

# 무표지 공초점 형광 수명 영상 현미경을 통한 암 스페로이드의 비파괴적 검사

한정무<sup>1</sup>, 박준하<sup>1</sup>, 권순용<sup>1</sup>, 전성윤<sup>1</sup>, 권보미<sup>2\*</sup>, 유홍기<sup>1\*</sup>

한국과학기술원 기계공학과<sup>1</sup>

세종대학교 기계공학과<sup>2</sup>

## Non-destructive diagnosing of cancer spheroids using label-free confocal fluorescence lifetime imaging microscopy

Jeongmoo Him<sup>1</sup>, Joonha Park<sup>1</sup>, Soonyong Kwon<sup>1</sup>, Jessie Sungyun Jeon<sup>1</sup>, Bomi Gweon<sup>2\*</sup>, and Hongki Yoo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Mechanical Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Korea

<sup>2</sup>Department of Mechanical Engineering, Sejong University, Korea

\*[bgweon@sejong.ac.kr](mailto:bgweon@sejong.ac.kr), [h.yoo@kaist.ac.kr](mailto:h.yoo@kaist.ac.kr)

### Abstract

Spheroids can mimic physiologically more relevant condition than conventional 2D-culture cells. For characterizing cancer spheroids, the metabolites of cancer cells constituting spheroids intuitively provide metabolic states. For example, nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) and flavin adenine dinucleotide can provide metabolic state of cancer cells. In this study, we detected autofluorescence signal of live cancer spheroids by using custom-built label-free confocal fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). Multispectral FLIM established with analog mean delay methods enabled multidimensional high-speed imaging of various endogenous fluorophores. Parameters (fluorescence intensity, lifetime, and intensity ratio) obtained by FLIM varied depending on the metabolic condition induced by oxygen concentration, glucose concentration, and drug treating on cells. These results demonstrate the potential for quantitative analysis of the cellular metabolism in a label-free, non-destructive manner.

### 1. 연구 배경

최근에, 2차원의 세포 배양조건에 비해 3차원의 세포 융합체인 스페로이드는 더욱 더 실제 생체 내 조건을 잘 모사한다고 알려져 있기에 스페로이드를 활용한 연구가 활발히 진행가운데 있다. 특히, 우리나라 사망률 1위의 질병인 암의 경우에서, 최적화된 항암제의 농도를 찾기 위해서 여러가지 연구가 진행되는 가운데 있다. 현재 많이 사용하는 방법들은 Western blot, 면역 흡착 검사(ELISA) 등의 파괴적인 방법으로, 실제 약물의 주입 이후에 3차원 세포에 대해 실시간 모니터링이 어렵다는 한계가 있다. 역시 시각화를 위한 고정-표지-이미징 같은 침습적 방법 또한 실시간 관찰은 불가능하며, 추적 관찰 역시 불가능하다. 반면, 형광 수명은 형광 신호가 발생하였을 때 감쇠하는 데 걸리는 시간을 의미하며, 특히 자가 형광의 형광 수명을 활용하는 경우, 무표지로 이미징이 가능함이 알려져 있다. 세포 호흡의 부산물 중 하나인 니코틴아마이드-아데닌-다이뉴클레오타이드(NADH)와 플라빈-아데닌-다이뉴클레오타이드(FAD)는 산화 환원상태의 차이에 따라 형광 수명이 다르다는 점이 알려져 있다[1]. 따라서 본 연구에서는, 3차원 암 스페로이드에 여러 배양 조건을 통해 물질대사를 조절하였으며, 각 조건에 따른 형광 수명 이미지를 획득하였다. 획득 이미지 간에 통계 분석을 통해, 여러 조건들 사이에 유의미한 통계적 차이를 확인할 수 있었다.

### 2. 연구 방법

우선, 자가 형광을 유발하기 위하여, 355nm 대역의 펄스 레이저를 선정하였다. NADH, FAD의 형광을 모두 유발하지만, 서로 다른 파장 대역으로 독립적으로 받기 위하여, 3개의 필터를 설치하여 신호를 3구간으로 나누어 획득하였다. 각각의 파장 대역은 다음과 같다. (중심파장(nm)/대역폭(nm)): 390/40, 452/50, 542/50) 3개의 파장 대역은 각각 콜라겐,

NADH, FAD를 주로 검출하기 위하여 선정되었다. 관측 시야는 650 um, 축방향 분해능은 500 nm로 직경이 <500 um인 스페로이드를 이미징하기에 충분히 설계되었다. 본 연구에서는 공초점 구현을 위하여 핀홀 대신에 멀티모드 광섬유를 방출부 렌즈의 초점면에 두는 방식을 활용하였으며, 수식 1.의 시뮬레이션을 통해 50um의 코어 크기를 갖는 광섬유를 통해, 18 um의 축 분해능을 가질 수 있음을 확인하였다. 이 광섬유에 커플링된 방출 광은 3개의 파장 대역으로 분리하게끔 설계된 모듈을 통해서 분리되었고, 이들은 각각 다른 길이의 광섬유 차이를 통해 하나의 광 검출 증폭기 (PMT)를 통해 신호가 획득될 수 있었다[2].

형광 수명을 측정하기 위해서는 아날로그 시간 지연

$$FWHM_{axial} = \sqrt{\left(\frac{0.88 \cdot \lambda_{em}}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}}\right)^2 + \left(\frac{\sqrt{2} \cdot n \cdot PH}{NA}\right)^2}$$

### 수식 1. 공초점 현미경 시스템에서의 축방향 반지름

(analog mean delay) 방법을 이용하여 좀 더 간편하고, 빠르게 형광 수명 값을 추출할 수 있도록 설계하였다[3].

