때문에 고유의 수성 환경에 있는 생물학적 분자로부터 진동 정보를 얻을 수 있고 배경과의 효율적인 감지 및 식별이 가능하다. 검출 한계가 낮고 좁은 스펙트럼 대역폭, 형광 소광 능력, 광학 라벨 유무에 관계없이 SERS는 DNA 또는 RNA 분석¹⁵⁻¹⁷, 유전학 및 단백질체학¹⁸, 화학적 무기질 검출¹⁹⁻²¹, 의료 진단^{19,22}에 적합하다. 생물학적으로 관련된 매질에서 단일분자까지 감도로 분자 진동 정보를 제공하는 SERS의 고유한 능력은 시험관 내 생체 내 응용 분야에 이상적으로 적합한 강력한 분석 시스템을 제공한다. 합리적으로 설계된 기질을 정밀하게 제어하면 SERS가 더 많은 생물 분석 응용 분야에서 표준 정량 기술이 될 수 있다.

최근 연구들에 따르면 세포 및 조직 영상 연구에 라만 분광법을 적용하는 추세가 증가하고 있다. 유방 조직의 라만 이미징이 입증되었고^{23,24}, Van de Poll은 최근 라만 이미징을 사용하여 atherosclerotic plaque에서 ceroid의 화학적 조성을 조사하였다²⁵. 또 다른 연구에서 Timlin은 조직

손상이 있는 뼈의 미세 손상과 관련된 스펙트럼적으로 구별되는 미세 구조를 연관시켰다²⁶. 이러한 라만 분광법의 성공에도 불구하고 이 기술의 효율성은 여전히 낮다. 개별 세포 구성 요소는 일반적으로 세포당 매우 적은 양으로 존재하고 낮은 라만 산란을 나타내기 때문에 높은 감도를 얻기 위해서 의료용 SERS의 개발에는 비용 효율적인 기판의 개발이 필요하다.

2. ZnO nanorods

1.1. ZnO nanorods의 개요

금 나노입자나 콜로이드 입자를 사용하는 경우 나노 입자 사이의 거리 조절이 어렵고 기판 전체의 균일성 및 재현성이 낮아 라만 분석 결과가 불규칙하다. SERS 기판의 재현성을 높이고 일관된 분석 결과를 얻기 위해 동일한 높이에서 금 입자를 균일하게 분포시키는 ZnO 나노로드가 필요하다. ZnO는 계층적 나노구조, 나노벤트 및 나노나선과 같은 매우 균일하고 다양한 바람직한 구조를 형성한다²⁷⁻²⁹. 특히, ZnO 나노로드의 용액 기반 자가 조립은 저비용 제조 방법의 균일성을 증가시킬 수가 있다. 또한 SERS 효과는 반도체와 플라즈몬 금속 사이의 전하 이동 상호작용으로 인해 ZnO 나노 물질과 플라즈몬을 생성하는 금속 나노 입자가 결합될 때 더 강해지는 것으로 보고되었다³⁰.

Miyeon Jue 등³¹ 이 2019년에 발표한 연구는 모델 분석 물질로 주의 소변의 Rhodamine B를 사용하여 국소 충전 없이 LSPR을 증가시킬 수 있는 Au 코팅의 최적화 두께를 보여주었다. Au/ZnO 200nm 두께에서 고감도 피크의 강도는 4-5% 사이의 표준 편차를 보여 높은 기판의 균일성을 나타낸다 (Figure 2).

1.2. ZnO nanorods의 의학적 적용 분야

금으로 코팅된 ZnO 나노로드는 저렴한 비용, LSPR 기반 신호 향상 및 생체 적합성으로 SERS를 통한 생체 지표의 조기 광학 검출이 가능하다. 나노 크기의 생체 지표는 소변과 혈액과 같은 생체 부산물에 잘 분산되어 있으며, Au/ZnO nanorods를 이용한다면 조기에 질병을 진단할 수 있다.

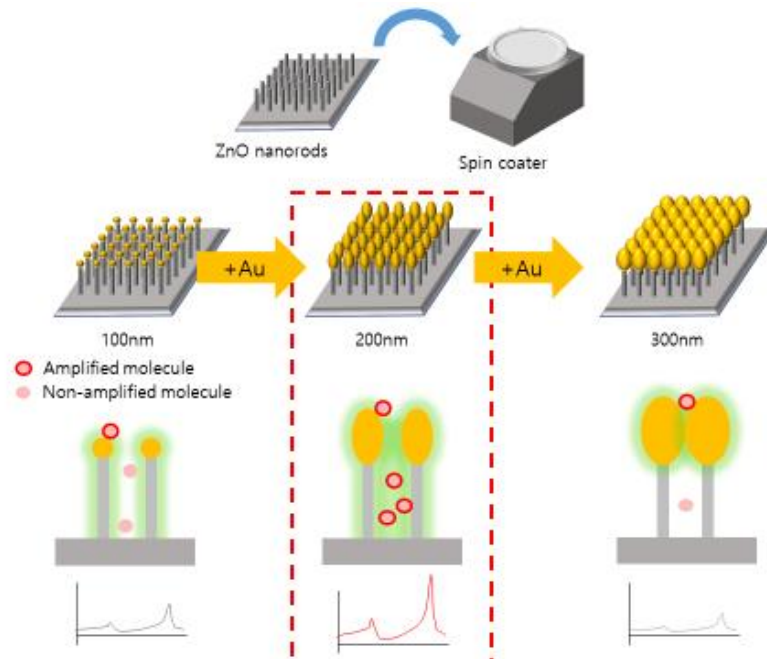


Figure 2. Schematic showing the processes of the ZnO nanorod-based surface-enhanced Raman scattering (SERS) substrate

연구 방법

1. 실험 계획

1.1. 연구의 단계적 목표

본 연구는 간 이식 환자의 면역억제제 제어 관리 한계 극복하기 위해 담도 염증을 신속한 진단을 할 수 있는 생체 지표를 모니터링 기술의 개발을 최종 목적으로 하며, 이에 따라 간이식 환자의 담도 합병증을 대변하는 동물 모델 제작 및 라만 분광 시스템 구축을 하여 이에 대한 결과를 분석, 해석하고자 한다. 이러한 결과를 토대로 라만 분과 기반의 간 이식 합병증 진단과 치료 분석을 위한 기틀을 마련하고자 한다 (Figure 3).

1.2. 쥐의 담관 결찰과 담낭 손상을 통한 담관 협착 모델 실험군/열 손상 모델 실험군 생성

동물 연구 윤리에 기반한 연구 계획서 작성 및 병원 내 동물실험 신청 및 승인 후 대조군 및 담관 결찰군, 열 손상 모델을 생성한 뒤 표현형적 변이 현상의 육안상 변화를 관찰하고 담즙, 혈액 및 간을 샘플링 하였다.

1.3. 라만 장치 설치 및 동작

마이크로 칩 탑재 가능한 라만 분광 시스템을 구축함으로써 현미경 장착 가능하게 한다. 동물 실험에서 획득한 정상 및 담관 결찰군, 열 손상 모델의 담즙의 표면 증강 라만을 측정하고, 샘플에서 획득한 스펙트럼의 시그널 프로세싱 및 통계 분석한다 (Figure 4).

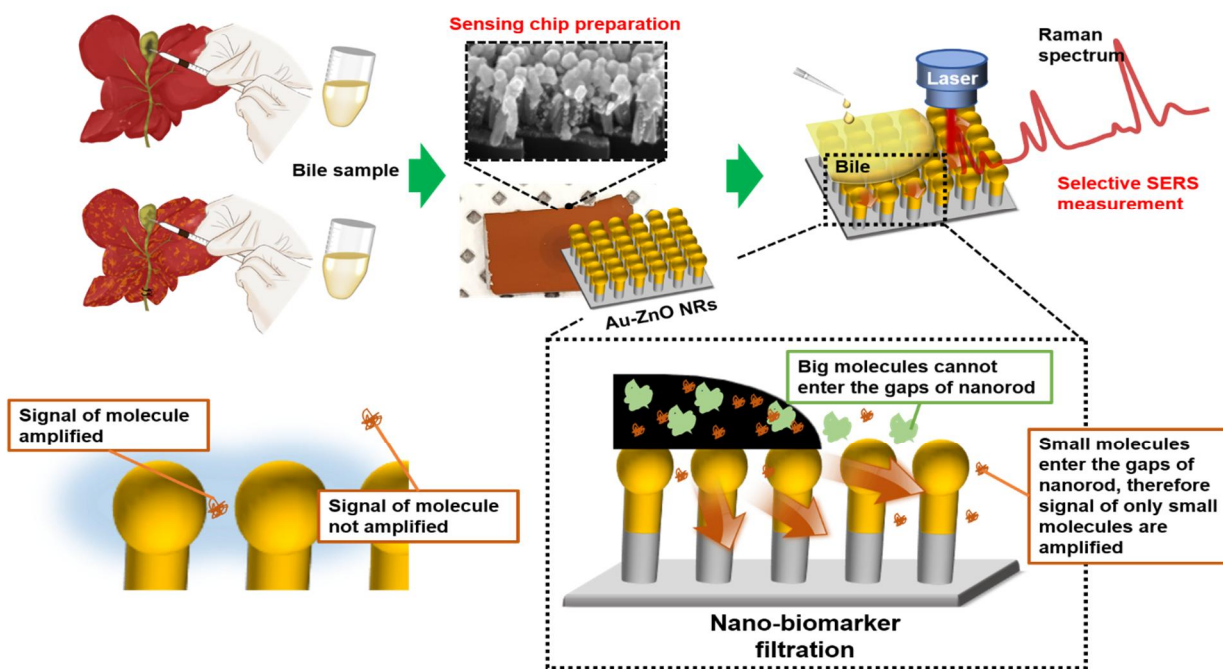


Figure 3. Outline of animal model development and nanometer biomarker Raman measurement

