

인지질분해효소D에 의해 유도된 소낭 융합에 대한 상 비대칭의 영향

박진원[†]

서울과학기술대학교 에너지바이오대학 화공생명공학과
01811 서울특별시 노원구 공릉로 232
(2015년 2월 5일 접수, 2015년 3월 2일 수정본 접수, 2015년 3월 3일 채택)

Phase Asymmetry Effect on Vesicle Fusion Induced by Phospholipase D

Jin-Won Park[†]

Department of Chemical and Biomolecular Engineering, College of Energy and Biotechnology, Seoul National University of Science and Technology, Gongreungro 232, Nowonku, Seoul 01811, Korea
(Received 5 February 2015; Received in revised form 2 March 2015; accepted 3 March 2015)

요 약

구형인지질이중층인 소낭이 이중에멀전기법에 의해서 제조되었다. 소낭의 바깥층에서 인지질분해효소D에 의해 촉진되는 Phosphatidylcholine의 Phosphatidic-acid 전환은 소낭의 곡률반경을 변화시키고 궁극적으로는 소낭들의 융합을 유도한다. 인지질층의 물성이 융합에 끼치는 영향을 형광세기변화의 측정으로 규명하였다. 측정 전에, 형광세기에 대한 융합의 등급화를 수행하였다. 8-Aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid disodium salt(ANTS)와 *p*-Xylene-bis(N-pyridinium bromide)(DPX)이 각각 캡슐화된 소낭들을 1:1로 섞은 조건의 형광세기를 0% 융합으로 설정하였으며, ANTS와 DPX가 섞인 채로 캡슐화된 소낭의 형광세기를 100% 융합으로 설정하였다. 형광물질의 누출을 고려하여 별도의 실험에서 누출에 의한 형광세기 변화를 측정하였다. 인지질분해효소D에 의해 유도된 소낭들의 거동을 관찰한 결과, 안 층이 액상인 조건에서만 융합이 일어났다. 그러나, 융합은 바깥층의 상에 의해서는 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 바깥층의 상은 누출에 영향을 주었으며, 이 결과는 층의 밀도와 측면확산에 기인한 것으로 이해된다.

Abstract – Spherical phospholipid bilayers, vesicles, were formed with respect to phase of each layer via a double emulsion technique. The conversion of phosphatidylcholine (PC) to phosphatidic acid (PA) at the outer layer, caused by phospholipase D (PLD), induced a curvature change in the vesicles, which eventually led them to fuse each other. The effect of the lipid layer physical-properties on the PLD-induced vesicle fusion was investigated using the fluorescence intensity change. 8-Aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid disodium salt(ANTS) and *p*-Xylene-bis(N-pyridinium bromide)(DPX) were encapsulated in the vesicles, respectively, for the quantification of the fusion. The fluorescence scale was calibrated with the fluorescence of a 1/1 mixture of ANTS and DPX vesicles in NaCl buffer taken as 100% fluorescence (0% fusion) and the vesicles containing both ANTS and DPX as 0% fluorescence (100% fusion), considering the leakage into the medium studied directly in a separate experiment using vesicles containing both ANTS and DPX. It was observed that the fusion occurred to the liquid-phase of the inner layer only. The fusion behaviors were very similar for both solid and liquid of the outer layer. However, the leakage was faster for the solid-phase outer-layer than the liquid-phase outer-layer. The difference in the leakage seems to be caused by the lipid concentration and the lateral diffusivity in the layer.

Key words: Vesicle, Phospholipase D, Fusion, Phase Asymmetry

1. 서 론

인지질분해효소D는 소낭의 운송, 세포골격의 재정렬, 세포의 분열과 예정사를 포함한 여러 가지 세포 기능들에 관련된 세포막 분포

효소이다[1,2]. 그러므로, 암, 염증, 그리고 심근관련 질환 등의 질환과 관련이 있는 것으로 인식되고 있다 [3-6]. 인지질분해효소D에 의해서 Phosphatidylcholine(PC)의 반응이 촉진되어, 알코올과 Phosphatidic-acid(PA)이 생성되며 생성된 PA는 소낭의 운송과 운송에 관련된 신호 전달에 필요한 것으로 알려져 있다[1,6]. 그리고, PC 반응에 따른 세포막조성의 변화는 Diacylglycerol과 Lysophosphatidic acid에 관련된 PA의 대사에 영향을 주는 것으로 추정되고 있다[1,6-8].

