

# 마이크로 유체 칩을 이용한 세포행태에 관한 연구

박종열\*, 이상훈†

## Cell behavior study using microfluidic chip

Joong Yull Park\*, Sang-Hoon Lee†

**Key Words :** Microfluidics (미소유체), Cell behavior (세포행태), Concentration gradient (농도구배)

### Abstract

In the conventional biology, the most of cell studies was carried out by culturing cells in the Petri dish and by investigating cellular behavior under the diverse bio-molecule (cell signalling materials, drugs or etc.) conditions. However, in vivo environments, diverse stimulations including chemical, mechanical and topological environments involved in the proliferation, differentiation and migration of cells and it is almost impossible to provide these conditions with traditional method. We have developed the methods to provide the well defined chemical and mechanical stimulations using microfluidic devices and applied these approaches to the study of environmental effect on cells. In this paper, we will introduce our microfluidic chips to provide microenvironment and its applications using several cells.

### 1. 서론

기존의 생물학 분야에서의 세포 연구는 Petri dish 에 세포를 대량으로 배양한 다음 다양한 세포신호 관련 물질이나 생화학물질 등을 인가하여 세포의 행태를 보는 것이었다. 그러나 실제 체내에서 세포는 다양한 종류의 자극들을 받아 환경에 적응하며 모양(morphology)의 변화, 세포 증식(proliferation), 분화(differentiation), 이동(migration) 등의 반응을 한다. 기존의 전통적인 접근으로는 이러한 microenvironment 를 세포에 제공하는 것은 거의 불가능하였다. 그러나 최근의 BioMEMS (Bio Micro-Electro-Mechanical Systems) 관련 기술 발전과 다양한 마이크로 유체 제어 방법의 개발로 인해 훨씬 다양한

microenvironment 를 만드는 것이 가능하게 되었다 [1-3]. 본 연구진은 마이크로 유체 칩을 이용하여 세포에 다양한 화학 및 기계적인 자극을 인가할 수 있는 방법을 개발하였으며, 이를 이용하여 세포 행태의 변화에 대한 다양한 연구를 진행하였다. 본 고에서는 이 중 다음과 같은 두 가지의 마이크로 유체 칩 기반으로 microenvironment 를 구현하는 방법을 소개하고, 여러 세포를 사용한 세포의 반응을 관찰한 결과를 이야기하고자 한다.

소개 될 두 가지 연구는 (1) 마이크로 칩 내의 세포 배양 및 다양한 화학적 농도 구배(gradient) 제공 방법과 (2) Extracellular Matrix (ECM)의 형태적 변화에 따라 세포가 받는 영향에 관한 것이다. 화학적 농도 구배는 마이크로 채널 내에서 두 가지 서로 다른 물질을 층류 유동으로 흘리게 될 때 두 물질의 계면에서 확산에 의해 이루어진다. 이때 유동을 구동하는 동력을 얻기 위하여 삼투압 원리를 적용하였다. 한편, 사용된 ECM 의 형태로는 마이크로 크기의 concave 와 convex 구조를 사용하였다. 마이크로 구조물을 제작하기 위한 대표적인 방법은 반도체 공정[4]을

---

†\* Department of Biomedical Engineering, College of Health Science, Korea University

E-mail : dbiomed@korea.ac.kr  
TEL : (02) 940-2881 FAX : (02) 921-6818

이용하는 것이지만, 이러한 곡면구조를 반도체 공정으로 제작하는 것은 많은 비용과 고도의 공정기술이 필요하다. 본 논문에서는 이러한 마이크로 곡면구조를 반도체 공정의 도움 없이 간단하게 제작할 수 있는 방법도 간단하게 소개하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 화학적 농도 gradient 생성용 유체 칩

