

세포의 이동성 관찰을 위한 PDMS 채널 제작 및 평가 Development of Microfluidic device for Evaluating Cell Migration

*김명준¹, 채기운², 진송완¹

*M. J. Kim¹, K. W. Chae², #S. W. Jin(songwan@kpu.ac.kr)¹

¹ 한국산업기술대학교 기계공학과, ³ 한국산업기술대학교 지식기반기술-에너지대학원

Key words : Cell Migration, Microfluidic Device, PDMS Channel, Wound Healing

1. 서론

세포이동 (Cell migration)은 신생혈관 생성, 암 전이, 조직의 발생 및 분화, 손상조직 재생 등과 같은 생물학적 현상에 직접적으로 연관되어 있는 과정으로 복잡한 생화학 및 생체역학인 과정을 통하여 이루어 진다 [1]. 그러므로 세포이동과 관련된 연구는 암이나 신생혈관 생성과 관련된 질병인 노화에 따른 시력감퇴나 류머티스성 관절염과 같은 질병에 대한 새로운 치료제나 치료방법을 제시할 수 있을 것이라 기대 할 수 있다. 이와 같은 중요성으로 인하여 많은 연구자들이 세포이동에 관심을 가지고 연구를 진행하고 있다.

특히 특정 화학약품이나 세포 내 단백질이 세포이동에 미치는 영향에 대한 세포 주화성 연구는 세포이동과 관련된 신약개발 및 신약의 새로운 타겟을 찾기 위한 기본적인 연구라 할 수 있다 [2][3]. 세포 주화성을 평가하기 위한 실험 방법으로는 상처치유 능력 실험 [4], 아가로스 젤을 이용한 실험, Zigmond 챔버 [5], Dunn 챔버 [6], Boyden 챔버가 있으며 이 중 상처치유 능력 실험과 Boyden 챔버가 널리 이용되고 있다. 하지만 이러한 방법들은 다른 방법을 사용하는 연구자들 간의 결과를 비교하기 힘들고 데이터화하기 힘들어 관찰자의 주관적 판단이 개입될 여지가 많으며 이동 중인 개별 세포를 관찰하기 어렵다는 문제가 있다. 게다가 이러한 문제점과 함께 기존 방법의 경우 연구자의 노동력이 많이 필요할 뿐 아니라 자동화 하기 힘든 과정들을 거쳐야 하기 때문에 세포이동과 관련된 HTS (High Throughput Screening) 장치에 적용하기 어렵다는 문제 또한 가지고 있다. 이러한 문제점으로 인하여 체계적이고 간편한 세포이동 관찰을 위한 장치의 개발 및 실험방법의 개선이 요구되고 있다.

PDMS 채널로 대표되는 미소유체장치는 그 개념이 제안된 이래로 많은 발전을 거듭해 나가고 있으며 적용 범위를 점점 넓혀 나가고 있다. 특히 PDMS 채널은 만들기 비교적 간편하고 디자인이 확립되고 나면 생산하는데 비용이 적게 들며 생체물질에 적합하고 투명하여 관찰이 용이하다는 장점이 있어 생물학적 실험에 훌륭하게 이용될 수 있다.

한편, 조직 내에서의 세포이동은 혈관의 세포이동 환경과는 차이가 있는데 두 세포이동 환경의 가장 큰 차이점은 세포의 변형과 세포에 작용하는 유동 전단력이라 할 수 있다. 혈관 내에서 이동하는 세포의 경우 혈류에 의해 전단력을 반복적으로 받고 있으며 세포의 이동 공간이 충분하게 확보되어 세포 형상의 큰 변화 없이 이동이 가능하지만 조직 내에서의 이동은 전단력을 받고 있지 않다. 조직 내 세포이동의 다른 특징은 세포의 이동 공간이 충분하지 않다는 것이다. 이로 인하여 세포의 형상이 잘 변형되어야 세포 이동이 활발하게 이루어 질 수 있으며 Auguste 등 (2007)의 실험결과에 따르면 세포 이동이 활발한 경우 세포의 가로 길이와 세로 길이의 비를 나타내는 장단비 (Elongation factor)가 더 크다는 것을 알 수 있다.

본 논문에서는 미소유체기술을 이용하여 제작한 PDMS 구조물을 이용하여 세포의 형상이 변화하여야 이동할 수 있는 조건을 효과적으로 모사할 수 있는 실험 장치를 개발하여 세포이동 실험에 적용하고 테스트하였다. 이러한 연

구는 세포이동 시 개별 세포에서 일어나는 현상을 자세히 관찰할 수 있는 방법을 제시할 수 있을 것이라 예상할 수 있다. 이 뿐 만 아니라 개발된 세포이동 관찰 장치는 향후 세포이동과 관련된 신약개발을 위한 HTS 시스템에도 적용될 수 있을 것이라 예상된다.

