

마이크로와이어 기반 nitric oxide 가스 측정 센서의 개발 및 그 유용성에 대한 기초연구

이상우^{1,2}, 민선옥^{1,2}, 이경훈³, 권대성³, 임진홍^{1,4}, 남기창⁵, 김종백³, 김경식^{1,6}

¹연세대학교 의과대학 외과학교실, ²연세대학교 대학원 나노과학기술 협동과정, ³연세대학교 기계공학부, ⁴용인세브란스병원 외과, ⁵연세대학교 의과대학 의학공학교실, ⁶세브란스병원 세포치료센터

Fabrication of a nitric oxide gas sensor using microwires and basic research for its application

Sang Woo Lee^{1,2}, Seon Ok Min^{1,2}, Kyoung Hoon Lee³, Dae-Sung Kwon³, Jin Hong Lim^{1,4}, Ki-Chang Nam⁵, Jongbaeg Kim³, Kyung Sik Kim^{1,6}

¹Department of Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul; ²Graduate Program of Nano Science and Technology, Graduate School of Yonsei University, Seoul; ³School of Mechanical Engineering, Yonsei University, Seoul; ⁴Department of Surgery, Yonsei Severance Hospital, Yonsei; ⁵Department of Medical Engineering, Yonsei University College of Medicine, Seoul; ⁶Cell Therapy Center, Severance Hospital, Seoul, Korea

Purpose: Although nitric oxide (NO) is considered one of the initial signals that promote postsurgery liver regeneration, NO's exact role in the liver regeneration mechanism is still not clear. Therefore, developing a practical gas sensor and testing it in a clinical setting through basic research will lay the groundwork for advanced clinical research on the action mechanism of NO.

Methods: A thin nano wire NO sensor was made by wrapping a pair of parlyene-coated gold wires around a needle. The NO blood concentration determined by measuring the potential difference across the oscilloscope using electrical conductivity. In order to measure changes in NO level before and after the surgery, the NO sensor was inserted in the hepatic portal vein and a 75 percent partial hepatectomy was performed. The NO blood concentration was measured regularly with both the NO kit and the sensor.

Results: One significant challenge was separation of the wire upon insertion into the hepatic portal vein. Despite separation, the constant measurements of the wire-type sensor were similar to those measured by the NO measurement kit.

Conclusion: The development of a needle-type sensor allowed for easier insertion. In the future, using difference in electric potential, as used in the NO sensor, may be a more effective method of measuring blood ion concentration.

Keywords: Liver regeneration, Nitric oxide, Hepatectomy, Liver ischemia

서 론

신체 각 장기의 신호전달 물질로 알려진 nitric oxide (NO)는 세포독성 효과와 세포보호 효과를 모두 갖고 있는 것으로 알려져 있으나

[1], 아직까지 정확한 작용기전은 밝혀지지 않았다. NO는 인체 내에서 L-arginine으로부터 생성되어 안정화된 최종 산물인 nitrite와 nitrate (NOx)로 금방 분해된다. 분해된 NOx는 혈청에서 측정이 가능하여 간접적인 방법으로 NO의 농도를 측정하고 있다. NO의 농도는 여러 가지 염증성 질환, 자가 면역성 질환, 암세포나 이식 후 항원에 대한 반응 시 높아지는 것으로 알려져 있다. 또한 간 절제술이나 문맥 색전술 후 일어나는 간재생에 있어서 NO는 간세포 증식 시작 신호 중 하나로 알려져 있다. 간세포 증식의 과정은 시작 신호와 준비기, 진행기, 세포주기기와 종료 신호로 나눌 수 있다. 간세포 증식의 시작은 NO뿐만 아니라 여러 가지 인자들에 의한 과정으로 이해되고 있다[2]. 간 부분 절제술 후 문맥압이 상승하여 간 동모양 혈관 내피 세포(sinusoidal endothelial cell)의 전단력(shear stress)이 증가하게 되면 NO의 생성이 증가하게 되는데[3] 이 NO가 하나의 신호전