세포막융합은 세포융합, 세포외배출작용, 그리고 세포내섭취작용과 같은 다양한 생화학적 과정들에 있어서 중요하다. 세포막의 모형으

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: jwpark@seoultech.ac.kr

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.

로 리포솜을 사용한 세포막융합의 연구가 리포솜의 안에 담지된 물질과 지질이중층들의 거동을 확인할 수 있는 형광분석법의 발전으로 더욱 활발해지게 되었다[9-17]. 리포솜융합은 안에 담지된 물질들과 인지질이중층의 성분들이 각각 섞이는 것을 의미하므로, 인지질성분 혼합의 분석만으로는 융합의 여부를 확인하기에 미흡하다. 융합없이 층의 인지질성분끼리 맞교환이 일어날 수 있기 때문이다. 그러므로, 리포솜내부 수용액 공간의 융합분석으로 리포솜융합을 확인한다[18,19].

인지질분해효소D에 의해 촉진된 수화반응으로 세포막의 조성이 변화되며 궁극적으로 소낭융합에 도달된다. 조성의 변화는 머리가 작은 인지질들로의 대체에 해당되므로, 소낭의 기하학적 변화와 관련이 있다. 따라서, 수화는 소낭의 곡률반경을 유도하여 소낭의 붕괴에 이르게 된다. 최근에 인지질분해효소D로 촉진된 소낭들의 기하학적 형태의 변화가 소낭층의 조성, 상(Phase), 그리고 비대칭성의 차이에 의해 달라지는 양상에 대하여 규명되었다[20-23]. 그러나, 여전히 소낭층의 물성이 소낭융합에 미치는 영향에 대하여 알려지지 않았다. 본 연구에서는 각 층의 물성과 융합과의 관계를 밝히고자 하였다. 소낭융합은 신경물질의 화학적 전달의 중간과정으로서 관련 질환의 원인을 이해하기 위하여 기전규명이 필요하다. 더 나아가 소낭의 각 층이 갖는 특성과 이에 따른 영향을 바탕으로 약물의 설계까지 고려할 수 있다.

2. 실험

2-1. 리포솜 제조

Diacylglycerolphosphatidylcholine (DOPC), Diacylglycerolphosphatidic acid (DOPA), Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), 그리고 Dipalmitoylphosphatidic acid (DPPA)는 Avanti Polar Lipids(Alabaster, AL)로부터, 8-Aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid disodium salt (ANTS)와 *p*-Xylene-bis(N-pyridinium bromide) (DPX)는 Sigma Aldrich(St. Louis, MO)로부터 각각 구입되었다. 이 시료들은 추가적인 정제과정 없이 바로 사용되었다. DOPA (혹은 DPPA)를 10 ml의 *tert*-butyl methyl ether에 10 mg/ml의 농도로 녹였으며, 여기에 pH 7.4이며 25 mM ANTS, 40 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl의 100 μ l 수용액을 추가한다. 이 용액을 50 nm 세공을 갖는 78 mm 직경의 PTFE막에 통과시켜 미셀을 형성한다. 같은 방식으로 또 다른 두 그룹의 미셀을 형성하는데, ANTS대신에 90 mM의 DPX, 12.5 mM ANTS와 45 mM DPX를 각각 넣어준다. 미셀용액 50 μ l를 주사기를 이용하여 방울단위로 pH 3이며 10 mM Tris-HCl의 수용액 10 ml에 주입한다. 이와 병행하여 DOPC (또는 DPPC)가 10 mg/ml로 녹아있는 *tert*-butyl methyl ether 용액 50 μ l를 주사기를 이용하여 방울단위로 주입한다. 최종 인지질 농도는 0.1 mg/ml이 된다. 주입되는 과정에서, 용액은 자기적으로 교반되며 질소흐름이 가하여진다. 용액은 원심분리 (3700 \times g)를 거쳐 리포솜 형성에 포함되지 못한 인지질들이 침전 및 제거된다. 용액의 상층액을 수거함으로써 리포솜용액이 획득된다. 이 절차들은 리포솜제조법으로 이미 널리 알려져 있다[24].