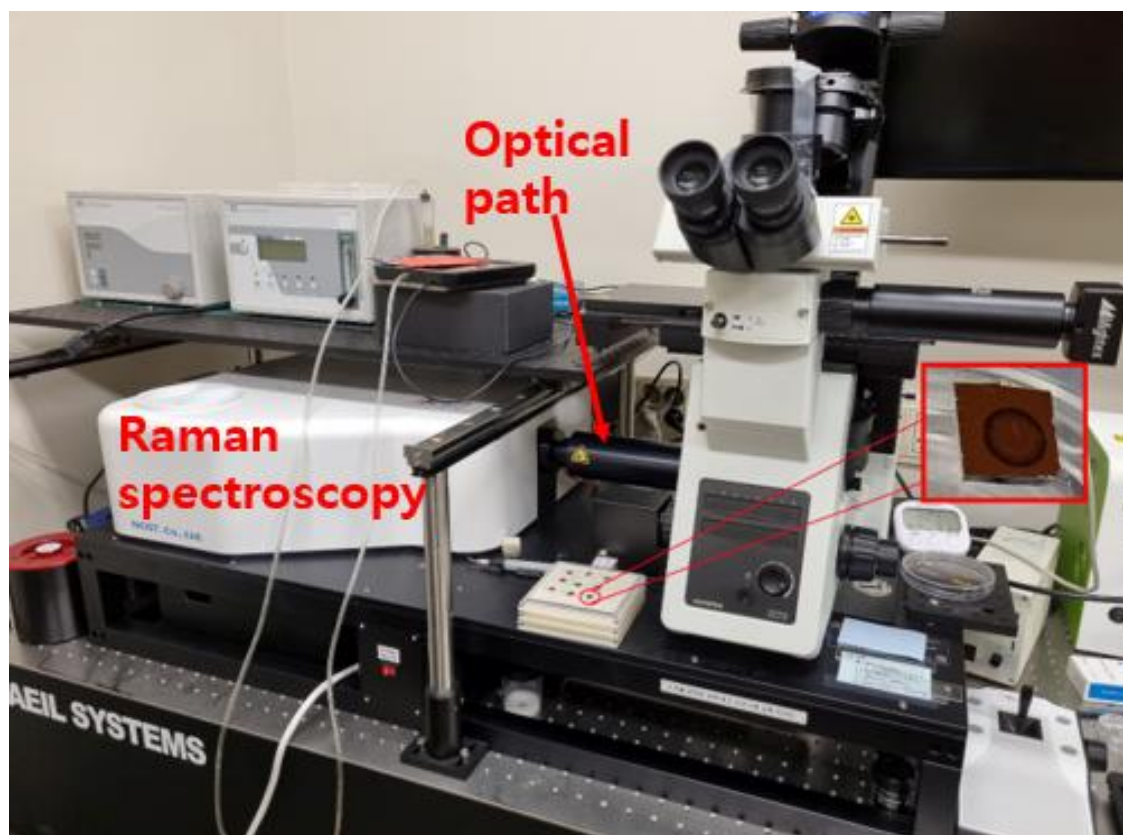


Figure 4. Microscope mounted Raman spectroscopy system and magnified ZnO nanorods

2. 동물 모델 프로토콜

2.1. 수술 전 준비 및 마취

모든 실험 절차는 미국 제도적 동물보호 및 이용위원회 (IACUC)에 따라 Asan Medical Center (AMC)의 동물연구시설에서 수행되었다 (No.202014323). 대조군, 담관 결찰 모델, 열 손상 모델 실험군 각각 10마리의 쥐가 실험에 이용되었다. 실험 동안 동물을 37°C의 온도에서 유지하였으며, 마취 유도를 위해 4 L/min의 유속으로 100% 산소에서 4vol% 이소플루란을 흡입하여 마우스를 마취하였다. 규칙적인 자발 호흡, 통증에 대한 반응이 없으면 마취 깊이로 충분하다 판단하였다. 마취를 유지하는 동안은 쥐의 코에서 약 1cm 떨어진 위치에서 100% 산소에 1.5-2.0vol% 이소플루란을 1L/min 속도로 공급하였다. 마우스의 복부 털을 전기 면도기로 면도하고 눈과 코를 연고를 사용하여 건조로부터 보호하였다. 복부 피부는 베타딘으로 닦아 소독하였다.

2.2. 담관 결찰 모델 / 담낭 열 소작 모델

마취된 쥐를 이용하여 xiphoid 바로 아래에서 외과용 가위로 피부와 근막을 동시에 절단하여 복부 양측으로 2-3cm 길이로 개방한 뒤 sternum을 봉합사로 고정하여 들어올려 수술 시야를 확보하였다. 복부의 양측은 봉합사로 고정한 뒤 양측으로 고정하여 수술 부위를 넓혔고, 간은 0.9% NaCl로 젖은 면봉으로 들어 올려 간의 바닥이 잘 노출되어 hilum이 명확하게 보이게 하였다 (Figure 5, 6). 담관을 더 잘 노출시키기 위해, 소장은 젖은 면봉을 사용해 조심스럽게 꼬리쪽으로 움직여주었다. 미세 forcep을 사용하여 간문맥과 간동맥에서 담관을 분리한 뒤, 5-0 silk 봉합사를 담관 주위에 놓고서 담관을 매듭으로 고정하였고 동일한 방식으로 두 번째 결찰을 첫 번째 결찰 위쪽으로 시행하였다. 결찰 사이의 중간의 담관은 절제하지 않는데, 이는 담관 결찰이 정확히 고정되지 않아 담즙이 누출되어 복막염이 발생할 수 있는 가능성을 없애기 위함이다 (Figure 7).

담낭 열 소작 모델 또한 담관 결찰 모델과 같은 방식으로 간을 노출 시킨 뒤, 젖은 면봉으로 간을 밀어 담낭을 노출하고 고온-소작법으로 손상을 주었다 (Change A-Tip, Bovie, USA) (Figure 8).



Figure 5. Anesthesia, laparotomy and preparing of experiment

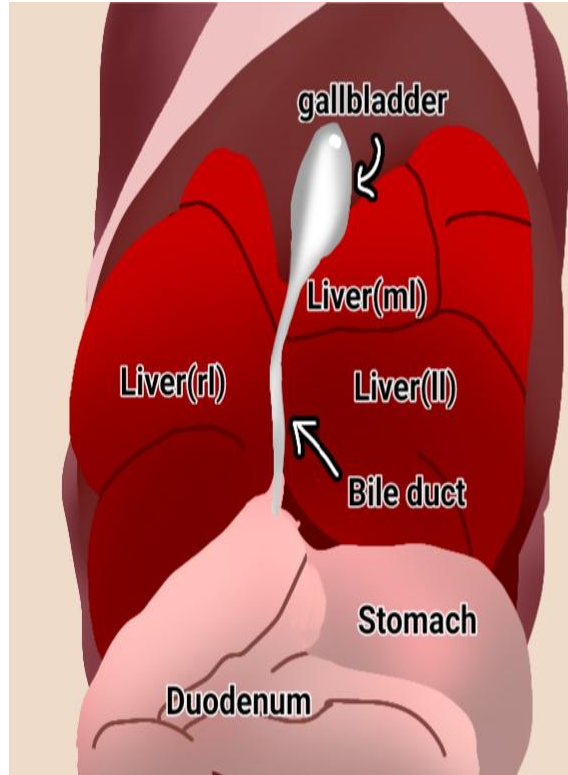


Figure 6. Anatomy drawing of mouse

(a)

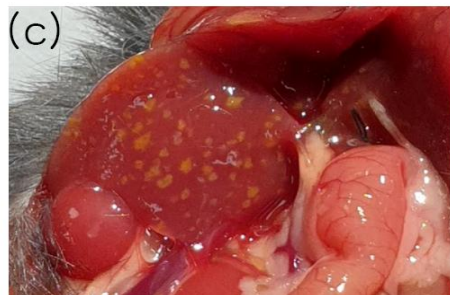
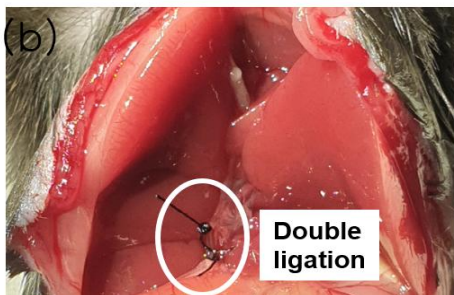
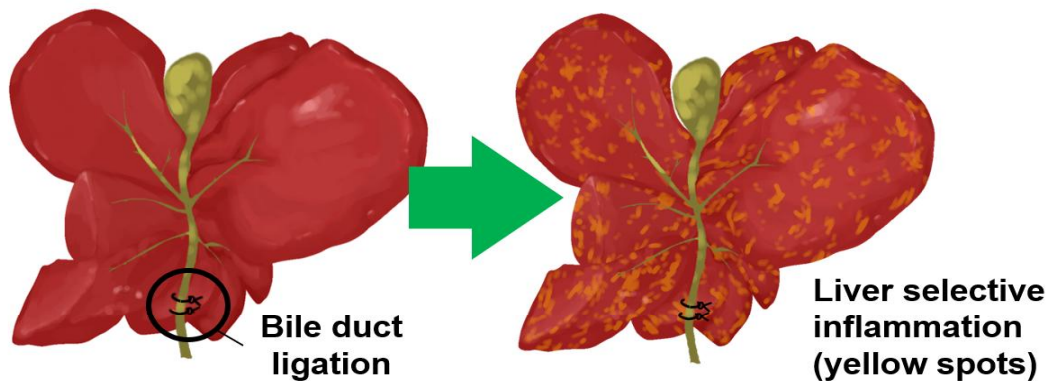


Figure 7. Bile duct ligation model (a) sketch of a double ligated bile duct (b) knot of bile duct double ligated with 5-0 silk (c) changed liver 1 week after bile duct ligation

