

Coaxial Cylinder Viscometer에서 동물부유세포, CHO ecs-002의 물성 특성

이재석, 배근원, 이통일, 권혁성, 김익환
고려대학교 생명공학원 세포배양공학연구실

**Shear Characterization on Animal suspension cell, CHO ecs-002
in Coaxial Cylinder Viscometer**

Jaesuk Rhee, Gun-Won Bae, Tong-Il Lee, Hyuksung Kwon, Ik-Hwan Kim
Graduate School of Biotechnology, Korea University

서론

Bioreactor에서는 현탁액 내의 cell들에게 산소를 공급하기 위하여 agitation이 필요하다. 이것은 EPO(Erythropoietin)을 생산하는 CHO ecs-002에서도 마찬가지이다. Bioreactor의 agitation시 발생하는 shear stress는 여러 가지로 cell의 성장과 활성화에 영향을 미친다. 또한, 생체 내에서는 혈액 순환으로 인하여 발생하는 shear stress가 혈관내피세포 및 혈구 세포들에게 영향을 미쳐서 때로는 cell들을 파괴시키기도 하고, cell들의 반응을 유도하여 조직의 재생을 돕기도 한다. 따라서 bioreactor나 생체 내에서의 shear stress에 대한 최적점을 찾고, 최적점이 아닌 곳에서의 방어기능을 할 수 있는 viscosity에 대한 정량 방법을 개발하는 것이 bioreactor의 설계에 필요하며, shearing stress가 cell들에 미치는 영향에 대한 체계적인 연구는 생체시스템의 이해와 설계에 꼭 필요하다.

Figure 1은 shear stress하에서의 cell이 파괴되는 모습을 도식화한 것이다. 과거에는 Figure 1에서 보듯이 shear stress가 증가함에 따라서 cell은 더 큰 damage를 입을 것이라 생각해 왔다. 그러나, 최근의 연구에서는 cell line마다

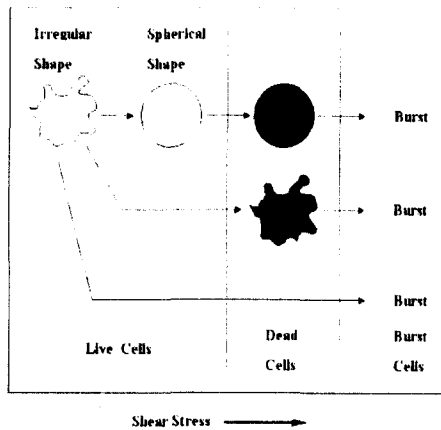


Figure 1. A schematic representation of the proposed mechanism of cell damage by shear stress.

shear stress에 대한 영향은 다르며, 오히려 low shear stress에서 cell의 damage가 큰 경우가 있었다. CHO ecs-002도 bioreactor 내에서 배지의 shear stress따라 일정하게 cell viability가 반드시 감소하는 추세가 아니라, 어떤 shear stress에서 cell viability가 안정적인 shear level이 존재했다. 이는 bioreactor가 아닌, viscometer 내에서 CHO ecs-002 활성화에 대한 기초 연구를 수행하여 증명되었다. 또한, cell viability가 좋지 않은 곳의 shear stress에서 임의로 viscosity를 높여 cell viability를 높일 수 있는 지를 밝히기 위하여, 기존의 연구에서 보고된 dextran을 사용하였다. Dextran을 배지에 대하여 weight / volume으로 용해시킨

후 osmolality를 측정하였고, cell이 일반적으로 자랄 수 있는 osmolality의 농도 이하에서 shear-free상태에서의 cell viability와 위의 cell viability가 좋지 않은 곳의 shear stress에서 각 cell viability에 대한 연구를 수행하였다. 이를 통해 shearing effect에 대한 protecting method를 제시하였다.

실험 재료 및 방법

(1) Cell line and Medium

본 실험에서는 recombinant human EPO (Erythropoietin)를 생산할 수 있는 ec1-0.02를 suspension cell로 adaptation시킨 ecs-002를 사용하였다. Medium으로는 무혈청 배지인 CHO-S-SFM II DPM (GIBCO)에 2.45 g/L sodium bicarbonate와 1% (v/v) antibiotics mixture와 MTX 0.02 μM을 첨가하여 사용하였다.

(2) Cell Culture

Cell line의 계대배양은 조직배양 플라스크(75 cm³, Nunc)를 이용하여 humidified CO₂ incubator (5% CO₂, 95% air) 안에서 37 °C로 배양했으며, 3-4일 마다 새로운 medium으로 갈아주어 cell을 계속 유지하였다.

(3) Shearing work by Viscometer

대략 8 mL cell suspension이 coaxial cylinder system을 사용한 viscometer (Haake Rheostress, RS-150, Germany)에서 정확히 조정된 shear stress를 통해 6 시간 동안 stress를 받았다. Viscometer의 shear stress range는 0 - 3.0 Pa이다.