리포솜형성의 확인을 위하여, 미셀과 리포솜 직경이 각각 측정되었다. 전기영동광산란광도계인 ELS-8000 (Otsuka Electronics Co. Ltd, Osaka, Japan)이 이용되었으며, 이를 위해 필요한 *tert*-butyl methyl ether의 점도와 굴절률은 각각 0.23 cP and 1.3686이다 [25]. 측정결과, 미셀과 리포솜의 직경은 각각 75 ± 10 nm과 80 ± 10 nm

으로 나타났다. 직경변화 이외에도, 리포솜 내부 수용액영역에만 분포하는 ANTS의 누출이 없는 것은 리포솜 각 층의 구조변화가 발생하지 않음을 뜻한다. 그렇지 않다면, pH 3으로 낮아진 용액 환경에서 pH값 변화에 민감한 ANTS의 형광세기가 급격히 변화되기 때문이다.

2-2. 인지질분해효소D에 의해 촉진된 리포솜융합 측정

인지질분해효소D (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)의 농도로 1 nM을 고려한다. 이전에 발표되었던 연구결과로부터, 본 실험의 인지질농도보다 높은 조건에서 인지질분해효소D가 1 nM이상일 때 변화가 없음이 밝혀졌기 때문이다[20]. ANTS가 캡슐화된 리포솜은 Wallac Victor3 multi-well fluorometer (Perkin Elmer, Waltham, MA)으로 모니터링이 수행된다. 인지질분해효소D가 포함된 완충용액을 주입할 때와 효소가 포함되지 않은 완충용액을 주입할 때의 형광세기 차이가 관찰된다면, ANTS와 DPX 사이의 형광소광 혹은 매질로의 ANTS 누출을 의미하게 된다. 그러므로, ANTS와 DPX가 각각 캡슐화된 실험과는 별도로 두 물질들이 함께 섞인 채로 캡슐화된 조건에서 형광세기의 변화를 측정한다.

형광세기의 등급화를 위해서 다음의 과정들을 수행하였다. ANTS와 DPX가 각각 캡슐화된 리포솜들의 용액에 대하여 형광세기를 측정하고, 그 세기를 100%(0% 융합)로 둔다. 반면에, ANTS와 DPX가 완전히 섞인 물질이 캡슐화된 리포솜들의 용액에서 측정된 값을 0%(100% 융합)로 놓는다. 캡슐화된 물질의 누출을 고려해야 하므로, ANTS와 DPX가 섞인 리포솜용액의 초기상태 형광세기를 0% 누출로 두고 인지질분해효소D를 주입하여 시간에 따른 세기변화를 측정한다. 크게 변화가 나타나지 않은 시점 이후에 Tween 20으로 처리하여 용해된 상태의 형광세기를 100% 누출로 산정한다. 그러므로, 융합된 리포솜의 상대적 비율은 시간에 따라 감소되는 형광세기를 측정하여 %등급을 구하고 해당시간의 누출%로 수정함으로써 산출할 수 있다. 형광세기 측정 이외에도 광산란을 통한 리포솜크기의 측정으로부터 리포솜거동의 변화를 모니터링할 수 있다.

3. 결과 및 고찰

캡슐화를 확인하기 위한 과정이 수행된 결과는 이전에 발표되었던 연구결과와 동일하게 나타났다[20]. pH 3의 버퍼용액 몇 방울을 추가한 후에, 형광세기의 변화가 감지되지 않았다. 그러나, 계면활성제의 처리로 급격한 변화가 관찰되었다. 계면활성제 자체에 의한 변화 가능성이 있으므로, 형광물질이 주입되지 않은 리포솜용액에 동일한 실험이 수행되었으며 변화가 없음을 확인하였다. 이 결과는 캡슐화가 성공적으로 이루어졌음을 의미한다.

인지질분해효소D으로 촉진되는 리포솜융합에 여러 가지 인자들이 영향을 끼칠 수 있다. 그 인자들로 리포솜의 수와 직경, 인지질의 조성, 효소의 농도, 이온농도, 그리고 리포솜 각 층의 상(Phase)을 고려할 수 있다. 본 연구에서는, 인지질의 농도와 조성 그리고 리포솜의 직경이 정해져 있다. 그리고, 안정성과 상을 제외한 다른 인자들은 이전에 수행된 연구에서 그 영향성이 규명되어 있다[21]. 인지질 1 mg/ml에서 1~10 nM의 인지질분해효소D 농도에서 리포솜의 구조변화에 차이점이 나타나지 않았다. 생체환경을 모사한 수용액의 이온농도로써 NaCl 5 mM과 CaCl₂ 1 mM이 고려되었다. 이보다 낮은 농도에서는 효소작용이 변화되는 것이 관찰되었기 때문이다[6,27-29].