2. 실험 방법

본 연구에서 사용되는 세포이동 관찰 장치는 기본적으로 두 개의 챔버와 두 챔버를 이어주는 마이크로 채널로 구성되어 있다. 다양한 크기의 채널을 테스트 해 보기 위하여 채널의 폭을 20, 30 μ m, 길이를 5, 8, 15, 20 μ m로 제작하였으며 채널의 주변에는 채널 주변에서 발생하는 처짐을 방지하고자 기둥을 배치하였다(Fig. 1). 채널의 깊이는 10~15 μ m 이며 챔버를 제작하기 위한 몰드 제작은 Korea Bio-IT Foundry Center 에서 Deep-RIE 공정을 사용하여 제작되었다. 채널 형상 및 챔버가 양각 되어있는 몰드에 PDMS 를 부어준 뒤 70 $^{\circ}$ C에서 1 시간 이상 굳힌다. 이 때 PDMS 와 몰드가 완전히 붙어 떨어지지 않는 문제점을 방지하기 위하여 몰드를 Tridecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrooctyl-1-trichlorosilane 으로 코팅하였다. 완전히 굳은 PDMS 구조물을 몰드에서 떼어낸 뒤 슬라이드 글라스에 부착시켜 챔버를 제작하였다.

본 실험에 사용된 세포는 Human Embryonic Kidney 세포주(HEK-293)로 인간의 신장배아세포이며 여러 세포 이동 실험에 사용되어 왔다. HEK-293 세포의 세포주는 한국세포주은행(cellbank.snu.ac.kr)으로부터 분양 받았으며 DMEM 에 10% Fetal Bovine Serum (Gibco, U.S.A.)과 1% Penicillin 을 보강한 배지에 CO₂ 5%, 37 $^{\circ}$ C의 조건을 유지하는 인큐베이터에서 배양하였다.

3. 결과 및 토의

연구에 사용된 세포의 이동성을 확인하고 마이크로 채널을 이용한 실험의 비교 자료로 사용하기 위하여 상처회복 능력 실험을 진행하였다. 포화도가 90% 이상으로 배양된 유리 용기에 멸균된 주사기 바늘을 사용하여 Fig.2(a)와 같이 상처를 내었다. 이러한 용기에 배양액을 새로 첨가하고 인큐베이터에서 24 시간 동안 배양한 후 동일 위치를 관찰하였다. Fig.2 (b) 에서 관찰할 수 있듯이 약 24 시간 후에 초기 상처가 세포 이동으로 채워지는 것을 알 수 있었

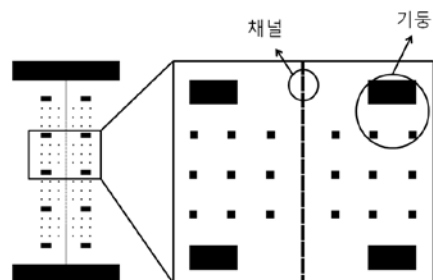


Fig. 1 Mold drawing

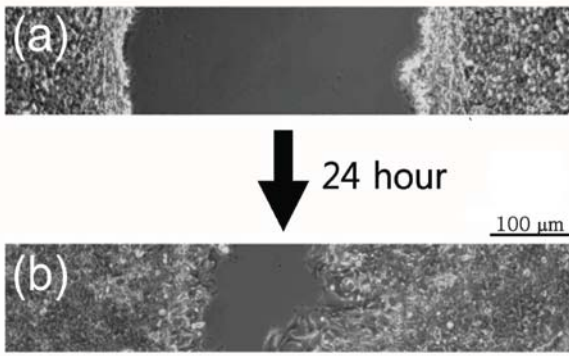


Fig. 2 Wound healing assay. (a) 0 hour. (b) 24 hours after. Scale bar: 100µm

다. 총 4 회의 상처회복 실험을 하여 세포의 이동 속도를 측정된 결과 세포의 평균 이동 속도는 약 6.74 µm/h 임을 알 수 있었다. 하지만 이러한 상처회복 능력 실험은 Fig. 2 에서 볼 수 있듯이 세포의 이동 면이 고르지 못할 뿐 아니라 균일한 폭의 상처를 만들기 힘들어 세포의 이동 속도를 정확하게 측정하기 힘들고 세포 이동의 방향성을 관찰할 수 없다는 단점이 있다.