Received: Sep 22, 2013 Revised: Dec 9, 2013 Accepted: Dec 13, 2013

Correspondence to: Kyung Sik Kim

Department of Surgery, Yonsei University College of Medicine,

50 Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea

Tel: +82-2-2228-2125, 2100, Fax: +82-2-313-8289

E-mail: kskim88@yuhs.ac

Copyright © Korean Society of Clinical Oncology

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

달 물질로 작용하는 것이다[4]. 하지만 간 절제 후나 문맥 색전술 후에 일어나는 NO의 생성과 간세포의 증식에 관여하는 NO의 기전은 완전히 이해되고 있지는 않다[5]. 간세포의 증식이 NO synthase (NOS) 저해제(inhibitor)인 N(G)-nitro-L-arginine methyl ester를 투여 후 의미 있게 감소하는 현상을 관찰함으로써 간접적인 방법으로 기전을 유추하였다. 즉, 간 부분 절제술 혹은 문맥 색전술 후 4시간 경과 시점에서 혈액 내 증식인자의 활성도 감소와 15분 경과 후의 hepatic c-fos mRNA 발현이 NOS 저해제인 N(G)-nitro-L-arginine methyl ester를 투여하여 감소됨으로써 이를 입증할 수 있다[6]. Tutuncu 등[7]은 Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF)에서 NO의 대사 물질인 NOx를 혈액 내에서 측정하여 NO의 간접 측정 기술이 처음으로 소개되었다. 하지만 인체 내에서 일어나는 NO의 작용기전을 연구하고 이해하는 데에는 직접적인 NO 가스 농도 측정 방식의 개발이 절실하며 특히 실시간의 NO 농도의 측정은 간이식 후의 이식한 간의 기능을 예측할 수 있다는 점에서 매우 그 적용 범위가 넓다. 이에 본 연구를 통해 인체 내 NO 농도의 변화를 실시간으로 측정할 수 있는 센서를 개발하여 장기별, 질환별 NO의 작용기전, 특히 간 절제술 후 변화하는 NO의 농도를 관찰하고 그 작용기전을 규명하는 연구의 기틀을 마련하고자 한다.

방법

마이크로 와이어 NO 센서의 제작

NO 이온 측정에 쓰인 전극은 100 μm의 지름을 가지는 한쌍의 금 와이어(Nilaco Co., Tokyo, Japan)와 500 μm의 지름을 가지는 은 와이어(Nilaco Co.)로 이루어져 있으며, 제작된 전극의 전체적인 모습은 Fig. 1에 나타내었다. 먼저, 패럴린 코팅(DACS-LAB, KISCO, Shanghai, China)를 이용하여 세 와이어의 표면에 패럴린(dix C, KISCO)을 1 μm 두께로 코팅한다. 그 후에 세 와이어를 서로 꼬아 하나의 바늘 형태로 만들어 아크릴 기판에 고정한다. 다음, 아크릴 기판 위에 부착된 구리 전극과 금 와이어를 연결하고 전극의 표면 전체를 패럴린으로 1 μm 두께로 코팅한 후 금 와이어의 단면이 노출되도록 바늘의 끝 부분을 절단함으로써 산화 질소 이온 측정에 쓰이는 전극의 제작이 완성된다.

실험동물

300-350 g의 Sprague Dawley 백서(SD rat, Charles River Laboratory

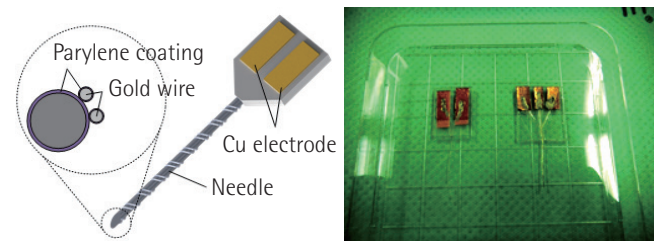


Fig. 1. The outline of electronic needle type for nitric oxide ion measurement.