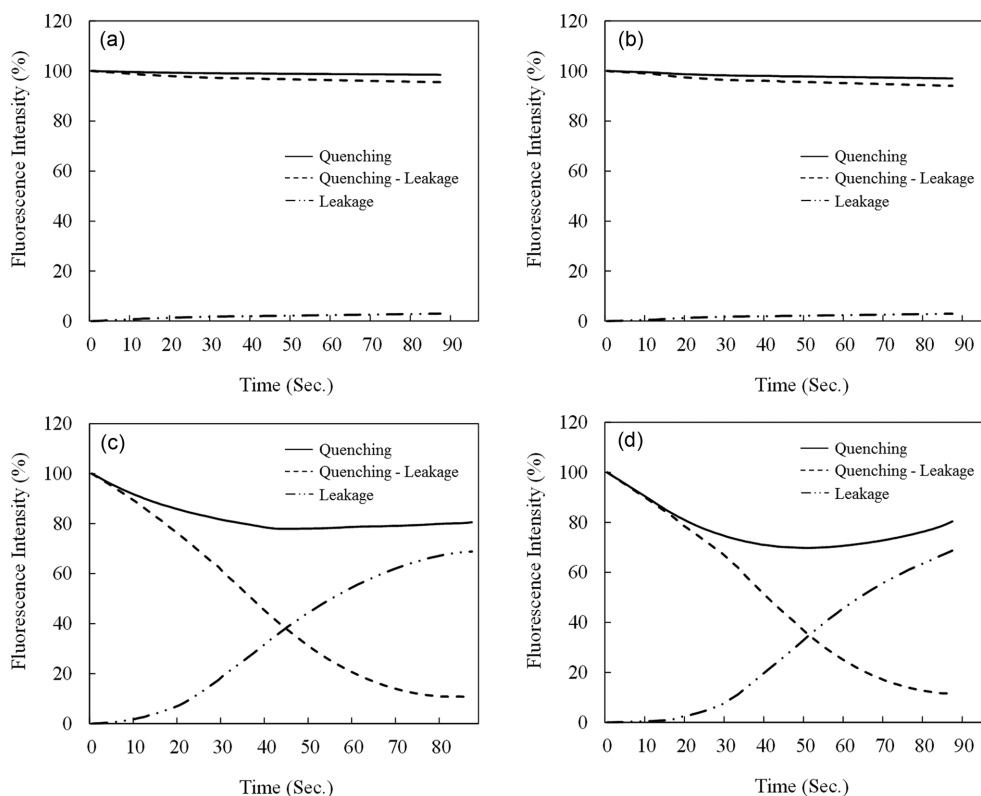


Fig. 1. Fluorescence intensity with respect to time for each layer of the vesicle. (a) and (b) are corresponding to the solid and liquid phase of the outer layer at the solid inner layer, and (c) and (d) are to the solid and liquid phase of the outer layer at the liquid inner layer.

그러므로, 각 층의 상을 제외한 다른 인자들은 결정되어 있으므로, 효소작용에 대한 층의 상태가 갖는 영향을 본 연구에서 규명할 수 있게 되었다. 상온에서, DOPC와 DOPA 층은 액체상(Liquid Phase)이고 DPPC와 DPPA 층은 고체상(Solid Phase)의 상태이다[30]. 리포솜은 이중층 구조를 가지므로 4가지 조건들을 고려한다.

ANTS의 형광세기에 대한 결과가 Fig. 1에 제시되어 있다. 시간에 따라 세기의 변화가 측정되었다. Fig. 1의 (a)와 (b)는 고체상의 안쪽 층에 대하여 바깥층이 각각 고체상과 액체상에 해당될 때의 결과이며, (c)와 (d)는 액체상의 안쪽 층에 대한 결과이다. 각 그래프는 세 가지 곡선을 나타내고 있다. 두 가지는 소광과 누출을 측정한 결과이며, 다른 하나는 소광으로부터 누출을 제거하여 산출된 결과이다. 제거하여 산출된 결과가 시간에 따라 진행된 리포솜융합의 거동에 해당된다. Fig. 1의 곡선들은 안쪽층이 액체상일 때에만 융합이 진행됨을 제시하고 있다. 고체상일 때에도 진행된다면, Fig. 1의 (a)와 (b) 곡선도 시간에 따라 급격히 감소되어야 할 것이다. 융합에서의 차이점은 안쪽층의 상 차이에 따른 분자확산도의 차이에 기인한 것으로 해석된다.