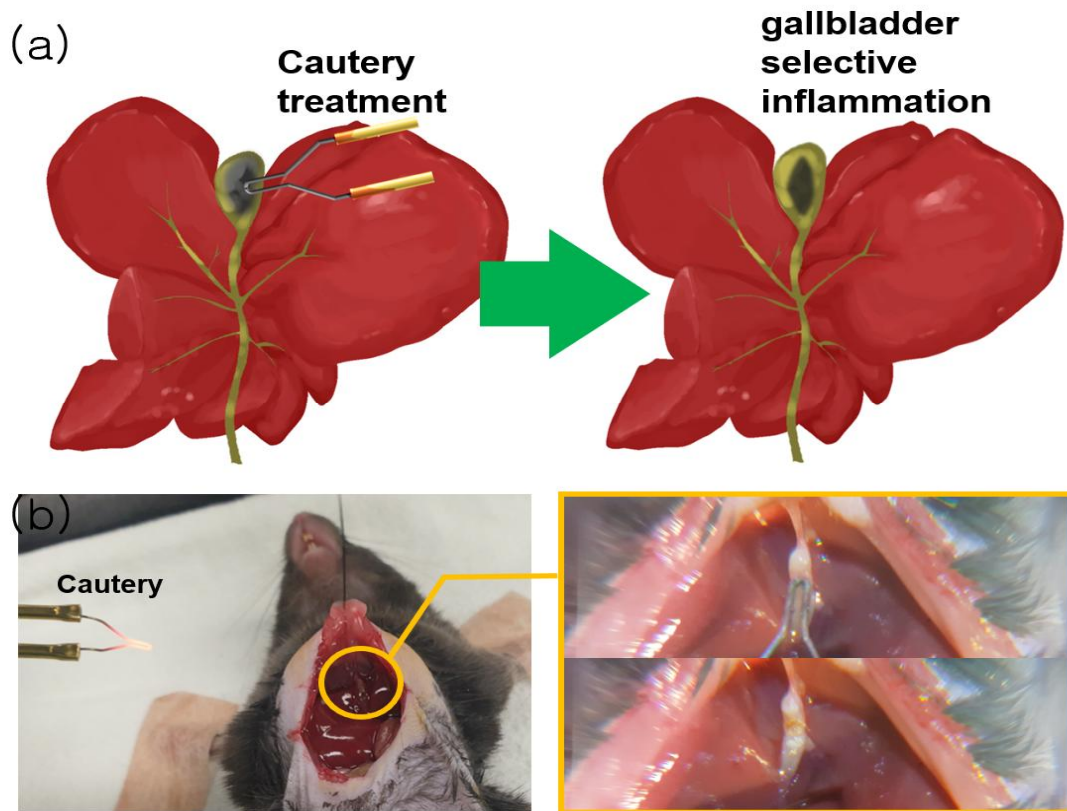


Figure 8. Gallbladder cauterization model (a) sketch of thermal cauterization (b) cauterization using a thermal cauterizer

2.3. 수술 후 치료 및 추적 관찰

수술 후 정기적으로 동물을 모니터링하고 비정상적인 행동은 복막염, 패혈증과 같은 합병증을 의미하였다. 채혈을 동물 모델에 조작을 시행하기 전과 담관 결찰 7일 뒤, 열 소작 처리 4일 뒤 채혈 및 실험실 검사를 시행하였다. 마취된 쥐의 하대정맥에서 전혈, 담즙 및 간의 검체를 채취하였다 (Figure 9). 채취한 혈액은 24 °C에서 30분 동안 응고시키고, 4 °C에서 2,500 x g 속도로 20분 동안 원심분리 하였다. 응고된 세포에서 혈청을 분리하기 위해 투명한 상부층을 새로운 튜브로 옮겼다. 혈청 AST, ALT은 자동화 분석기 (Hitachi 7180, Tokyo, Japan)을 사용하여 검출하였다.

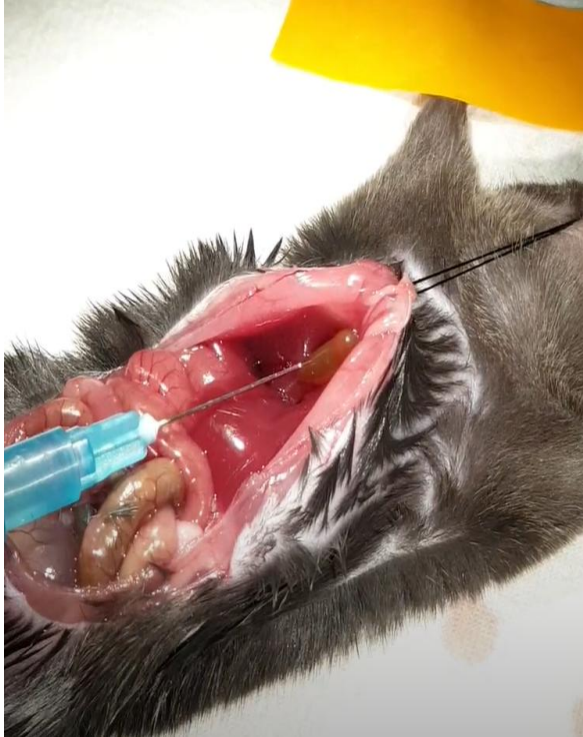


Figure 9. Sampling process of bile

3. 웨스턴 블롯

염증성 생체 지표를 분리 및 식별하기 위해 웨스턴 블롯 기술을 이용하였다. 이 기술에서 단백질 혼합물은 겔 전기 영동을 통해 분자량에 따라 유형별로 분리되며, 각 단백질에 대한 밴드를 생성하는 막으로 이동한다. 그런 다음 형성된 막은 실험에서 찾고자 하는 단백질에 특이적인 표지 항체와 함께 배양하여 채취한 복잡한 단백질 혼합물에서 특정 단백질을 식별할 수 있다³². 우리는 RIPA 완충액 (Cat#89900, Thermo Fisher Scientific, US)에서 간 조직을 균질화하여 단백질 용해물을 얻었다. 약 15 μ g의 간 조직 단백질을 15% 폴리아크릴아미드 겔 전기영동으로 분리하고 다음 단계를 위해 니트로셀룰로스 막으로 이동시켰다. 막을 Tris-buffered saline-Tween-20에서 5% 소 혈청 알부민 (Cat#82-100-6, Millipore Corporation, USA)으로 차단한 다음 1차 항체와 함께 배양하였다. 리포칼린-2 (Cat#ab63929, Abcam, UK)와 비멘틴 (Cat#sc-6260, Santa Cruz Biotechnology, USA)의 수치를 관찰하였다. 단백질 신호는 향상된 화학발광 (ECL; Cat#NCL34095, Thermo Fisher

Scientific) 시스템으로 검출하였고 Luminograph II (Cat#WSE-6200, Atto, Japan)을 사용하여 확인하였다. 로딩 대조군을 위해 블롯을 세척하고 HRP 접합된 단일클론성 β -액틴 항체 (A3854; Sigma-Aldrich, USA)를 사용하여 액틴에 대해 재탐색하였다.

4. 조직학적 분석

각 그룹의 간 및 담낭 조직을 4% 파라포름알데히드 (pH 7.4; Sigma-Aldrich)에 고정하고 파라핀 블록에 포매하였다. 파라핀 블록은 4 μ m 두께 슬라이드로 분할하고, 그 단면을 탈파라핀화, 재수화, hematoxylin-eosin (H&E)으로 염색하였다. 간 조직의 형태학적 변화는 광현미경 (BX53 microscope with DP27 camera; Olympus corporation, Tokyo, Japan)을 사용하여 관찰하였다. Sirius Red 염색을 위해 탈파라핀화된 슬라이드를 Picro-Sirius Red Solution (Cat#ab150681, Abcam)에서 배양하였다. Sirius Red 염색은 콜라겐에 특이적으로 염색되어 이식된 조직의 만성 및 섬유증의 정량적 지표로 사용될 수도 있으며 급성 부종 및 염증도 반영할 수가 있다³³.

5. 통계적 분석

데이터는 GraphPad Prism 5.0 소프트웨어 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)를 사용하여 분석하였다. 간 조직 손상 점수는 중앙값 및 범위로 나타냈다. 모든 데이터는 조건당 10개 샘플에 대한 평균 \pm 표준편차로 나타냈다. 면역탁본법 자료는 두가지 과정으로 얻었다. Bonferroni 보정을 사용한 통계적 일원 분산 분석 (ANOVA)을 이용하였고, P-값 <0.05 을 통계학적으로 유의하다고 정의하였다.

6. ZnO 나노구조체 기반 표면 증강 라만 센싱 (SERS) 준비 및 라만 측정

6.1. 표면 강화 라만 센싱 (SERS) 칩 준비

담즙에서 나노미터 지표를 필터링하고 라만 신호를 증폭하기 위해 수직으로 정렬된 gold-ZnO 나

노 로드 기반 표면 강화 라만 칩을 제작하였다. ZnO 나노 구조 지지체는 열수법으로 제조하였으며, 탈이온수에 10mM zinc nitrate hexahydrate과 0.9mL ammonium hydroxide Zinc nitrate hexahydrate (Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA)을 용해하여 용액을 제조하였다. 이 용액에 실리콘 웨이퍼 (LG SILTRON INC., KOREA)를 담그고 90°C에서 50분간 유지하여 ZnO 나노로드를 성장시켰다. 성장된 나노로드들은 길이 400-600 nm, 직경 50 nm로, 열증발기 (Alpha Plus Co., Korea)를 이용하여 이들 ZnO 나노구조체에 200 nm 두께의 Au를 코팅하였다. SERS 칩은 실리콘 위의 Au-ZnO 나노로드 시료를 0.5 × 0.5 mm 크기로 절단하여 제조하였다. 전자현미경을 통한 나노 구조체의 간극 확인 및 나노구조체 성장조건에 따른 간극 변화를 확인하였다.