Inc., Willimantic, CT, USA)를 사용하였으며 일주일간의 미생물 모니터링을 거친 후 실험에 적용되었다. 실험에 적용된 모든 백서는 국제실험동물관리인증협회(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International)의 승인을 받은 연세대학교 의과대학 실험동물부 동물실험실에서 동물실험계획서를 제출하여 승인 후 Guide for the Care and Use of Laboratory Animal (National Research Council, Seoul, Korea)에 근거하여 과학적이고 윤리적으로 수행하였다. NO 측정 키트를 통하여 혈중 NO의 변화를 측정하기 위하여 Zoletil을 이용하여 SD백서를 마취한 후 복부의 털을 완전히 제거하고 늑골 하부위를 절개하여 간을 외부로 꺼낸 후 75% 부분 간 절제를 시행하고 간 절제 전후에 백서의 꼬리에서 혈액을 시간별로 채혈하였다.

NO 키트를 사용한 혈중 NO 농도의 측정

SD백서에서 약 500 μL의 혈액을 채취하고 실온에서 20분간 방치 후 15분간 3,000 rpm으로 원심분리하여 분리된 혈청에서 Nitrate/Nitric colorimetric assay 키트 (780001, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)로 NO 농도를 측정한다. 96 well plate 한 well당 40 μL씩 분리된 혈청과 assay buffer (Catalog No. 780022)를 각각 넣고, 10 μL enzyme cofactor mixture (Catalog No. 780012)와 10 μL Nitrate Reductase mixture (Catalog No. 780010)를 첨가한 후 덮개를 씌운다. 실온에서 한 시간 방치 후 50 μL Griess Reagent R1 (Catalog No. 780018)과 50 μL Griess Reagent R2 (Catalog No. 780020)를 첨가하고 실온에서 10분 방치 후 ELISA로 흡광도 540 nm에서 측정한다. 흡광도 값을 아래 식에 대입하여 농도 값(μM)을 구한다.

$$\text{Nitrate+Nitrite } (\mu\text{M}) = (A540 - y_{\text{intercept}} / \text{slope}) (200 / \text{volume of sample used, } \mu\text{L}) \times \text{dilution}$$

마이크로 와이어 NO 센서를 이용한 NO 이온의 측정

혈중 산화 질소 이온의 농도를 측정하기 위해 전기 전도도 측정법을 이용하였다[8]. 전도도는 용액이 전류를 운반할 수 있는 정도의 의미이며, 전기 전도도 측정법은 용액 내 이온의 농도에 따라 전도도가 변하는 것을 측정하여 이온의 농도를 예측하는 방법을 말한다. Fig. 2는 실험 준비 사진 및 회로도이다. Needle형 전극을 이용하여 혈액의 전도도를 측정하기 위해 voltage divider 회로를 사용하였으며, 실험 시 전극 근처의 국소적 혈중 이온 농도 변화와 전극 생성물에 의한 전극 표면 변화를 막기 위해 function generator (Model 33120A,

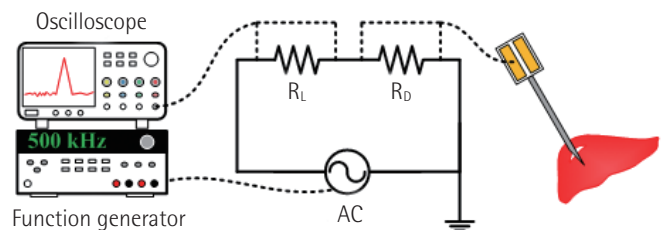


Fig. 2. Diagram for nitric oxide ion measurement via conductivity.