안쪽층이 액체상인 조건에서, 융합의 거동은 바깥층의 상과 무관하게 유사하게 나타나는 것으로 관찰된다. 그러나, 융합자체는 차이가 나타나지 않으나, 융합을 구성하는 소광과 누출의 관점에서 고찰하면 바깥층의 상에 따라 각각 다른 결과들이 얻어졌다. Fig. 1의 (c)와 (d)를 비교하여, 안쪽층이 액체상일 때에는 바깥층의 상에 따른 소광 효과의 차이는 누출에서 비롯된 것을 알 수 있다. 캡슐화된 물질의 누출은 안쪽층이 액체상인 조건에서 바깥층이 고체상일 때 더 빠르게 진행되는 것으로 관찰되었다. 인지질층의 기계적 물성을 고려하면 액체상에 대하여 더 빠르게 진행될 것으로 예상하였으나, 결과는

예상과 다르게 나타났다. 이 결과의 원인으로 상의 비대칭성을 고려하였으나, 안쪽층이 고체상인 조건에서도 동일한 결과가 관찰되었다(Fig. 1의 (a)와 (b)). 누출에 대한 상기 결과들을 반응속도에 의한 것으로 해석할 수 있는데, 이 관점에서 선행연구와 일치하는 경향성을 보이고 있다[20]. 바깥층의 Phosphatidylcholine(PC) 밀도가 고체상에서 액체상보다 두 배 이상 더 높은 것으로 알려져 있다[30]. 그러므로, 액체상의 낮은 PC 표면농도가 더 느린 반응속도를 유도하고 이는 반응시간으로 귀결된 것으로 추정된다.

또 다른 관점에서, 측면확산도 또한 고려해야 할 특성치인 것으로 판단된다. 인지질분해효소D에 의한 반응의 촉진으로 파생되는 리포솜의 구조변화는 PC의 측면이동도에 의해 영향을 받게 된다. 이동도가 높을수록 변화에 대한 완충작용이 있을 것으로 해석되는데, 액체상에서 측면확산도가 10~100배 고체상보다 더 높다. 따라서, 반응속도가 설령 두 상에 대해서 동일하다는 가정하에서도, 인지질분해효소D에 의한 리포솜붕괴 시간은 더 느릴 것으로 이해된다[31].

광산란을 이용하여, 리포솜의 직경이 각 조건에서 측정되었다. 안쪽층이 액체상인 경우에, 효소의 주입이 없는 경우에 직경의 붕우리 형태가 150 nm를 중심으로 정규분포를 나타내고 있다. 효소의 반응 촉진 이후에, 일정한 간격으로 여러 개의 붕우리가 분포함이 반복적으로 관찰되었다(Fig. 2의 (a)). 반면에, 안쪽층이 고체상인 경우에 분포의 형태가 불규칙적이었다(Fig. 2의 (b)). 이 결과는 형광세기에 대한 결과와 동일 맥락으로 이해된다. 붕우리 분포의 위치가 융합의 결과로 나타난 새로운 리포솜의 직경으로 해석되는데, 이 결과는 반응된 리포솜의 개수를 토대로 계산된 예측치와 일치한다. 고체상에서의 불규칙적인 분포는 리포솜들의 응집으로 추정된다.