(4) Analysis of Cell Viability

Cell number를 hemotocytometer를 이용하여 count하여서, cell viability를 측정하였다. Shear free한 상태의 viability를 100%로 control하였다.

(5) Measurement of Osmolality of Medium solution

Osmometer (Gonotec, Osmomat 030, Germany)를 이용하여, 5%, 10%, 15% (w/v)으로 dextran (AMRESCO, MW: 10,000)을 가한 medium sol.의 osmolality를 측정했다.

(6) Protecting work by Dextran

Shearing에 대한 cell viability가 약 80%인 부분의 shear stress (2.5 Pa)를 확인한 후, 각각의 medium solution에 cell을 접종시켜, 2.5 Pa로 shear stress를 주었다.

결과 및 토론

(1) Rheological Characterization of Medium

Figure 2는 재료 및 방법에서 제시한 medium의 shear stress에 대한 viscosity의 변화를 측정하여 나타낸 것이다. 이전의 보고서에서 biological media는 Non-Newtonian fluid특성을 가지고 있다는 보고가 있었는데, 이 결과는 역시 일치한다. 그러므로, CHO ecs-002가 자랄 수 있는 환경은 Newtonian factor에 의한 영향이 아닌, Non-Newtonian factor의 받는다는 것을 알 수

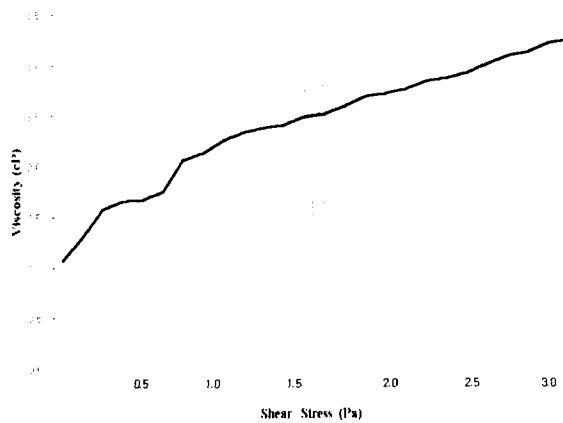


Figure 2. Viscosity change of Medium on Shear stress.

있다.

S. H. Mardikar 등(2000)과 Andreas Ludwig 등(1992)은 각각 “Optimum Shear Level”, 그리고 “Critical Shear Stress Level”이라는 용어를 사용해 Animal cell은 cell마다 shear를 받는 시간과 stress에 따라 cell viability가 높아지는 부분이 있음을 제시했다. 본 연구에서는 biological medium이 Non-Newtonian임을 이용해 이를 설명했다.

(2) Effect of Cell Viability on Shear Stress

Figure 3a에는 0~3.0 Pa 범위에서 0.5 Pa 간격으로 viscometer 내에서 shear stress를 가하여, 각 shear stress에서의 cell viability변화를 보았다.

처음에 0.5 Pa 간격으로 cell viability를 측정한 결과, Figure 3a와 같이 low shear인 0.5 Pa부분에서 cell viability의 급상승을 볼 수 있었다. 전체적인 경향으로 보았을 때, 급작스런 상승이 의심스러워서 더 낮은 0.1 Pa에서 측정해 본 결과 오히려 0.5 Pa보다 낮은 cell viability를 나타냈고, 그보다 더 낮은 0.05 Pa에서는 더 낮은 cell viability를 나타냈다 (Figure 3b).

이것은 viscous effect만을 고려하여 Figure 2와 연관지어 보았을 때, 0.1~1 Pa사이에서의 shear stress증가에 따른 viscosity의 증가는 그 shear stress에 대해 CHO ecs-002의 membrane이 방어하기 좋은 영향을 보이지만, 1 Pa보다 더 커질수록 계속 viability가 떨어지는 것은 viscosity가 shear stress의 증가에 대해 cell membrane이 방어할 수 있을 만큼의 viscosity를 가지지 못하기 때문이다. 이것은 아주 낮은 shear stress에서도 마찬가지다.

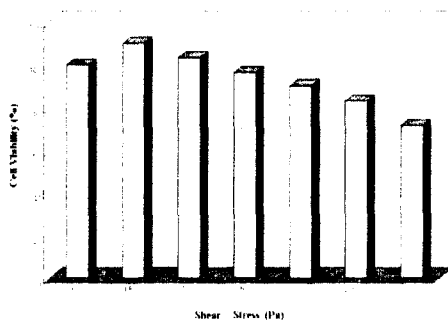


Figure 3a. Viability of CHO ecs-002 sheared by constant shear stress during 6 hours.