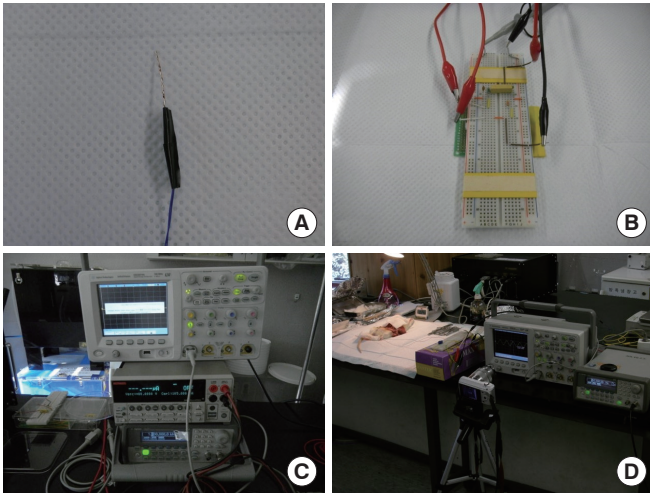


Fig. 3. Preparation of nitric oxide (NO) sensor and equipments. (A) Microwire NO sensor, (B) voltage divider, (C) oscilloscope and function generator, and (D) filming of potential difference by electric resistance.

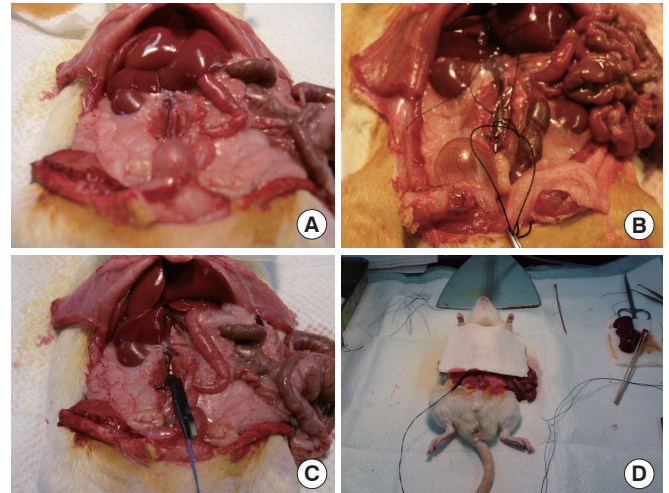
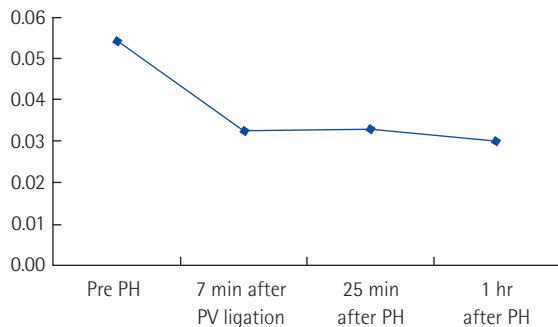
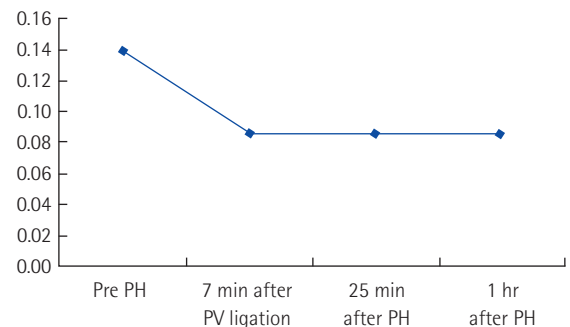


Fig. 4. Insertion of nitric oxide (NO) sensor into rat hepatic portal vein. (A, B) Insurance of hepatic portal vein, (C) insertion of NO sensor into hepatic portal vein, and (D) measurement of NO levels throughout time course.



Pre PH	7 min after PV ligation	25 min after PH	1 hr after PH
0.054	0.033	0.033	0.030

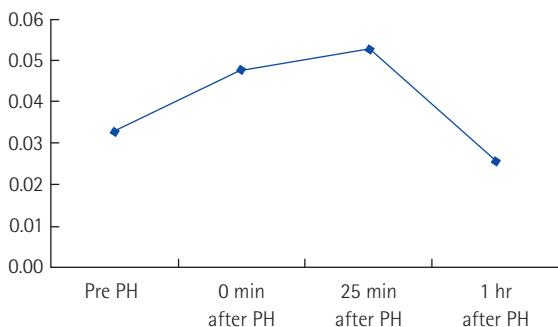
Absorbance (A540 nm)