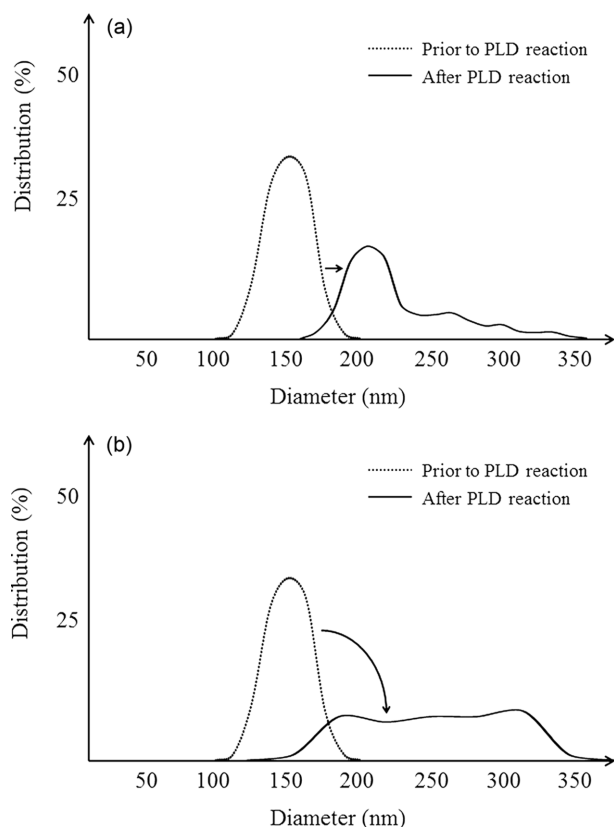


Fig. 2. Distribution change for each phase of the vesicle inner-layer. (a) is corresponding to the liquid phase and (b) is the solid phase.

4. 결 론

리포솜을 구성하는 각 층의 상(Phase)과 인지질분해효소D로 촉진되는 리포솜융합의 관계를 형광세기의 변화를 이용하여 규명하고자 하였다. 이를 위하여, ANTS와 DPX이 각각 캡슐화된 소낭들을 1:1로 섞은 조건의 형광세기를 0% 융합으로 설정하였으며, ANTS와 DPX가 섞인 채로 캡슐화된 소낭의 형광세기를 100% 융합으로 설정하였다. 융합과정에서 발생하는 형광물질의 누출을 고려하여 별도의 실험에서 누출에 의한 형광세기 변화를 측정하였다. PLD에 의해 유도된 소낭들의 거동을 관찰한 결과, 안층이 액상인 조건에서만 융합이 일어났다. 그러나, 융합은 바깥층의 상에 의해서는 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 바깥층의 상은 누출에 영향을 주었으며, 이 결과는 층의 밀도와 측면확산에 기인한 것으로 이해된다.

감 사

이 연구는 서울과학기술대학교 교내연구비의 지원으로 수행되었습니다.

References

- McDermott, M., Wakelam, M. J. and Morris, A. J., "Phospholipase D," *Biochem. Cell Biol.*, **82**, 225-253(2004).
- Exton, J. H., "Phospholipase D: Structure, Regulation and Function," *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **144**, 1-94(2002).
- Huang, P. and Frohman, M. A., "The Potential for Phospholipase D as a New Therapeutic Target," *Exp. Opin. Ther. Targets*, **11**, 707-716(2007).
- Tappia, P. S., Dent, M. R. and Dhalla, N. S., "Oxidative Stress and Redox Regulation of Phospholipase D in Myocardial Disease," *Free Radical Biol. Med.*, **41**, 349-361(2006).
- Scott, S. A., Selvy, P. E., Buck, J. R., Cho, H. P., Criswell, T. L., Thomas, A. L., Armstrong, M. D., Arteaga, C. L., Lindsley, C. W. and Brown, H. A., "Design of Isoform-selective Phospholipase D Inhibitors that Modulate Cancer Cell Invasiveness," *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 108-117(2009).
- Brown, H. A., Henage, L. G., Preininger, A. M., Xiang, Y. and Exton, J. H., *Lipidomics and Bioactive Lipids: Lipids and Cell Signaling*, Academic Press, Amsterdam, Netherlands, 58-100 (2007).
- Lee, B., Choi, G. G., Choi, Y. E., Sung, M., Park, M. S. and Yang, J. W., "Enhancement of Lipid Productivity by Ethyl Methane Sulfonate-mediated Random Mutagenesis and Proteomic Analysis in *Chlamydomonas Reinhardtii*," *Korean J. Chem. Eng.*, **31**, 1036-1042(2014).
- Ham, S. M., Yoo, I. S., Park, S. J. and Kim, J. H., "Extraction of Intracellular Lipids from Recombinant *E. coli* for Improving Long-chain Fatty Acid Production," *Korean Chem. Eng. Res.*, **51**, 482-486(2013).
- Ingolia, T. D. and Koshland, D. E. Jr., "The Role of Calcium in Fusion of Artificial Vesicles," *J. Biol. Chem.*, **253**, 3821-9382(1978).
- Wilschut, J. and Papahadjopoulos, D., "Ca²⁺-induced Fusion of Phospholipid Vesicles Monitored by Mixing of Aqueous Contents," *Nature*, **281**, 690-692(1979).
- Hoekstra, D., Yaron, A., Carmel, A. and Scherphof, G., "Fusion of Phospholipid Vesicles Containing a Trypsin-sensitive Fluorogenic Substrate and Trypsin: a New Method to Study Membrane Fusion Activity in a Model System," *FEBS Lett.*, **106**, 176-180(1979).
- Keller, P. M., Person, S. and Snipes, W., "A Fluorescence Enhancement Assay of Cell Fusion," *J. Cell Sci.*, **28**, 167-177(1977).
- Gibson, G. A. and Loew, L. M., "Phospholipid Vesicle Fusion Monitored by Fluorescence Energy Transfer," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **88**, 135-40(1979).
- Owen, C. S., "A Membrane-bound Fluorescent Probe to Detect Phospholipid Vesicle-cell Fusion," *J. Membr. Biol.*, **54**, 13-20(1980).
- Vanderwerf, P. and Ullman, E. F., "Monitoring of Phospholipid Vesicle Fusion by Fluorescence Energy Transfer Between Membrane-bound Dye Labels," *Biochim. Biophys. Acta*, **596**, 302-314 (1980).
- Uster, P. S. and Deamer, D. W., "Fusion Competence of Phosphatidylserine-containing Liposomes Quantitatively Measured by a Fluorescence Resonance Energy Transfer Assay," *Arch. Biochem. Biophys.*, **209**, 385-395(1981).
- Struck, D. K., Hoekstra, D. and Pagano, R. E., "Use of Resonance Energy Transfer to Monitor Membrane Fusion," *Biochemistry*, **14**, 4093-4099(1981).
- Ellens, H., Bentz, J. and Szoka, F. C., "pH-induced Destabilization of Phosphatidylethanolamine-containing Liposomes: Role of Bilayer Contact," *Biochemistry*, **27**, 1532-1538(1984).
- Bentz, J., Düzgünes, N. and Nir, S., "Temperature Dependence of Divalent Cation Induced Fusion of Phosphatidylserine Liposomes: Evaluation of the Kinetic Rate Constants," *Biochemistry*, **24**, 1064-