6.2. 라만 측정 및 라만 시그널에 대한 분석

준비된 SERS 칩에 동물 모델에서 얻은 담즙을 0.5uL 한 방울 떨어뜨리고 30분 후 시료를 현미경 (IX-73, Olympus, Japan)에 부착된 라만 분광기시스템 (FEX-INV, NOST, Korea)을 사용하여 관찰하였다. 나노 생체 지표가 담즙에서 나노 구조체 내로 확산된 부위에 라만 785nm 파장 레이저를 조사하여 스펙트럼을 얻었다. 라만 스펙트럼은 450 ~ 2100 cm^{-1} 스펙트럼 영역에 대해 2.5 cm^{-1} 단위로 측정하였다. 각 검체의 정확한 데이터 분석을 위해서는 평활화 및 기준선 보정을 포함한 신호 처리가 필요했다. 주성분 분석 (PCA)을 사용하여 대조군, 담관 결찰 모델, 담낭 열 소작 모델 사이의 스펙트럼 차이를 평가하였다. PCA는 예측 변수의 수를 최소화하는 일반적인 다변량 통계 분석 기법이다. 이 연구에서 PCA는 라만 스펙트럼에서 유용한 정보를 그룹화하고 각각의 그룹간의 차이점을 강조하기 위해서 수행되었다. 5차 다항식 피팅은 신호 후 프로세스로 시행되었고, 데이터 그룹화 및 분석은 XLSTAT 2019 소프트웨어 (Microsoft, Redmond, WA, USA)를 사용하였다.

연구 결과

1. 담낭 손상에 대한 조직병리학적 결과

1.1. 조직학적 결과

간의 조직학적 검사에서 BDL 쥐 모델에서 조직 괴사와 간 실질 조직 내 림프 침윤이 나타났다 (Figure 10). 또한 간 손상과 관련된 혈청 지표인 총 빌리루빈, 아스파르트산 아미노전이 효소 (aspartate aminotransferase, AST), 알라닌 아미노전이 효소 (alanine aminotransferase, ALT)가 유의하게 상승하였다 (Figure 11). 간 조직에서 세포 사멸을 나타내는 단백질인 lipocalin-2과 콜라겐 I형을 안정화시키고 간에서 염증 관련 조직학적 변화를 유발하는 vimentin 역시 크게 상승하였다. 그러나 담장 소작에서는 간 조직 손상과 관련된 지표는 정상과 다르지 않았다 (Figure 12).

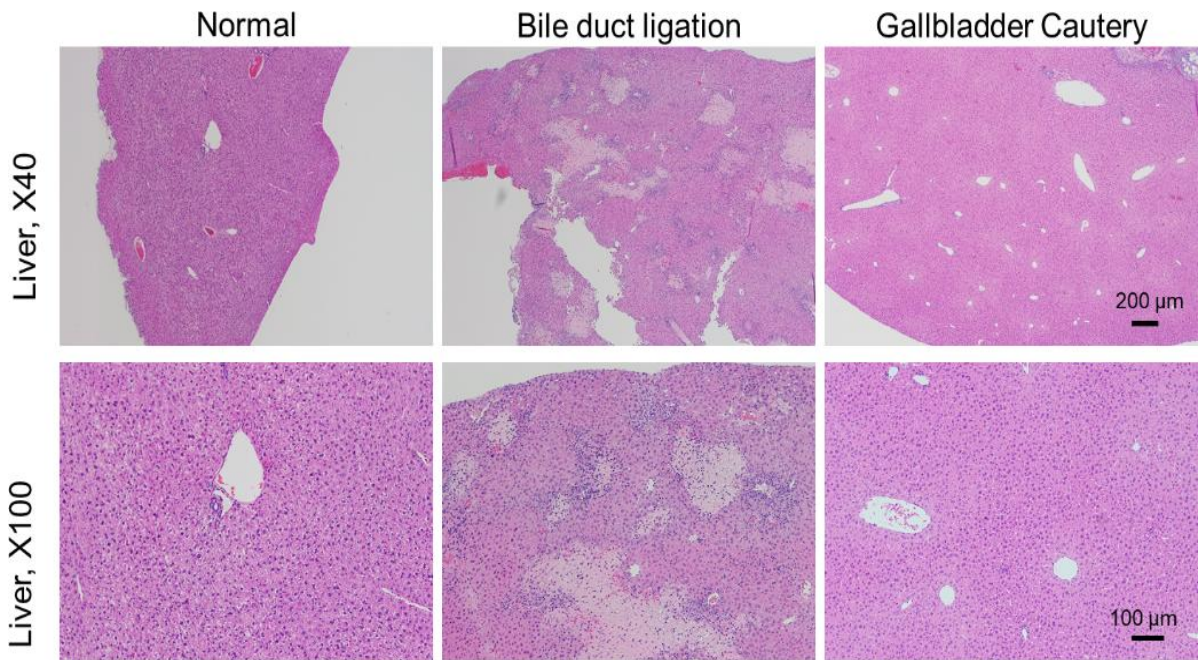


Figure 10. Evaluation of liver damage and liver function impairment. (a) Hematoxylin and Eosin (H&E) staining result of liver tissues from Normal, Bile duct ligation (BDL), and Gallbladder Cautery (Cautery) observed under $\times 40$ or $\times 100$ magnification. Scale bar, $200\mu\text{m}$ and $100\mu\text{m}$ for each magnification

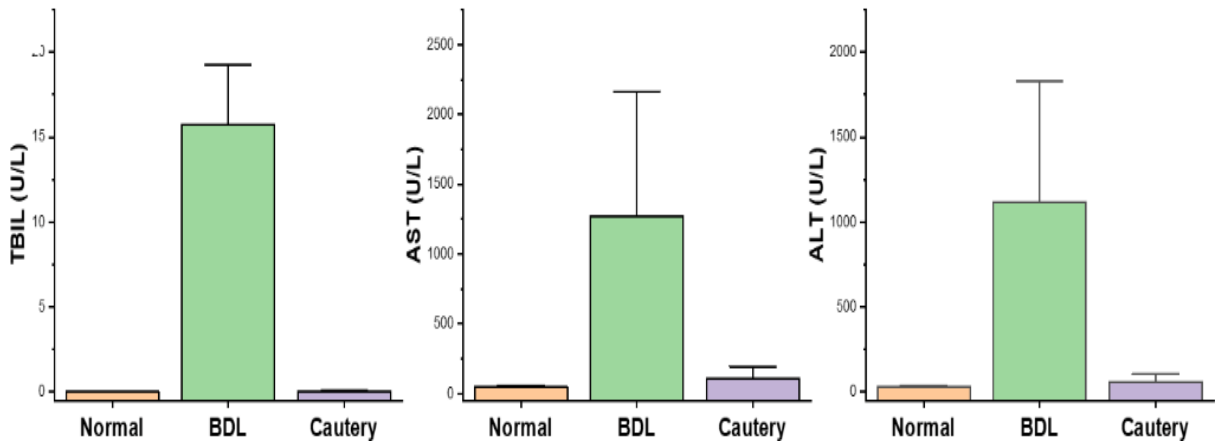


Figure 11. Total bilirubin (U/L), AST (U/L), and ALT (U/L) levels were measured in the serum of each group

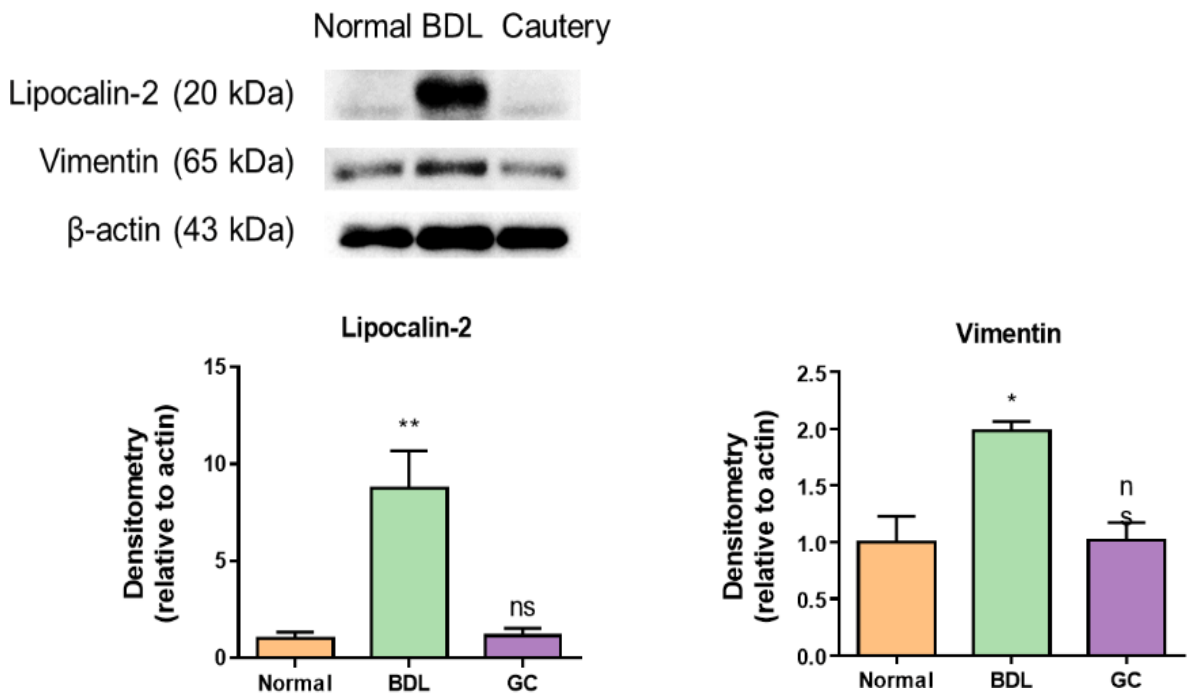


Figure 12. Liver damage-related protein expression in Normal, BDL, and Cautery group with relative density. All expressions are normalized to β -actin and compared to Normal group. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ns, not significant

1.2. 병리학적 결과

담낭 결찰 (BDL) 모델에서 대부분의 상피는 손상되지 않은 반면 점막 주름은 확장되어 있었다. 담낭 소작 모델에서는 상피가 부분적으로 손실되었다. H/E 염색에서는 정상 및 BDL 내부 상피 세포

가 닫힌 상태로 유지되지만 담낭 소작에서는 며칠이 지나도 열 손상 부위의 내부 상피 세포가 열린 상태를 유지한다. BDL에서는 내부 주름이 사라지는 정도까지 담낭에 인장 변형이 가해지지만 내부 상피 세포는 닫힌 상태로 유지된다. Picro Sirius Red 염색으로 콜라겐 결합 조직 염색에 대한 추가 조사는 정상 및 BDL 모델에서 콜라겐 결합 조직층을 둘러싸고 있는 상피를 확인할 수 있었다. 그러나 담낭 소작에서는 콜라겐층이 내강에 완전히 노출되어 있었다 (Figure 13).