#### 2.1.1 유체 칩의 원리 및 제작

세포의 chemotaxis 현상(세포가 특정 생화학적 분자들을 감지하고 이동하는 현상)을 관찰하기 위한 gradient 생성용 유체 칩의 원리는 Fig. 1(a)과 같다. 폭이 수백  $\mu\text{m}$  인 T-channel의 양 입력단에 다른 농도의 용액을 주입하거나 한 용액과 buffer 용액을 각각 매우 느린 속도( $< 10 \mu\text{m/s}$ )로 주입한다. 일반적으로 두 용액을 저속으로 주입하기 위해서는 매우 복잡한 주변장치와 전력이 필요하지만 본 연구에서는 삼투압을 이용한 펌프(Osmosis Pump: 이 후 O-Pump)를 제안하여 이용하였다. O-Pump의 구조는 Fig. 1(b)와 같으며, 삼투압의 발생은 PEG (polyethylene glycol)를 이용하였고, 농도차이를 유지하는 membrane 으로는 셀룰로스 막을 사용하였다. 막 사이에 두고 양 단의 농도 차이에 의해 칩의 입력 단에 있는 용액은 서서히 채널 내부로 이동하며, 두 용액(A 와 B) 사이에 경계면(interface)가 발생한다. 그러나 삼투압에 의한 저속유동 하에서는 경계면에서 확산에 의해 두 유체의 혼합이 일어나게 되며, Fig. 1(a)와 같이 입력 유체의 농도 gradient가 발생하게 된다. 유체 칩 제작을 위해 softlithography를 이용하여 PDMS (polydimethylsiloxane)에 채널을 제작하고 이를 유리 기판 위에 접착하여 완성하였다.

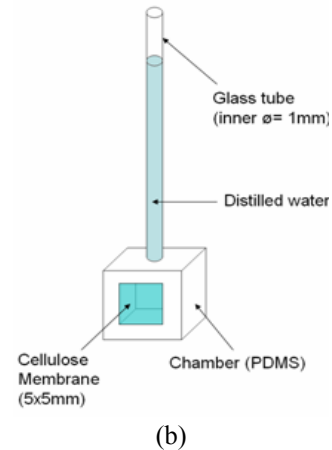
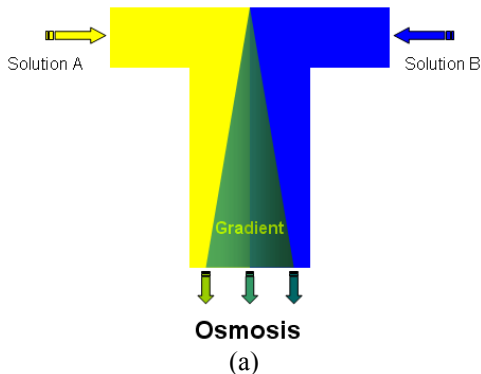


Fig. 1 (a) Gradient 생성 유체 칩의 원리와 모식도. (b) O-Pump의 구조.

#### 2.1.2 유체 칩 내에서의 유체 해석

유체의 해석은 FVM (finite volume method)기반의 상용코드인 FLUENT (ver. 5.5)를 사용하였다. 유체 칩에 사용되는 용액 A와 B는 비압축성, Newtonian, 물의 물성치(밀도:  $998.2 \text{ kg/m}^3$ , 점성:  $0.001 \text{ kg/m-s}$ )를 갖는다고 가정하였다. 유동-압력 장은 Navier-Stokes 방정식으로 계산되었으며 이때 다음과 같은 확산식이 적용되었다.

$$\nabla \cdot (\rho \bar{v} Y_i) = -\nabla \cdot \bar{J}_i \quad (1)$$

$\rho$ 는 밀도,  $\bar{v}$ 는 속도벡터,  $Y_i$ 는 species  $i$ 의 mass fraction,  $\bar{J}_i$ 는 species  $i$ 의 diffusion flux인데, 층류 유동에서 Fick's law에 의해 다음과 같이 표현된다.

$$\bar{J}_i = -\rho D_i \nabla Y_i \quad (2)$$

$D_i$ 는 확산계수이다.

#### 2.1.3 유체 칩 내에서의 세포 배양

인간 성체 줄기세포 (human Mesenchymal Stem Cell; hMSC)를 사용하였다. 세포는 기증받았으며 고려대학교병원 IRB의 인증절차를 거쳤다 (IRB No. KUMC2007-006). hMSCs는  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 의 인큐베이터에서 배양되었으며 사용된 배지는 10% FBS (Gibco)와 1% antibiotics (Gibco)가 혼합된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco)이었다. 유체 칩 내에 세포는 약  $5 \times 10^5$  cells/mL의 농도로 주입되었다. Fig. 1(a)에 보인 바와 같이 용액 A와 B가 주입되었다 (A: 30% FBS가 혼합된 배지, B: FBS가 전혀 없는 배지).