Pre PH	7 min after PV ligation	25 min after PH	1 hr after PH
0.138	0.085	0.085	0.085

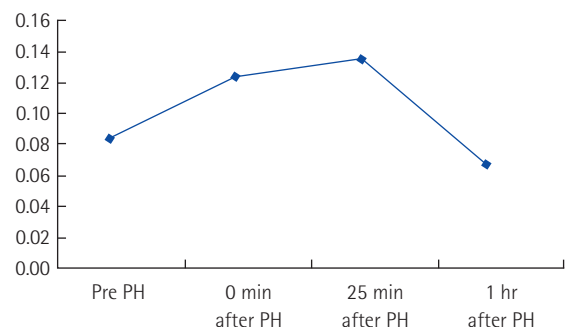
Concentration (µM)

A



Pre PH	0 min after PH	25 min after PH	1 hr after PH
0.033	0.048	0.053	0.026

Absorbance (A540 nm)



Pre PH	0 min after PH	25 min after PH	1 hr after PH
0.085	0.123	0.135	0.068

Concentration (µM)

B

Fig. 5. Change of blood nitric oxide (NO) levels using NO kit on pre- and postpartial hepatectomy (PH) in two Sprague Dawley rats (A & B).

Agilent Technologies Inc., Santa Rosa, CA, USA)를 이용하여 500 kHz 주파수의 교류 전압을 인가하였다. 또한, oscilloscope (DSO5014A: 100 MHz, 4 channels)를 이용하여 voltage divider 회로의 로드 저항에 걸리는 전위차를 측정함으로써, 혈중 산화 질소 이온의 농도를 구하였다(Fig. 3).

백서 간문맥으로의 NO 센서 삽입

Zoletil을 이용하여 SD백서를 마취한 후 복부의 털을 완전히 제거하고 정중선(midline)을 따라서 피부층 및 근육층을 절개한다. 개복 후 장기를 조심스럽게 젖히면서 간문맥을 시야에 확보 및 박리하고 수

술용 봉합사(3-0 silk)를 이용하여 묶을 준비를 한다. 주사용 18 G 카테터를 간문맥에 조심스럽게 삽입 후 침은 제거하고 준비된 봉합사를 이용하여 고정해준다. NO 센서의 길이에 맞게 튜브를 잘라내어 센서의 삽입이 용이하도록 한다. NO 센서의 삽입 시 철사의 끝이 벌어지지 않도록 조심하도록 한다. 개복된 백서의 장기가 마르지 않도록 생리식염수로 적셔준 거즈를 덮어주도록 한다. NO 센서와 키트의 혈중 NO치의 결과를 일관성 있게 비교하기 위해 시간별로 센서를 제거하고 간문맥에서 채혈을 한 후 다시 센서를 삽입하였다 (Fig. 4).

- 0 min: Sensor insertion→A
- 15 min: Blood sampling (re-insertion after removing of sensor)→B
- 30 min: Blood sampling (re-insertion after removing of sensor)→C
- 45 min: PV ligation (no blood sampling)→D
- 70 min: Blood sampling (re-insertion after removing of sensor)→E
- Re-insertion after removing of sensor----- →F
- 105 min: PH. (no blood sampling)→G
- 120 min: Blood sampling (re-insertion after removing of sensor)→H
- 160 min: Blood sampling (sacrifice after removing of sensor)→End time