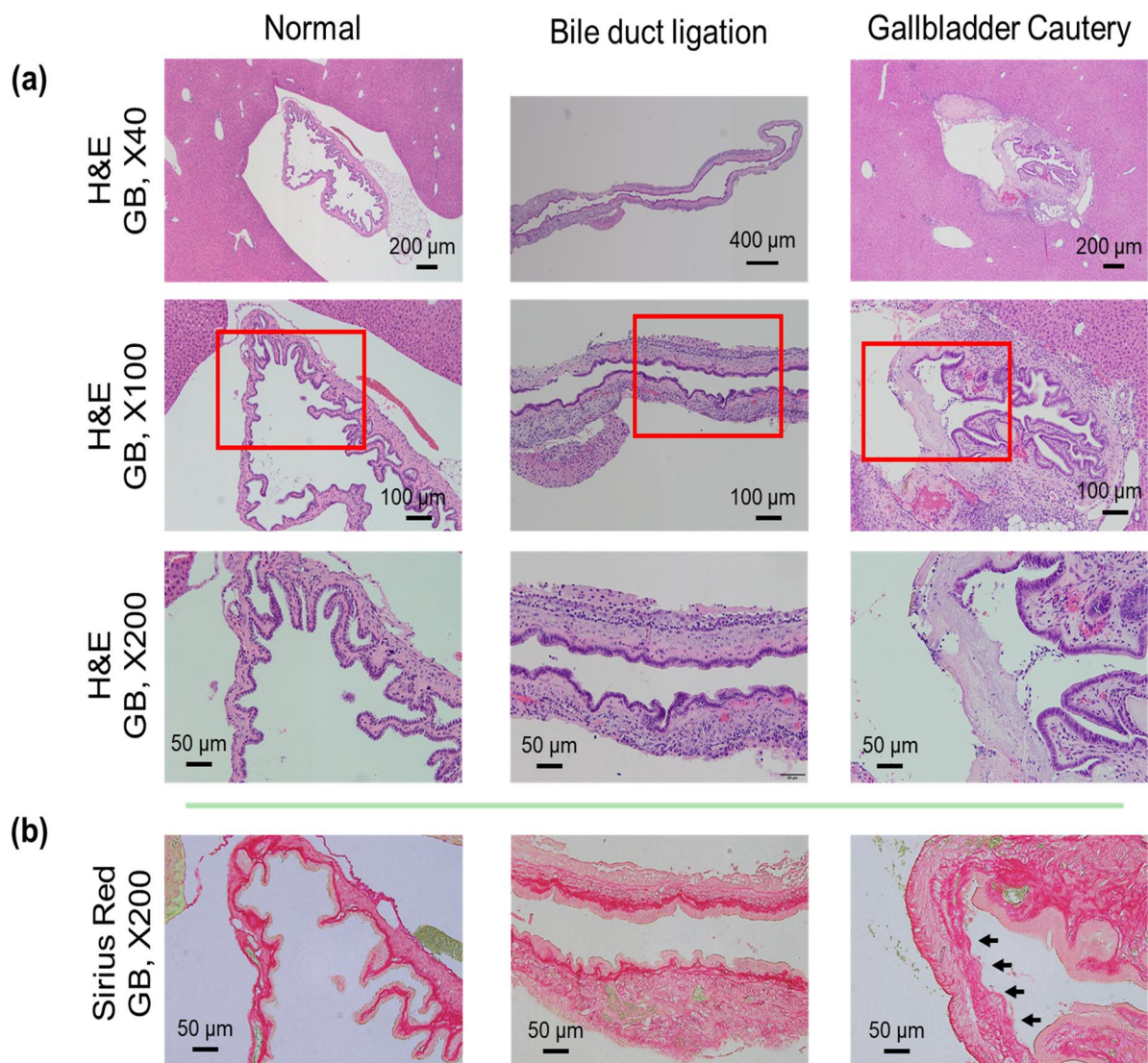


Figure 13. Gallbladder damage evaluation (a) Hematoxylin and Eosin (H&E) staining result of the gallbladder and nearby liver tissue in Normal, Bile duct ligation (BDL), and Gallbladder cautery (Cautery) group observed under $\times 40$, $\times 100$, and $\times 200$ magnification with a scale bar (b) Picro-Sirius Red staining result of the gallbladder in Normal, BDL, and Cautery group under $\times 200$ magnification.

A serial section of the same sample used for H&E staining was stained and observed. Black arrows indicate damaged inner epithelium of the gallbladder

2. 라만 스펙트럼을 통한 신호 분석

나노 생체지표 검출을 위한 Au-ZnO 기반 SERS 나노칩에 떨어뜨린 담즙에서 구형 방향으로 확산된 영역은 기본 영역보다 더 어둡게 보인다. 이 영역은 나노미터 생체지표가 나노 다공성 영역으로 확산된 결과이며, 레이저 전면 셔터를 열어 빔 스팟이 이 영역에 위치하는 것을 확인한 후 라만 분광 측정을 수행하였다. 정상, BDL 및 담낭 열 손상 모델의 라만 신호는 Figure 14와 같이 그래프로 나타냈다. 평균 스펙트럼은 실선으로 표시되고 표준 편차는 음영으로 표시하였다. 정상 및 BDL의 경우 특별한 피크가 없었거나 매우 작은 피크를 보였지만, 담낭 소작의 담즙의 검사에서는 현저한 피크가 나타났다. 주요 피크는 tryptophan 881 cm^{-1} ^{34,35}, glucose 912 cm^{-1} ^{35,36}, phenylalanine 1002 cm^{-1} ^{34,37}, 1033 cm^{-1} ^{34,38}, 1605 cm^{-1} ^{35,38}, tyrosine 1163 cm^{-1} ^{34,35}, amide III 1242 cm^{-1} ^{35,39}, nucleic acid 1374 cm^{-1} ^{38,40} 이다. 각 주요 피크의 할당과 그 참조는 Table 1과 같다. 특히 콜라겐 관련 피크는 $1002, 1033, 1163, 1242\text{ cm}^{-1}$ 에서 볼 수 있었다.

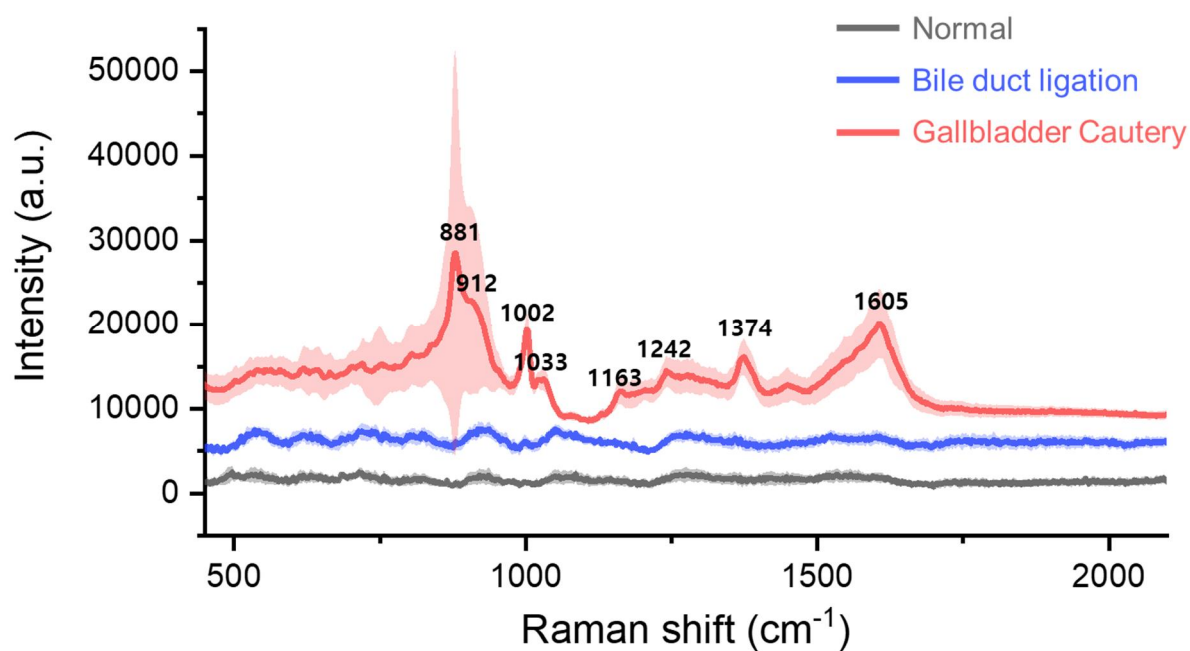


Figure 14. Averaged Raman spectra in normal (black line), BDL (blue line) and gallbladder cauterized (red line) animal models. The standard deviation in each Raman spectrum is the smear color, and the value for the main peak is expressed numerically.