### 2.2 Concave와 convex 구조를 갖는 ECM

### 2.2.1 Concave 와 convex 구조물 pattern 제작

PDMS 를 5000 rpm 으로 spin coating 하면 매우 얇은 멤브레인을 얻을 수 있다. PDMS 의 Young's modulus 는 약 500 kPa 이고 Poisson ratio 는 0.5 정도로써 탄력이 좋으며 잘 찢어지지 않는다 [5]. 이와 같은 재료적 특성은 이 연구에 사용하기 위한 가공에 매우 적합하다. Fig. 2 는 이 성질을 이용하여 convex mold 를 가공하는 방법을 나타낸다.

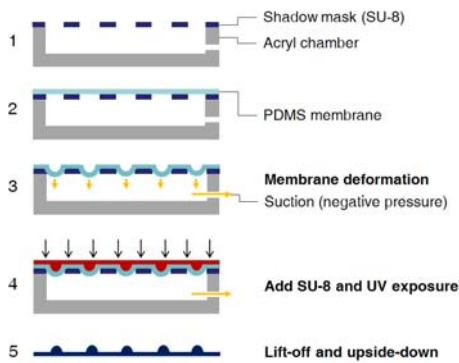


Fig. 2 Convex mold 의 제작 과정.

우선 마이크로 사이즈의 구멍이 뚫려있는 기관과 아크릴로 제작된 압력장치를 만든다. 그 위에 얇게 가공된 PDMS 멤브레인을 올려놓은 후 아크릴 장치의 구멍으로 통하여 음압을 가하면 PDMS 의 변형에 의해 concave 형상을 얻을 수 있고 이 위에 SU-8 을 부은 후 UV 를 조사하면 convex mold 를 얻을 수 있다. 이를 이용하여 concave mold 를 제작할 수 있다.

### 2.2.2 세포 배양 및 행태 관찰

쥐의 섬유아세포(fibroblast, cell line - L929)을 사용하였다. 세포는 ATCC 에서 구입하였다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 의 인큐베이터에서 배양되었으며 사용된 배지는 10% FBS (Gibco)와 1% antibiotics (Gibco)가 혼합된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco)이었다. 준비된 concave/convex pattern 위에 3 × 10<sup>2</sup> cells/mm<sup>2</sup> 정도의 세포를 seeding 한 후 세포의 행태를 관찰하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 Gradient 유체 칩과 세포의 변화

#### 3.1.1 농도장 실험 및 시뮬레이션 결과

제작한 유체 칩은 Fig. 3(a)와 같이 구성이 되어있다. 그리고 실험을 통하여 서로 다른 두

용액이 main channel 에서 확산에 의해 gradient 가 생성되는 것을 확인하였다 (Fig. 3(b)).

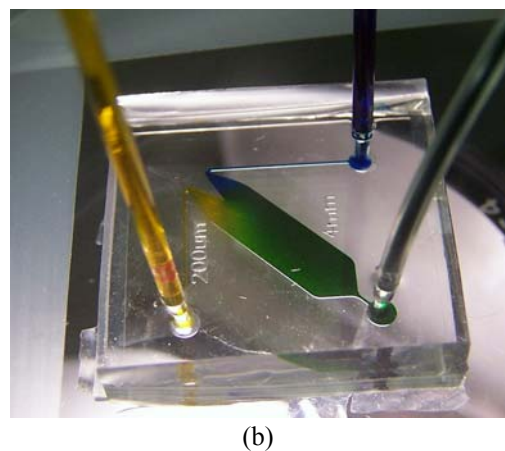
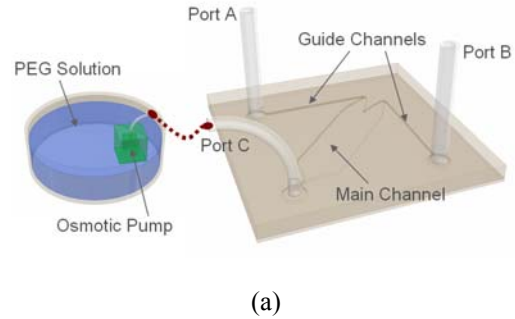
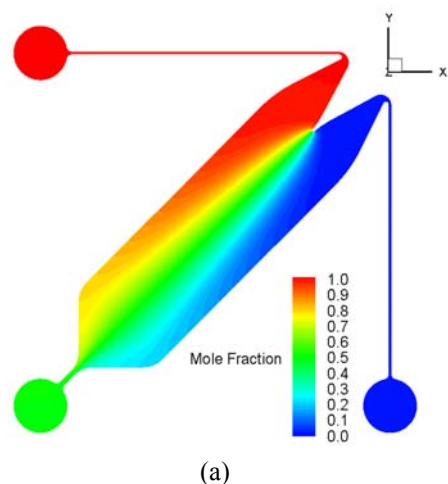
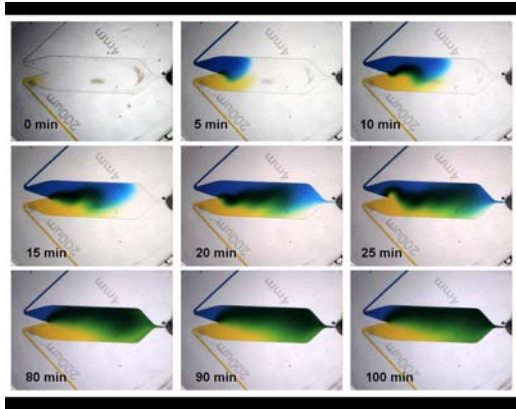