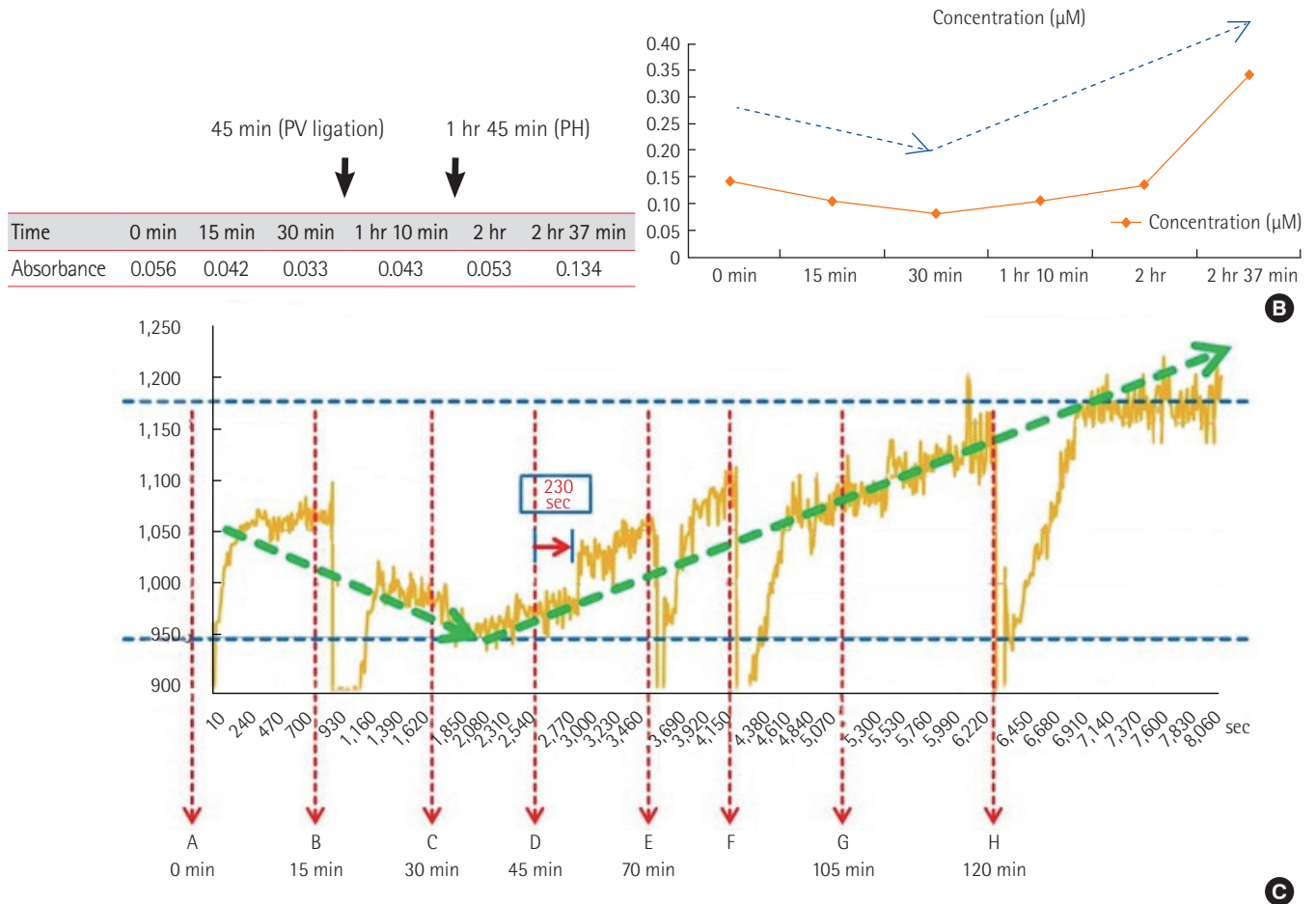


Fig. 6. Measurement of nitric oxide (NO) levels throughout partial hepatectomy (PH) on rat. (A) Time scheme for blood sampling and sensor application, (B) change of blood NO levels using NO kit, and (C) change of blood NO levels using NO sensor. PV, portal vein.

결 과

마이크로 와이어 NO 센서의 제작

아크릴 기판을 중심으로 페릴린 코팅을 한 나노 와이어의 세 가닥을 needle을 꼬아서 가는 needle형태의 센서를 제작하였다(Fig. 1). Oscilloscope를 이용하여 저항에 걸리는 전위차를 측정하는 장비를 연결하여 NO 이온의 변화를 전위차의 변화로 확인할 수 있었다(Figs. 2, 3).