개발한 시스템을 이용하여 분석할 형광 수명 파라미터는 각 파장 대역의 세기 신호 (Intensity), 형광 수명 (Lifetime), 파장 대역 별 세기 비율 (Intensity ratio)로 3 종류로 사용되었으며, 특히, 2번째 파장대역과 3번째 파장대역의 세기 비율 값은 NADH와 FAD의 정량적인 비율로서 광학적 산화환원 비율 (optical redox ratio)로 활용하여 세포의 물질대사율을 직접적으로 제시할 수 있었다.

세포의 물질 대사량을 조절하기 위해서는 3가지의 조건이 사용되었으며, 각각 산소의 농도 차, 글루코오스의 농도 차, 항암제의 농도 차이이다. 산소의 농도와 글루코오스의 농도는 높을수록 세포 호흡이 활발히 진행되어 물질 대사량을 늘리게 하였으며, 항암제의 농도는 높을수록 세포

호흡을 억제하여 물질 대사량을 줄이는 방향으로 조건을 설계하였다.

### 3. 연구 결과

설계된 3개의 파장 범위 의해 그림 1과 같이 스페로이드의 형광 세기, 형광 수명 이미지를 획득할 수 있었다. 3개의 파장 대역에서 세기 신호와 형광 수명 모두 서로 독립적으로 잘 이미징 되었다.

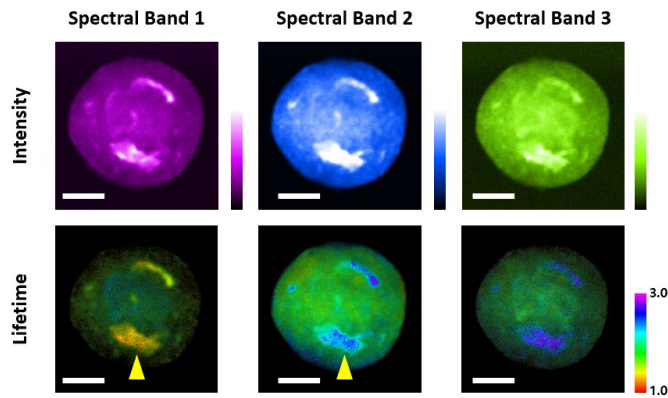


그림 1 스페로이드의 형광 세기, 수명 이미지  
(Scale bar : 100 um)

여러 배양 조건에 따른 형광 수명 파라미터 값들의 차이도 통계적으로 검증하였는데, 그 중 가장 두드러진 것은 다음과 같다. 약물의 농도에 따른 2번째 파장 대역 (spectral band 2; SB 2)에서 형광 수명 값이 항암제의 농도가 진할수록 현저히 짧아 졌음을 알 수 있었다. 이 원인은 항암제로 인한, 세포 호흡 단계에서 전자전달계 과정이 억제에 기인한 자유 NADH의 증가로 판단된다. 항암제가 미토콘드리아의 작용을 상당히 억제하기에, 무산소 호흡으로 인한 자유 NADH가 많아진 것이 그 기전으로 파악된다. 또한 형광 세기 비율 신호 (SB2/SB3)에서의 결과를 통해서도 자유 NADH가 많아졌음을 통계적으로 유의미하게 확인하였으며, 형광 수명 및 개발한 시스템을 통해 얻을 수 있는 파라미터들로 물질대사를 진단할 수 있음의 가능성을 확인하였다.

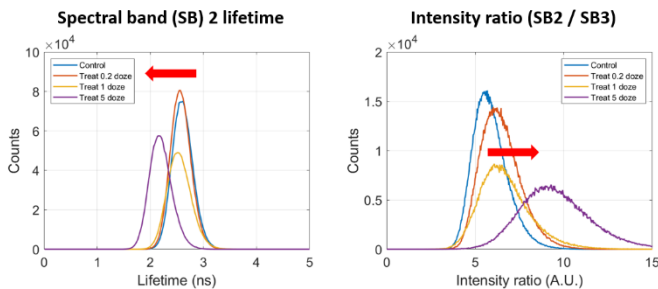


그림 2 약물 조건에서의 형광 수명 값 히스토그램

### 4. Acknowledgements

이 연구는 National Research Foundation of Korea (NRF) 과제 (2020R1A2C3006745, 2022R1A2C2010940) 및 Korea Evaluation Institute of Industrial Technology (KEIT) 과제 (20008546)의 지원으로 진행되었음.

### 5.참고 문헌

[1] Chakraborty, S., Nian, F. S., Tsai, J. W., Karmenyan, A., and Chiou, A. "Quantification of the metabolic state in cell-model of Parkinson's disease by fluorescence lifetime imaging

microscopy." *Scientific reports*, 6(1), 1-9, 2016

[2] H. S Nam, W. J. Kang, M. W. Lee, J. W. Song, J. W. Kim, W. Y. Oh, and H. Yoo. "Multispectral analog-mean-delay fluorescence lifetime imaging combined with optical coherence tomography." *Biomedical Optics Express*, 9(4), 1930-1947 (2018).

[3] Y. Won, S. Moon, W. Yang, D. Kim, W. T. and D. Y. Kim. "High-speed confocal fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) with the analog mean delay (AMD) method." *Optics Express*, Vol 19(4), p.3396-3405, 2011