Fig. 3 (a) 제작된 유체 칩의 원리 (O-pump 는 스케일이 과장되었음). (b) 염료를 이용한 장치의 실험.

보다 정확한 농도장 예측을 위하여 시뮬레이션을 수행하였다. 앞서 언급한 대로 Fluent 프로그램을 이용하였으며, 확산을 계산하는 방정식 Eq. (1)이 적용되었다. Fig. 4(a)와 같은 시뮬레이션 결과를 얻었다.





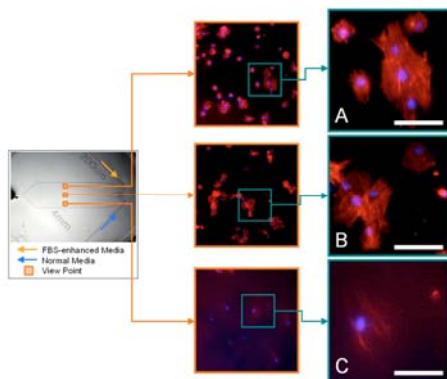
(b)

**Fig. 4** (a) 시뮬레이션 결과. (b) 시뮬레이션 조건과 동일한 실험의 결과 (PEG 0.082 M 사용).

이로써, 우리가 제안한 장치가 매우 저속유동을 제어할 수 있으며 이 현상을 마이크로 유체 칩에 적절히 적용하여 다양한 농도 gradient 를 얻을 수 있음을 확인하였다. 또한 필요한 농도장/유동장을 미리 가상 구현해 볼 수 있는 CFD 모델도 개발하였다.

### 3.1.2 Gradient 내에서의 hMSC 의 변화

앞서 검증된 유체 칩 내에서 줄기세포를 배양하였다. Fig. 5 에 보인 바와 같이 port A 에는 FBS 가 포함된 배지를 흘리고, port B 에는 영양성분이 전혀 없는 배지를 흘려보았다. 이와 같은 실험을 통하여 줄기세포가 바닥에 달라붙는 초기에서의 영양분 공급이 얼마나 중요한가에 대한 검증을 하였다.



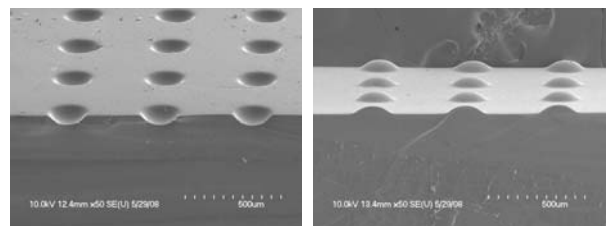
**Fig. 5** FBS 농도의 gradient 에 따른 세포의 양태 변화. 염색 세포사진.

약 6 시간 동안 배지를 흘려 보내준 실험의 결과 Fig. 5 와 같은 뚜렷한 차이를 볼 수 있었다. 농도 gradient 에 따라 세포의 개수뿐만 아니라, 세포의 크기도 큰 영향을 받음을 알 수 있었다.