앞서 제작한 미소유체장치를 이용하여 마이크로 채널 내 세포 이동을 관찰하였다. 몰드를 이용하여 제작된 PDMS 구조물에 조각도를 이용하여 두 개의 구멍을 내어 세포가 배양될 수 있는 공간 및 배양액을 보관하는 공간을 확보하는 한 후 PDMS 구조물과 슬라이드 글라스를 플라즈마에 노출시킨 후 접합하여 최종 챔버를 만들었다. 최종 챔버의 형상은 조각도로 만든 두 개의 구멍 즉, 챔버를 29 개의 마이크로 채널로 연결하고 있는 형태이다. 이러한 양 챔버에 세포 배양액을 채우고 챔버를 연결하는 채널 내에 기포가 없음을 확인한 후 한 쪽 챔버에만 세포를 파종하여 인큐베이터 내에서 배양하였다. 파종된 세포는 넓은 공간이 확보된 챔버에 머물러 있다가 개체수가 많아짐에 따라 점차 마이크로 채널 주변으로 접근하게 된다. 배양 챔버에서는 세포 수가 많아짐에 따라 배양 챔버 내 영양분이 감소하게 되고 이산화탄소 또한 증가되는 반면 세포가 파종되지 않은 다른 챔버 내의 배양액은 상대적으로 세포가 배양되기 좋은 조건을 유지하게 된다. 이러한 배양액이 마이크로 채널을 통하여 배양 챔버로 공급되고 세포는 상대적으로 배양 조건이 양호한 반대편 챔버로 마이크로 채널을 통하여 이동하게 된다. Fig. 3 은 이렇게 이동하고 있는 세포를 보여주고 있다. 그림에서 보이는 채널은 폭 15 µm, 길이 20 µm 크기의 채널이다. 배양되는 세포의 크기는 균일하지 않기 때문에 일부 세포는 채널의 크기보다 작아 채널을 모두 채우지 않고 이동하는 경우도 있지만 대부분의 경우 세포의 크기가 채널보다 크기 때문에 Fig. 3 과 같이 채널을 꽉 채우며 이동하게 된다. Fig. 3 에 나타난 세포의 앞 부분의 이동 속도는 2.87 µm/h 로 앞서 수행한 상처회복능력 실험

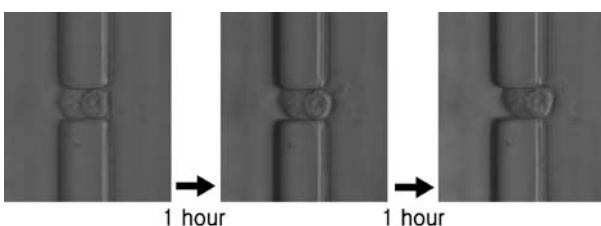


Fig. 3 Cell migration in the microchannel

험에서 측정된 세포의 이동 속도인 6.74 µm/h 보다는 느린 값이지만 이는 세포 하나의 이동 속도이므로 채널 내에서 이동하는 경우 세포의 이동 속도가 더 느리다고 일반화 할 수는 없다.

4. 결론

본 연구에서는 한정된 공간에서 일어나는 세포이동을 효과적으로 관찰할 수 있는 미소유체장치를 제작하였으며 이를 이용하여 세포이동 실험을 수행하였다. 본 연구에서 제작된 챔버는 이동하고 있는 개별 세포를 관찰할 수 있을 뿐 아니라 세포의 전단부와 후단부가 명확하게 구분되어 이동 중에 각 위치에서 일어나는 현상을 관찰할 수 있다는 장점이 있다. 또한 세포가 이동하는 마이크로 채널의 크기를 정밀하게 조절할 수 있기 때문에 세포의 변형률과 세포 이동 속도와의 관계를 관찰하는 연구에 응용하거나 세포가 파종되지 않은 챔버에 세포 유인 물질이나 기피제를 첨가하여 이에 따른 효과를 관찰할 수 있을 것이다. 하지만 본 챔버는 개별 세포를 관찰하여 세포의 이동 현상을 면밀하게 관찰할 수 있다는 장점이 있는 반면 개별 세포에서 관찰할 결과를 일반화 하기 위해서는 많은 수의 세포를 관찰하여야 한다는 단점이 있을 수 있다.

후기

이 논문은 2008 년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구 조성사업비)으로 학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었으며(KRF-2008-331-1-D00081), 이에 관계자 여러분께 감사드립니다.

참고문헌

1. Huttenlocher, A., Sandborg, R. R., Horwitz, A. F., "Adhesion in Cell Migration," *Current Opinion in Cell Biology*, **7**, 697-706, 1995.
2. Saadoun, S., Papadopoulos, M. C., Hara-Chikuma, M., and Verkman, A. S., "Impairment of Angiogenesis and Cell Migration by Targeted Aquaporin-1 Gene Disruption," *Nature*, **434**, 786-792, 2005.
3. Auguste, K. I., Jin S., Uchida, K., Yan, D., Manley, G. T., Papadopoulos, M. C., and Verkman, A. S., "Greatly Impaired Migration of Implanted Aquaporin-4-Deficient Astroglial Cells in Mouse Brain Toward a Site of Injury," *Faseb Journal*, **21**, 108-116, 2007.
4. Motegi, S., Okazawa, H., Ohnishi, H., Sato, R., Kaneko, Y., Kobayashi, H., Tomizawa, K., Ito, T., Honma, N., Buhning, H. J., Ishikawa O., and Matozaki, T., "Role of the CD47-SHPS-1 System in Regulation of Cell Migration," *The EMBO Journal*, **22**, 2634-2644, 2003.
5. Hannigan, M., Zhan, L., Li, Z., Ai, Y., Wu, D., Huang, C. K., "Neutrophils Lacking Phosphoinositide 3-Kinase Show Loss of Directionality during N-Formyl-Met-Leu-Phe-Induced Chemotaxis," *PNAS*, **99**, 3603-3608, 2002.
6. Zicha, D., Dunn, G. A., and Brown, A. F., "A New Direct-Viewing Chemotaxis Chamber," *Journal of Cell Science*, **99**, 769-775, 1991.