Table 1. Assignment of Raman peak in GB cautey sample

Peak (cm ⁻¹)	Assignment	Ref.
881	Tryptophan	34, 35
912	Glucose	35, 36
1002	Phenylalanine (collagen assignment)	34, 37
1033	Phenylalanine (collagen assignment)	34, 38
1163	Tyrosine (collagen type I)	34, 35
1242	Amide III of collagen	35, 39
1374	Nucleic acid	38, 40
1605	Phenylalanine, tyrosine	35, 38

3. 주요 성분 통계학적 분석 (PCA)

정상, BDL, GB 소작에 대한 라만 스펙트럼의 PCA 결과는 Figure 15에 나와 있으며, PC1, PC2, PC3의 변동성은 각각 60.9%, 22.2%, 3.4% 이다. Figure 15 (b)와 같이 PC1과 PC2 평면에서 열 소작으로 인한 손상을 구별하는 기준선이 잘 나타나있다. 반면에 정상과 BDL의 데이터 구분은 거의 없다.

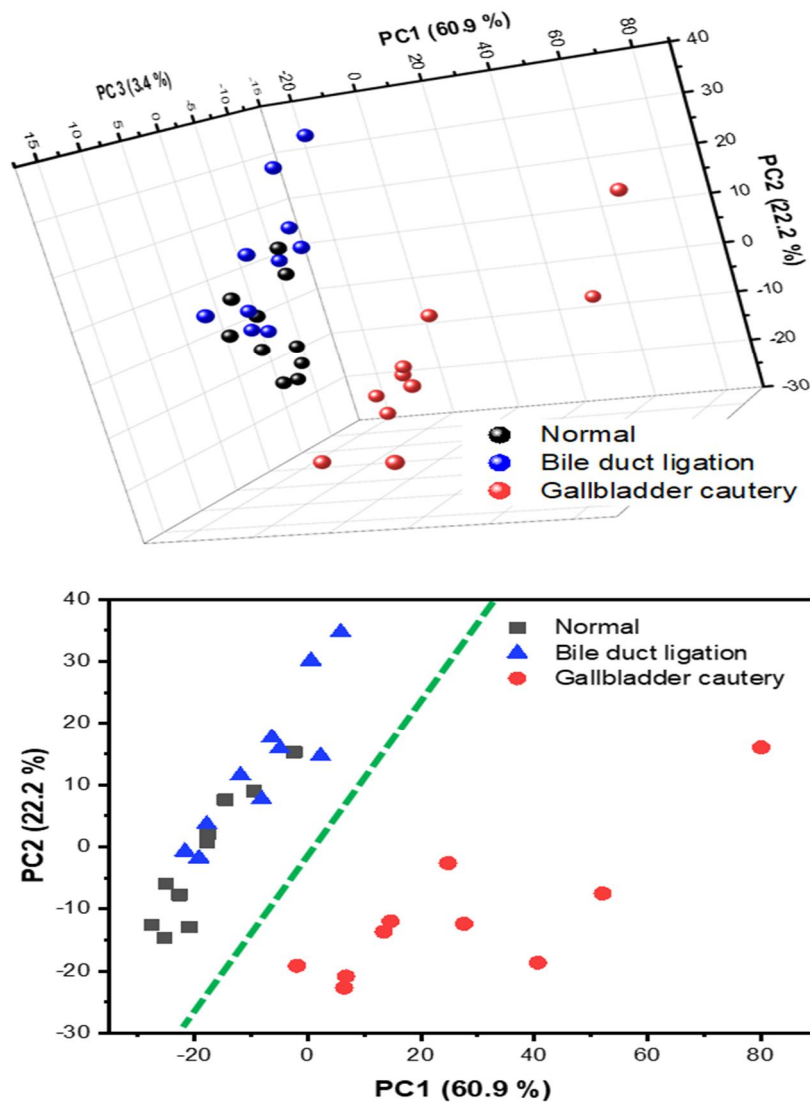


Figure 15. (a) Analysis results up to the third principal component of normal, BDL and gallbladder cauterization Raman results, (b) providing a baseline for distinguishing gallbladder cauterization results in the PC1 and PC2 planes (green dashed line)

고찰

간이식은 현재 국내에서 비교적 간 기능이 유지되는 간세포암 환자의 치료에도 적용되고 있지만, 대부분 급성간부전이나 만성간부전의 급성악화와 같은 Model for End-Stage Liver Disease (MELD) 점수가 높은 환자에게서 이루어지고 있다. MELD 점수가 높은 환자군은 수술 전후로 감염을 동반하고 있는 경우가 많고, 이식 초기 과도한 면역억제제 사용은 감염으로 인한 합병증을 일으키는 경우가 많아, 이식 성공율이 높지가 않다. 한편 이러한 환자군에서 감염을 우려하여 낮은 용량의 면역억제제를 처방할 경우 거부반응으로 인한 이식편 기능 부전이 올 수 있으며, 반대로 이와 다른 이식편 기능 부전의 원인이 될 수 있는 감염 및 담도합병증이 있는 환자에게 상대적으로 높은 용량의 면역억제제를 사용할 경우 패혈증으로 환자를 잃은 가능성이 매우 높다.

담도 문합 주위의 담즙 누출이나 담도 협착 등의 담도계 합병증은 최대 34% 발생률과 5% 사망률로 보고되며, 간이식시 흔한 합병증이다⁴¹⁻⁴⁶. 담관 문합의 부위의 허혈성 담도 병변과 담관 협착으로 담즙 누출이 있을 경우, 수술 시 삽입한 배액관을 통해 적절하게 배액이 된다면 담즙 누출은 담관의 상처 회복과 함께 멈추게 된다. 담도협착증의 경우 황달이나 가려움증, 간 기능부전을 유발할 수 있으므로 담도에 스텐트를 삽입하여 좁아진 협착 부위를 넓혀 해결해야 한다⁴⁷⁻⁴⁹. 수술 시 담도와 혈관의 출혈을 조절하기 위해 전기 소작기를 사용하는데, 이는 열 손상을 일으켜 염증을 유발하고 이는 간 이식 후 초기 담즙 유출을 유발할 수 있다. 대부분의 담즙 누출은 장기 이식 후 1-3개월 이내 초기에 발생하며, 간 이식 후 담도 합병증의 1-25% 정도로 적지 않은 비중을 차지하고 있다^{50,51}. 또한 간이식은 수술 후 장기간 면역억제제를 복용하게 되는데⁵², 전기 소작기에 인한 손상과 같은 기술적인 문제는 이식 초기에 감염 위험을 높인다⁵³. 동물 모델에서 이러한 손상을 모방하기 위해 우리 연구에서는 담낭 열 소작 모델을 만들었다.

담즙의 배액은 일반적으로 간 외부로 통해 담도에 배액관을 설치하여 시행하게 된다. 환자는 수술 후 담즙배액관으로 인한 감염의 위험에 노출되기 때문에 담도 손상이 회복된 것이 확인되는 즉시 배액관을 제거할 수 있도록 담도 회복을 추적 관찰하는 것이 중요하다. 합병증으로 인한 간

기능 부전을 예방하기 위해 일반적으로 조직의 생검을 통해 기존 장기 및 조직의 병리학적 염증을 진단한다⁵⁴. 그러나 조직 생검은 침습적이며 생검 검체가 대표성을 보장하지 않는다. 또한 혈액에서 IL-2, TNF- α , IL-18 등의 염증성 사이토카인을 측정하여 간 및 담도 관련 염증의 발생 여부를 알 수 있지만⁵⁵, 염증 기관을 특정하기는 어렵다. 따라서 담관 손상 유무를 식별할 수 있는 새롭고 저침습적이며 정밀한 생체 지표를 찾는 것이 필요하다. 생체 내 표적이 될 수 있는 생체 지표는 세포 (~수십 μm), 적혈구 (~8 μm), 박테리아 (~1 μm), 바이러스 (~400nm), 엑소좀 (크기에 따라 수 nm ~ 수십 nm), 단백질, 또는 소량의 혈액과 소변을 포함한 체액에 분포할 가능성이 있는 비세포 핵산 등의 작은 분자이다⁵⁶⁻⁵⁸. 실제로 생물학적 부산물에 다양한 생체 지표가 섞여 있는 경우가 많기 때문에 나노미터 생체 지표를 선택적으로 검출해낼 수 있다면 잡음이 적은 결과를 얻을 수 있고 정확도도 또한 향상시킬 수 있다⁵⁹. 따라서 이러한 요인들을 빠르게 검출할 수 있는 장치의 개발이 요구된다.

현재 이식 후 간 기능의 이상을 보이는 경우, 원인을 감별할 수 있는 여러 영상 검사 (컴퓨터 단층 촬영, 자기공명 담체관 조영술 등) 및 혈액 검사가 존재하기는 하나 민감도와 특이도가 낮으며, 비교적 민감도와 특이도가 높은 검사로는 침습적 검사 (내시경적 역행성 담체관 조영술, 간 조직 검사)가 대부분이다. 이식 후 간 기능의 이상을 보이는 환자의 경우, 응고 기능의 이상으로 높은 출혈성 경향을 보이는 경우가 대다수이며, 이는 침습적 검사 시행 후 출혈과 관련되어 이식편의 소실 혹은 환자의 사망으로 이어지기도 한다. 이러한 상황에서 거부반응과 다른 이식편 기능 부전의 원인이 될 수 있는 감염 및 담도합병증을 비침습적으로 높은 민감도와 특이도를 가지고 진단할 수 있는 방법이 있다면 안전하게 진단하여 치료에 적용 가능할 수가 있다.