- 1072(1985).
20. Park, J.-W., "Effect of Phospholipid Bilayer Phase Asymmetry on Phospholipase D Reaction-induced Vesicle Rupture," *J. Membr. Biol.*, **244**, 55-59(2011).
21. Park, J.-W., "Phase Effect of Mixed-phospholipid Layer on Phospholipase D Reaction-induced-vesicle Rupture," *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **97**, 207-210(2012).
22. Park, J.-W., "Correlation Between Composition of the Outer Layer and Phase Asymmetry for Vesicles Ruptured by Phospholipase D," *J. Membr. Biol.*, **246**, 399-405(2013).
23. Lee, G. S. and Park, J.-W., "Effect of Vesicle Curvature on Phospholipase D Reaction-induced-rupture," *Bull. Korean Chem. Soc.*, **34**, 3223-3226(2013).
24. New, R. R. C., *Liposomes: A Practical Approach*, Academic Press, New York, 66-70(1990).
25. Lide, D. R., *CRC handbook of chemistry and physics: a ready-reference book of chemical and physical data*, 85th edition, CRC Press, Boca Raton, 2005, 220-246(2005).
26. Park, J.-W., "Nanoliter Reactor Arrays for Antibiotic Study," *Bull. Korean Chem. Soc.*, **28**, 1709-1714(2007).
27. Webb, L. M., Arnholt, A. T. and Venable, M. E., "Phospholipase D Modulation by Ceramide in Senescence," *Mol. Cell Biochem.*, **337**, 153-158(2010).
28. Cheow, W. S., Chang, M. W. and Hadinoto, K., "Antibacterial Efficacy of Inhalable Antibiotic-Encapsulated Biodegradable Polymeric Nanoparticles against E. coli Biofilm Cells," *J. Biomed. Nanotechnol.*, **6**, 391-403(2010).
29. Furt, F. and Moreau, P., "Importance of Lipid Metabolism for Intracellular and Mitochondrial Membrane Fusion/fission Processes," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **41**, 1828-1836(2009).
30. Park, J.-W. and Ahn, D. J., "Temperature Effect on Nanometer-scale Physical Properties of Mixed Phospholipid Monolayers," *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **62**, 157-161(2008).
31. Schram, V., Lin, H.-N. and Thompson, T. E., "Topology of Gel-phase Domains and Lipid Mixing Properties in Phase-separated Two-component Phosphatidylcholine Bilayers," *Biophys. J.*, **71**, 1811-1822(1996).