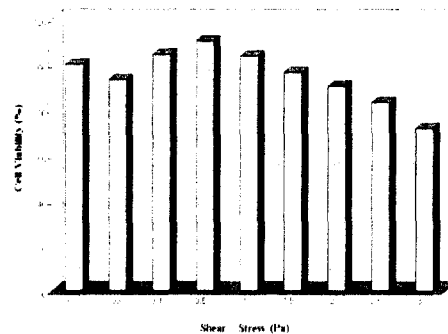


Figure 3b. Viability of CHO ecs-002 sheared by constant shear stress during 6 hours. (including 0.05 and 0.1 Pa)

(3) Effect of Cell Viability on Viscous Medium

Table 1은 dextran을 medium에 weight per volume으로 5%, 10%, 15%로 만들어, 그때의 medium의 osmolality를 측정했고, 2.5 Pa에서의 Viscosity를 측정 한 것을 나타냈고, shear-free한 상태에서 osmolality에 대한 cell의 viability를 측정 한 다음, 2.5 Pa로 shear stress를 가하여, cell viability를 측정 한 결과이다.

Osmolality가 387이 된 15%에서는 이미 shear-free상태에서도 cell viability가 약 30%정도밖에 되질 않았다. 5%와 10%에서는 shear-free한 상태나 shear stress를 가한 경우나 높은 viability를 보였다.

다른 영향을 제외한 shear stress와 viscous effect로만 보았을 때, 임의의 shear stress를 가하여 agitating을 하고 있는 bioreactor에서 cell viability가 떨어

어진다면, viscosity를 높여 줄 수 있는 물질을 cell membrane의 영향을 주지 않을 최소한의 농도로 맞추어 녹인다면 상당히 좋은 효과를 보일 수 있을 것이다.

앞으로 DO (dissolved oxygen) factor도 간과할 수 없을 것이며, cell viability뿐만 아니라, productivity에서도 좋은 수율을 얻을 수 있는 shear stress level과 viscosity를 수학적 방법으로 정량 해야 할 것이다.

Table 1. The Viscous Effect of Culture Medium as Concentration of added Dextran. (Viability A is the Cell Viability on Shear-free. Viability B is the Cell Viability sheared on 2.5 Pa.)

Added Dextran (% w / v)	Osmolality (mOsmol/kg)	Viscosity (cP)	Viability A (%)	Viability B (%)
0	318	2.875	100	83.13
5	337	3.343	101.22	99.59
10	358	3.939	98.85	96.74
15	387	4.526	30.55	10.82

참고문헌

1. Andreas Ludwig, Gerlinde Kretzmer and Karl Schügerl: "Determination of a 'critical shear stress level' applied to adherent mammalian cells" (1992), *Enzyme Microb. Technol.* **14** ;209-213
2. G. Kretzmer and K. Schügerl: "Response of a mammalian cells to shear stress" (1991), *Appl Microbiol Biotechnol.* **34** ;613-616
3. Ibrahim Abu-Reesh and F. Kargi: "Biological responses of hybridoma cells to hydrodynamic shear in an agitated bioreactor" (1991), *Enzyme Microb. Technol.* **13** ;913-919
4. Ik-Hwan Kim, Moo H. Cho, and Shaw S. Wang: "Measurement of hydrodynamic shear by Using a Dissolved Oxygen Probe" (1993), *Biotechnol. Bioeng.* **41** ;296-302
5. Joon Soo Ryu, Tae Kyung Kim, Joo Young Chung, Gyun Min Lee: "Osmoprotective Effect of Glycine Betaine on Foreign Protein Production in Hyperosmotic Recombinant Chinese Hamster Ovary Cell Cultures Differs Among Cell Lines" (2000), *Biotechnol. Bioeng.* **70** ;167-175
6. L. A. van der Pol, I. Pajens, J. Tramper: "Dextran as protectant against damage caused by sparging for hybridoma cells in a bubble column" (1995), *Journal of Biotechnol.* **43** ;103-110
7. Leo van der Pol and Johannes Tramper: "Shear sensitivity of animal cells from a culture-medium perspective" (1998), *TIBTECH AUGUST* **16** ;323-328
8. M. Al-Rubeai, R. P. Singh, M. H. Goldman, A. N. Emery: "Death mechanisms of animal cells in conditions of intensive agitation" (1995), *Biotechnol. Bioeng.* **45** ;463-472
9. S. H. Mardikar, K. Niranjana: "Observations on the shear Damage to Different Animal cells in a Concentric cylinder viscometer" (2000), *Biotechnol. Bioeng.* **68** ;697-704
10. Sanjay Lakhotia and Eleftherios T. Papoutsakis: "Agitation Induced Cell Injury in Microcarrier Cultures. Protective Effect of Viscosity Is Agitation Intensity Dependent: Experiments and Modeling" (1992), *Biotechnol. Bioeng.* **39** ;95-107
11. Waheed A. Al-Masry: "Effect of Scale-Up on Average Shear Rates for Aerated Non-Newtonian Liquids in External Loop Airlift Reactors" (1999), *Biotechnol. Bioeng.* **62**, **4** ;494-498