최근 나노 분자를 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 고감도 바이오센서에 대한 수요가 꾸준히 증가하고 있다. 바이오 분광기는 생물학적 시료를 광학적인 기술인 분광, 자외선, 적외선 등을 통해 분석하고 측정하며, 세포 내의 단일 분자에 대한 위치를 확인하고 그 변화를 관찰할 수 있다. 따라서 바이오 분광기는 개발되고 있는 신약이나 새로운 질병을 진단하는 것에 있어 중요한 장비로서, 전 세계적인 노령화에 따른 의료 산업 규모의 증가로 그 중요성이 더욱 증가되고

있다. 이러한 수요를 해결할 수 있는 방법 중 하나가 생체 지표에 입사한 레이저의 빛 입자의 비탄성 산란을 측정하는 분광 분석기인 라만 분광기 (Raman spectroscopy system)이다. 유기 및 무기 분자에는 고유한 라만 이동 스펙트럼이 있으므로 라만 분석은 검체에서 화학 물질을 검출하는데 유용한 측정 방법이다. 라만 분광기 기술은 좁은 신호대역폭으로 수십 개 이상의 다중 검출 기능을 갖는 장점이 있어 생물과 같은 복잡한 유기체의 질병 진단을 위한 지문 기술로서 가장 큰 응용 가능성을 가지고 있다⁶⁰⁻⁶². 최근에는 나노 구조를 기반으로 한 표면강화라만법 (surface enhancement Raman spectroscopy, SERS)으로 단일 분자 규모의 라만 측정이 가능하다는 보고도 있다^{14,63}. 표준 라만 분광법과 비교해 SERS는 Au/ZnO 나노어레이 사이의 나노미터 간격으로 형성되는 8-10배의 신호 향상으로 조기 탐지를 가능하게 한다. 따라서 나노미터 크기의 생체 지표를 선택하고 표적화 할 수 있다면 질환의 조기 진단을 위해 SERS 기술을 적용시킬 수 있다.

담즙 정체는 발생률이 최대 34%로 간 이식에서 흔하게 있는 결과이지만⁴¹⁻⁴⁶, 심각한 담즙 정체는 진행성 간세포 및 상피세포 손상으로 인한 비가역적 간 손상과 관련되어 재이식이 필요할 수 있다⁶⁴. BDL 동물 모델은 담즙 흐름의 감소 또는 폐쇄를 나타내는 담즙 정체를 시뮬레이션하는 일반적인 방법이다. 이 프로토콜에서 인간의 담즙 정체로 인한 간 경변에서 관찰된 것과 유사하게 쥐에서 간 경변을 유도할 수 있으며, 수술 절차가 비교적 빠르게 적용 가능하며 동물의 생존율이 95% 이상으로 높다⁶⁵. BDL 모델에서는 담낭에서 십이지장으로 담즙을 분비하는 관이 막히고 담즙이 간으로 역류하면서 담즙 정체가 발생한다.

앞선 연구에 따르면 BDL 이후 1주일 후 급성 담즙 정체로 인한 간 손상에 대한 반응으로 간세포 증식을 잘 관찰 할 수 있으며, 이 시기에 콜라겐 침착 단계에 관여하는 림프구의 증식이 나타난다⁶⁶. 우리 연구에서도 이는 병리학적 결과에서 잘 보여준다. H/E 염색에서는 정상 및 BDL 모델의 내부 상피 세포가 닫힌 상태로 유지되지만 담낭 열 손상 모델에서는 며칠이 지나도 열 손상 부위의 내부 상피 세포가 열린 상태를 유지한다. BDL에서는 내부 주름이 사라지는 정도까지 담낭에 인장 변형이 가해지지만 내부 상피 세포는 닫힌 상태로 유지된다. 정상에 비해 BDL 쥐 모델의 담낭 외막 (또는 장막)에서 더 많은 림프구가 관찰되었음에도 담낭의 염증성 변화는 담즙 성분에 반

영되지 않았다. 즉, 담낭 상피가 손상되지 않은 경우에 담낭과 간의 염증성 변화는 담즙의 SERS 측정 가능 함량에 영향을 미치지 않는다. 따라서 내부 상피세포의 존재는 라만 신호에 기여하는 나노미터 지표의 방출을 결정하는 주요 요인이다. 이러한 접근 방식은 Sirius Red 염색 결과로도 확인되었으며, Figure 13와 같이 콜라겐이 많이 분포되어 있는 부위에 Sirius Red가 짙게 염색되어 있음을 알 수 있다. 정상 및 BDL의 경우 고밀도 콜라겐이 내부 상피세포에 의해 폐쇄되지만 담낭 소작의 경우 콜라겐 영역이 담낭의 내강에 노출된다. 따라서 열 손상으로 인한 내부 상피의 손상으로 인해 콜라겐 관련 생체 지표가 담즙으로 유입될 수 있는 것으로 추정된다. 또한 열 손상은 괴사를 유발할 수 있으며, 이는 DNA 누출과 함께 세포막과 핵산 외피의 파열을 유발한다⁶⁷. 괴사 세포가 사멸되는 동안 세포 구성 물질이 근처의 체액으로 누출될 수 있는데, 담낭의 경우 담즙이 이에 해당된다.

담즙 내 라만 신호 결과로부터 간이식 시 발생하는 손상의 원인에 따른 모니터링이 가능함을 알 수 있었다. 담관 협착으로 인한 간 손상은 혈액으로 방출되는 양으로 Total bilirubin, AST, ALT와 같은 생체 지표를 모니터링하고, 열 소작에 의한 담낭 내벽 (담관) 손상은 담관 내 나노-생체 지표로 모니터링 하는 것을 나타낸다.

BDL 모델을 통한 간손상에 따른 라만 스펙트럼의 차이를 확인할 수 없었지만 나노 구조를 기반으로 한 표면강화라만법은 아직 초기 단계이며 뚜렷한 결과를 얻기 위해서 다양한 매개변수 (SERS 기질, 이온 함량, 레이저 파장 등)에 대해 추가적인 연구가 시행되어야 할 것이다. 또한 이 연구의 결과가 강력하고 재현 가능하도록 하기 위해 더 많은 개체수 및 대형 동물 모델을 통한 실험을 추가적으로 시행할 예정이다.

결론

쥐 BDL 모델을 이용하여 담관 협착으로 인한 간 손상을 유도, 열 소작을 통해 담낭 손상으로부터 담낭(담관)에 대한 선택적 손상을 위한 샘플을 제조하여 그에 따른 라만 스펙트럼을 얻었고, 담낭 열 손상 모델에서만 의미있는 신호가 나오는 것을 확인하였다. SERS을 이용하여 전기 소작으로 인한 담관 손상을 빠르고 편리하게 감지할 수 있다면 이환율과 입원 기간을 줄이는데 도움이 될 수 있을 것이다. 또한 부가적 연구를 통해 담관층 손상을 유발하는 허혈, 재관류 손상으로 인한 문합 협착, 담즙종 등을 쉽고 빠르게 모니터링 할 수 있을 것으로 생각되며, 이는 추후 성공적인 간 이식 및 관리에 도움이 될 것이라 기대할 수 있다.

참고문헌

1. Raman CV, Krishnan KS. A new type of secondary radiation. *Nature* 1928;121(3048):501-502.
2. Kaur H. *Instrumental methods of chemical analysis*: Pragati Prakashan, 2010.
3. Jeanmaire DL, Van Duyne RP. Surface Raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode. *Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry* 1977;84(1):1-20.
4. Albrecht MG, Creighton JA. Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode. *Journal of the American Chemical Society* 1977;99(15):5215-5217.
5. Le Ru E, Etchegoin P. Rigorous justification of the $|E|^4$ enhancement factor in surface enhanced Raman spectroscopy. *Chemical Physics Letters* 2006;423(1-3):63-66.
6. Zhang J, Li X, Sun X, Li Y. Surface enhanced Raman scattering effects of silver colloids with different shapes. *The Journal of Physical Chemistry B* 2005;109(25):12544-12548.
7. Lim D-K, Jeon K-S, Hwang J-H, et al. Highly uniform and reproducible surface-enhanced Raman scattering from DNA-tailorable nanoparticles with 1-nm interior gap. *Nature nanotechnology* 2011;6(7):452-460.
8. Lee S, Lee SH, Paulson B, Lee J-C, Kim JK. Enhancement of local surface plasmon resonance (LSPR) effect by biocompatible metal clustering based on ZnO nanorods in Raman measurements. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2018;204:203-208.
9. Cialla D, März A, Böhme R, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): progress and trends. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2012;403(1):27-54.
10. Zeisel D, Deckert V, Zenobi R, Vo-Dinh T. Near-field surface-enhanced Raman spectroscopy of dye molecules adsorbed on silver island films. *Chemical Physics Letters* 1998;283(5-6):381-385.
11. Guerrini L, Alvarez-Puebla RA. Surface-enhanced Raman spectroscopy in cancer diagnosis, prognosis and monitoring. *Cancers* 2019;11(6):748.
12. Lee S, Kim JK. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) based on ZnO nanorods for biological applications. *Zinc Oxide Based Nano Materials and Devices*: IntechOpen; 2019.
13. Lane LA, Qian X, Nie S. SERS nanoparticles in medicine: from label-free detection to spectroscopic tagging. *Chemical reviews* 2015;115(19):10489-10529.
14. Etchegoin PG, Le Ru E. A perspective on single molecule SERS: current status and future challenges. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2008;10(40):6079-6089.
15. Barhoumi A, Zhang D, Tam F, Halas NJ. Surface-enhanced Raman spectroscopy of DNA. *Journal of the American Chemical Society* 2008;130(16):5523-5529.
16. Ni F, Sheng R, Cotton TM. Flow-injection analysis and real-time detection of RNA bases by