NO 키트를 이용한 혈중 NO 농도의 측정

NO 키트의 정확한 측정을 위해 두 마리의 백서에서 간 절제 전 및 절제 후 혈중 NO의 변화를 NO 키트를 이용하여 측정한다. 결과, 두 마리에서 각각 다른 결과를 보였다(Fig. 5). 한 마리에서 측정된 NO의 변화는 간문맥을 절제하고서 NO의 감소를 보였으며 간 절제 후 1시간이 경과된 시간에서도 그 수치의 변화는 크게 없었다(Fig. 5A). 그러나 다른 백서의 실험에서는 간 절제 직후에 급격한 NO의 증가를 보였으며 절제 후 25분경에 가장 큰 농도의 변화를 보였다. 하지만 절제 후 1시간이 경과된 시점에서는 간 절제 전보다 더 낮은 수치의 NO 농도를 보였다(Fig. 5B).

백서 간문맥에서의 NO 수치 측정

나노 와이어 NO 센서의 삽입을 위해 백서를 개복하여 간문맥을 박리하여 18 G 카테터를 삽입하였다. 카테터 삽입 후 flexible tube를 제외한 needle을 제거하고 제작된 센서의 길이에 맞게 자른 후 나노 와이어 NO 센서를 flexible tube 내로 삽입하였다(Fig. 4). 혈액 샘플의 NO 측정을 위해 센서를 잠시 제거하고 다시 삽입하는 과정에서 와이어 형태로 제작된 센서의 삽입 시에 끝이 벌어지는 현상이 생겨서 끝을 자주 잘라내었다.

혈중 내 NO의 수치를 키트를 이용하여 측정한 결과 간문맥 절제 후 NO의 수치 증가가 이루어짐을 확인할 수 있었으며 간절제 후에도 계속 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6B). 전기 전도도 측정법을 이용한 NO 센서의 그래프 결과에서도 전위차를 확인한 결과 키트를 이용한 결과와 유사한 패턴의 양상을 확인할 수 있었다. 그러나 채혈을 위해 센서를 제거하고 재 삽입하는 과정에서 센서의 안정화가 이루어지는 시간을 측정한 결과 약 230초의 시간이 필요하였다(Fig. 6C).

고 찰

NO는 NOS에 의해 유도되는 endothelium derived relaxing factor로 혈관 내피 세포에서 유래하여 세포막 확산을 통한 자가 분비 및 측 분비에 의해 그 활성도가 유지되거나 비활성 대사 산물인 nitrate와 nitrite로 산화되면서 3-5초 정도의 극히 짧은 반감기를 갖는다. 그러므로 간접적인 측정법으로는 많은 한계가 있다[9-12].

본 연구에서는 이온을 측정할 수 있는 센서의 개발에 대한 실험과 측정 방법에 있어서 저항에 대한 전위차를 측정하여 혈중 농도를 예측하는 방법으로 실험하였다. 혈중 NO의 농도를 측정하는 키트를 이용한 방법을 바탕으로 그에 따른 결과를 대조군으로 하여 실험한

결과 유사한 패턴의 결과를 마이크로 와이어 NO 센서를 이용하였을 경우에도 나타내었음을 알 수 있었다. 전기 전도율이 높은 금을 이용하여 가느다란 needle형태의 센서를 제작한 것은 혈관 내 직접적인 삽입을 통하여 실시간으로 이온의 변화를 측정할 수 있다는 장점을 도출할 수 있었다. 이는 NO의 농도 변화를 실시간으로 확인하여 환자의 간 적출 후 재생에 있어 보다 효과적인 치료를 할 수 있음을 나타낸다. 혈중 NO의 변화를 실시간으로 측정할 수 있는 장비의 개발은 간 질환을 비롯한 심장질환 등의 혈관 질환에 있어서 환자의 치료에 많은 영향을 줄 것으로 보인다. 본 실험에서 사용된 혈중 NO 이온의 변화를 측정할 수 있는 센서는 그 형태가 가늘며 길이를 조절할 수 있어 혈관 내 목적 위치에 대한 이온의 변화를 예측하기에 가능하였다.