## 3.2 마이크로 3D 구조물과 세포 형태변화

### 3.2.1 SEM 사진

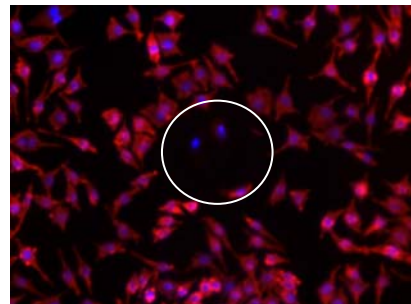
PDMS membrane 과 압력을 이용하여 concave 와 convex 몰드를 제작하였다 (Fig. 6). 압력의 세기와 shadow mask 의 pattern 을 조절하면 다양한 지름과 깊이의 마이크로 구조물의 array 를 편리하게 얻을 수 있다. 또한 한번 제작된 pattern 을 몰드로 이용하면 손쉽게 여러 개의 같은 pattern 을 얻을 수 있다.



**Fig. 6** 마이크로 concave(좌)/convex(우) pattern 의 SEM 사진.

### 3.2.2 L929 세포의 형태

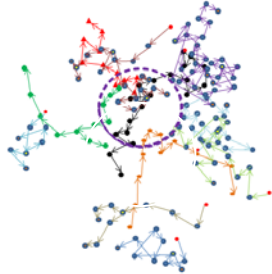
세포는 다양한 자극에 영향을 받는 것으로 알려져 있지만, 아직까지 마이크로 크기의 곡면에서의 세포 반응은 보고된 바가 없다. 이 연구에서는 세포보다 약 2 배 이상 큰 크기의 3 차원 곡면 구조물이 세포의 양태/행태에 미치는 영향을 점검하였다. Fig. 7 은 세포가 concave 구조물의 바깥쪽에 잘 자라고 있으나 구조물 내에서는 그 개체수가 뚜렷하게 감소함을 잘 보여주는 그림이다. 즉 세포는 자신의 형태를 negative curvature 를 유지하게 하는 곡면에서는 잘 자라지 않는다.



**Fig. 7** 마이크로 concave 구조물에서의 세포의 형태. 실선 원은 구조물의 외경 (200  $\mu$ m). 염색 세포사진.

이것을 뒷받침하는 또 다른 결과는 Fig. 8 에서 확인할 수 있다. 이것은 세포의 자라는 동안

time-lapse 촬영 기법을 이용하여 10 분 간격으로 촬영하고, 약 3-4 시간 간격으로 세포의 경로를 추적한 그림이다. 세포들이 다양한 움직임을 보이지만, 전체적으로 concave 구조물에 들어가지 않으려는 움직임을 뚜렷이 확인할 수 있었다.



**Fig. 8** 마이크로 concave 구조물에서의 세포의 이동경로. 점선 원은 구조물의 외경.

#### 4. 결 론

우리는 마이크로 칩 기술을 이용하여 다양한 생물학적 실험을 수행 할 수 있었다. Gradient 를 제어할 수 있는 마이크로 유체 칩을 개발하여, hMSC 가 초기의 영양분에 어떤 반응을 보이는가에 대해 분석할 수 있었으며, 마이크로 구조물에서의 L929 세포가 반응하는 것을 확인하고, negative curvature 에 대한 기피성을 유추해 낼 수 있었다. 이러한 마이크로 유체 칩 기술을 이용하면, 향후, 다른 세포 생물학에서의 응용이 매우 다양하게 이루어 질 수 있을 것이다.

#### 후 기

This study was supported by a grant of the Korea Healthcare technology R&D Project, Ministry for Health, Welfare and Family Affairs, Republic of Korea (A040032), and the NRL (National Research Lab) program, the Korea Science and Engineering Foundation (KOSEF), Republic of Korea (R0A-2007-000-20086-0).

#### 참고문헌

- (1) El-Ali, J., Sorger, P. K., & Jensen, K. F., 2006, "Cells on Chips," *Nature*, Vol. 442, pp. 403-411.
- (2) Breslauer, D. N., Lee, P. J., & Lee, L. P., 2006, "Microfluidics-Based Systems Biology," *Molecular Biosystems*, Vol. 2, pp. 97-112.
- (3) Whitesides, G. M., Ostuni, E., Takayama, S., Jiang, X. Y., & Ingber, D. E., 2001, "Soft Lithography in Biology and Biochemistry," *Annual Review of Biomedical Engineering*, Vol. 3, pp. 335-373.
- (4) Moreau, W. M. (1988) *Semiconductor Lithography : Principles, Practices, and Materials* (Plenum Press, New York).

- (5) Mark, J. E. (1999) *Polymer Data Handbook* (Oxford University Press, New York).