- surface-enhanced Raman spectroscopy. *Analytical chemistry* 1990;62(18):1958-1963.
17. Vo-Dinh T. Nanobiosensing using plasmonic nanoprobcs. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics* 2008;14(1):198-205.
 18. Chou I-H, Benford M, Beier HT, et al. Nanofluidic biosensing for β -amyloid detection using surface enhanced Raman spectroscopy. *Nano letters* 2008;8(6):1729-1735.
 19. Primera-Pedrozo OM, Jerez-Rozo JI, De La Cruz-Montoya E, Luna-Pineda T, Pacheco-Londono LC, Hernandez-Rivera SP. Nanotechnology-based detection of explosives and biological agents simulants. *IEEE Sensors Journal* 2008;8(6):963-973.
 20. Pearman WF, Fountain AW. Classification of chemical and biological warfare agent simulants by surface-enhanced Raman spectroscopy and multivariate statistical techniques. *Applied spectroscopy* 2006;60(4):356-365.
 21. Yan F, Vo-Dinh T. Surface-enhanced Raman scattering detection of chemical and biological agents using a portable Raman integrated tunable sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2007;121(1):61-66.
 22. Jarvis RM, Goodacre R. Characterisation and identification of bacteria using SERS. *Chemical Society Reviews* 2008;37(5):931-936.
 23. Shafer-Peltier KE, Haka AS, Fitzmaurice M, et al. Raman microspectroscopic model of human breast tissue: implications for breast cancer diagnosis in vivo. *Journal of Raman Spectroscopy* 2002;33(7):552-563.
 24. Schaeberle MD, Morris HR, II JFT, Treado PJ. Peer reviewed: Raman chemical imaging spectroscopy. *Analytical chemistry* 1999;71(5):175A-181A.
 25. van de Poll SW, Bakker Schut TC, van der Laarse A, Puppels GJ. In situ investigation of the chemical composition of ceroid in human atherosclerosis by Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy* 2002;33(7):544-551.
 26. Timlin JA, Carden A, Morris MD, Rajachar RM, Kohn DH. Raman spectroscopic imaging markers for fatigue-related microdamage in bovine bone. *Analytical chemistry* 2000;72(10):2229-2236.
 27. Wang ZL. Nanostructures of zinc oxide. *Materials today* 2004;7(6):26-33.
 28. Huang J, Chen F, Zhang Q, et al. 3D silver nanoparticles decorated zinc oxide/silicon heterostructured nanomace arrays as high-performance surface-enhanced Raman scattering substrates. *ACS applied materials & interfaces* 2015;7(10):5725-5735.
 29. He H, Li H, Xia W, et al. Electrophoretic fabrication of silver nanostructure/zinc oxide nanorod heterogeneous arrays with excellent SERS performance. *Journal of Materials Chemistry C* 2015;3(8):1724-1731.
 30. Lee Y, Lee J, Lee TK, et al. Particle-on-film gap plasmons on antireflective ZnO nanocone arrays for molecular-level surface-enhanced Raman scattering sensors. *ACS applied materials & interfaces* 2015;7(48):26421-26429.

31. Jue M, Lee S, Paulson B, et al. Optimization of ZnO nanorod-based surface enhanced Raman scattering substrates for bio-applications. *Nanomaterials* 2019;9(3):447.
32. Mahmood T, Yang P-C. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences* 2012;4(9):429.
33. Grimm PC, Nickerson P, Gough J, et al. Computerized image analysis of Sirius Red–stained renal allograft biopsies as a surrogate marker to predict long-term allograft function. *Journal of the American Society of Nephrology* 2003;14(6):1662-1668.
34. Cheng WT, Liu MT, Liu HN, Lin SY. Micro-Raman spectroscopy used to identify and grade human skin pilomatrixoma. *Microsc Res Techniq* 2005;68(2):75-79. (In English). DOI: 10.1002/jemt.20229.
35. Movasaghi Z, Rehman S, Rehman IU. Raman spectroscopy of biological tissues. *Appl Spectrosc Rev* 2007;42(5):493-541. (In English). DOI: 10.1080/05704920701551530.
36. Krafft C, Neudert L, Simat T, Salzer R. Near infrared Raman spectra of human brain lipids. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2005;61(7):1529-35. DOI: 10.1016/j.saa.2004.11.017.
37. Frank CJ, Mccreery RL, Redd DCB. Raman-Spectroscopy of Normal and Diseased Human Breast Tissues. *Anal Chem* 1995;67(5):777-783. (In English). DOI: DOI 10.1021/ac00101a001.
38. Chan JW, Taylor DS, Zwerdling T, Lane SM, Ihara K, Huser T. Micro-Raman spectroscopy detects individual neoplastic and normal hematopoietic cells. *Biophys J* 2006;90(2):648-656. (In English). DOI: 10.1529/biophysj.105.066761.
39. Pezzotti G, Boffelli M, Miyamori D, et al. Raman spectroscopy of human skin: looking for a quantitative algorithm to reliably estimate human age. *J Biomed Opt* 2015;20(6) (In English). DOI: Artn 06500810.1117/1.Jbo.20.6.065008.
40. Dovbeshko GI, Gridina NY, Kruglova EB, Pashchuk OP. FTIR spectroscopy studies of nucleic acid damage. *Talanta* 2000;53(1):233-246. (In English). DOI: Doi 10.1016/S0039-9140(00)00462-8.
41. Kochhar G, Parungao JM, Hanouneh IA, Parsi MA. Biliary complications following liver transplantation. *World Journal of Gastroenterology: WJG* 2013;19(19):2841.
42. Fang C, Yan S, Zheng S. Bile leakage after liver transplantation. *Open Medicine* 2017;12(1):424-429.
43. Li S, Stratta RJ, Langnas AN, Wood RP, Marujo W, Shaw Jr BW. Diffuse biliary tract injury after orthotopic liver transplantation. *The American journal of surgery* 1992;164(5):536-540.
44. Gholson CF, Zibari G, McDonald JC. Endoscopic diagnosis and management of biliary complications following orthotopic liver transplantation. *Digestive diseases and sciences* 1996;41(6):1045-1053.
45. Greif F, Bronsther OL, Van Thiel DH, et al. The incidence, timing, and management of biliary tract complications after orthotopic liver transplantation. *Annals of surgery* 1994;219(1):40.

46. Hintze R, Abou-Rebyeh H, Adler A, et al. Endoscopic therapy of ischemia-type biliary lesions in patients following orthotopic liver transplantation. *Zeitschrift fur Gastroenterologie* 1999;37(1):13-20.
47. Chang JH, Lee I, Choi M-G, Han SW. Current diagnosis and treatment of benign biliary strictures after living donor liver transplantation. *World Journal of Gastroenterology* 2016;22(4):1593.
48. Rerknimitr R, Sherman S, Fogel EL, et al. Biliary tract complications after orthotopic liver transplantation with choledochocholedochostomy anastomosis: endoscopic findings and results of therapy. *Gastrointestinal endoscopy* 2002;55(2):224-231.
49. Thuluvath PJ, Atassi T, Lee J. An endoscopic approach to biliary complications following orthotopic liver transplantation. *Liver International* 2003;23(3):156-162.
50. Tung BY, Kimmey MB. Biliary complications of orthotopic liver transplantation. *Digestive Diseases* 1999;17(3):133-144.
51. Hampe T, Dogan A, Encke J, et al. Biliary complications after liver transplantation. *Clinical transplantation* 2006;20:93-96.
52. Best LM, Leung J, Freeman SC, et al. Induction immunosuppression in adults undergoing liver transplantation: a network meta-analysis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2020(1).
53. Moini M, Schilsky ML, Tichy EM. Review on immunosuppression in liver transplantation. *World journal of hepatology* 2015;7(10):1355.
54. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41(6):1313-1321.
55. Narayanaswamy B, Gonde C, Tredger JM, Hussain M, Vergani D, Davenport M. Serial circulating markers of inflammation in biliary atresia—evolution of the post-operative inflammatory process. *Hepatology* 2007;46(1):180-187.
56. Durand F, Francoz C, Asrani SK, et al. Acute kidney injury after liver transplantation. *Transplantation* 2018;102(10):1636-1649.
57. Citores MJ, Lucena JL, de la Fuente S, Cuervas-Mons V. Serum biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation. *World Journal of Hepatology* 2019;11(1):50.
58. Lewandowska L, Małyszko J, Matuszkiewicz-Rowińska J. Urinary and serum biomarkers for prediction of acute kidney injury in patients undergoing liver transplantation. *Annals of Transplantation* 2019;24:291.
59. Panikar SS, Banu N, Haramati J, et al. Anti-fouling SERS-based immunosensor for point-of-care detection of the B7–H6 tumor biomarker in cervical cancer patient serum. *Analytica Chimica Acta* 2020;1138:110-122.
60. Keren S, Zavaleta C, Cheng Zd, de La Zerda A, Gheysens O, Gambhir S. Noninvasive

- molecular imaging of small living subjects using Raman spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008;105(15):5844-5849.
61. Qian X, Peng X-H, Ansari DO, et al. In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags. *Nature biotechnology* 2008;26(1):83-90.
 62. Zavaleta C, De La Zerda A, Liu Z, et al. Noninvasive Raman spectroscopy in living mice for evaluation of tumor targeting with carbon nanotubes. *Nano letters* 2008;8(9):2800-2805.
 63. Wang Y, Irudayaraj J. Surface-enhanced Raman spectroscopy at single-molecule scale and its implications in biology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2013;368(1611):20120026.
 64. Ben-Ari Z, Pappo O, Mor E. Intrahepatic cholestasis after liver transplantation. *Liver Transplantation* 2003;9(10):1005-1018.
 65. Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *British journal of experimental pathology* 1984;65(3):305.
 66. Georgiev P, Jochum W, Heinrich S, et al. Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. *Journal of British Surgery* 2008;95(5):646-656.
 67. Zong WX, Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. *Gene Dev* 2006;20(1):1-15. (In English). DOI: 10.1101/gad.1376506.