그러나 제작하여 사용된 센서를 이용함에 있어서 약간의 문제점을 확인할 수 있었다. 두 가닥의 금으로 된 와이어를 꼬아서 제작되고 표면을 보호하는 재질이 없어 혈관 내 삽입하는 과정에서 어려움을 보였다. 두 가닥의 와이어가 혈관 내 삽입하는 과정에서 벌어짐 현상은 저항에 따른 전위차의 큰 변화를 나타내었다. 또한 센서의 삽입을 통해 혈중 이온의 측정에서 센서가 측정하는 전위차의 안정화되는 시간이 생각보다 오래 걸려서 실시간으로 이온의 변화를 측정하는 데 약간의 어려움도 있었다. 이것은 제작함에 있어 센서를 보호하며 유연한 재질로 되어 있는 물질을 사용함과 전위차의 변화를 빨리 측정할 수 있게 수정하면 될 것으로 보인다.

실시간으로 혈중 NO 이온의 변화를 전기 전도도법을 사용하여 농도를 예측하는 방법은 NO의 측정뿐 아니라 혈중 다른 이온의 변화를 예측함에 있어서도 많은 가능성을 보여주었다. 또한 Oscilloscope를 이용한 실시간의 이온의 변화 확인은 환자를 치료함에 있어서 모니터링을 바로 할 수 있다는 장점도 보였다. 다만 측정에 있어서 나타나는 noise의 조절은 필요할 것으로 보인다.

본 연구자들은 혈중 이온의 변화를 측정할 수 있는 방법으로 혈관 내 삽입 가능한 센서의 제작과 전위차를 이용하여 혈중 이온의 변화를 실시간으로 확인할 수 있는 방법에 대한 가능성을 보였다. 약간의 문제점을 보완한다면 카테터 형태나 스텐트 형태로도 제작하여 다양한 혈관 질환 및 간 재생에 있어서 환자에게 보다 효과적인 약물 치료를 통하여 회복에 많은 영향을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a faculty research grant of Yonsei University College of Medicine for 2010 (6-2010-0029).

REFERENCES

1. Wiley JW. The many faces of nitric oxide: cytotoxic, cytoprotective

- or both. *Neurogastroenterol Motil* 2007;19:541-4.
2. Wang HH, Lauth WW. Evidence of nitric oxide, a flow-dependent factor, being a trigger of liver regeneration in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1998;76:1072-9.
 3. Hortelano S, Dewez B, Genaro AM, Diaz-Guerra MJ, Bosca L. Nitric oxide is released in regenerating liver after partial hepatectomy. *Hepatology* 1995;21:776-86.
 4. Schoen JM, Wang HH, Minuk GY, Lauth WW. Shear stress-induced nitric oxide release triggers the liver regeneration cascade. *Nitric Oxide* 2001;5:453-64.
 5. Tuncyurek P, Yenisey C, Doger FK, Soyder A, Bicakci T, Cevikel MH. Nitric oxide as an independent regulatory factor in regenerating rat liver. *Acta Chir Belg* 2006;106:581-7.
 6. Inukai N, Uchida M, Miyazaki Y, Suzuki T, Yoshikawa H, Tanaka K, et al. Nitric oxide production and its contribution to hepatocyte proliferation in normal juvenile rats. *J Vet Med Sci* 2010;72:861-7.
 7. Tutuncu EE, Gurbuz Y, Ozturk B, Kuscu F, Sencan I. Serum nitric oxide levels in patients with Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Scand J Infect Dis* 2010;42:385-8.
 8. Garcia-Breijo E, Barat JM, Torres OL, Grau R, Gil L, Ibanez J, et al. Development of a puncture electronic device for electrical conductivity measurements throughout meat salting. *Sens Actuators A Phys* 2008;148:63-7.
 9. Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:682-5.
 10. Wiest R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. *Hepatology* 2002;35:478-91.
 11. Ignarro LJ. Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *FASEB J* 1989;3:31-6.
 12. Shah V, Lyford G, Gores G, Farrugia G. Nitric oxide in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 2004;126:903-13.