

마이크로유체 신장칩 기술

이 글에서는 마이크로 유체 기술을 이용해 효과적으로 생체 내 신장 환경을 모사하고 이를 통해 신장 세포배양과 신장 기능 연구를 위한 신장 세포용 칩 제작 기술에 대해 소개하고자 한다.

서갑양 서울대학교 기계항공공학부, 부교수

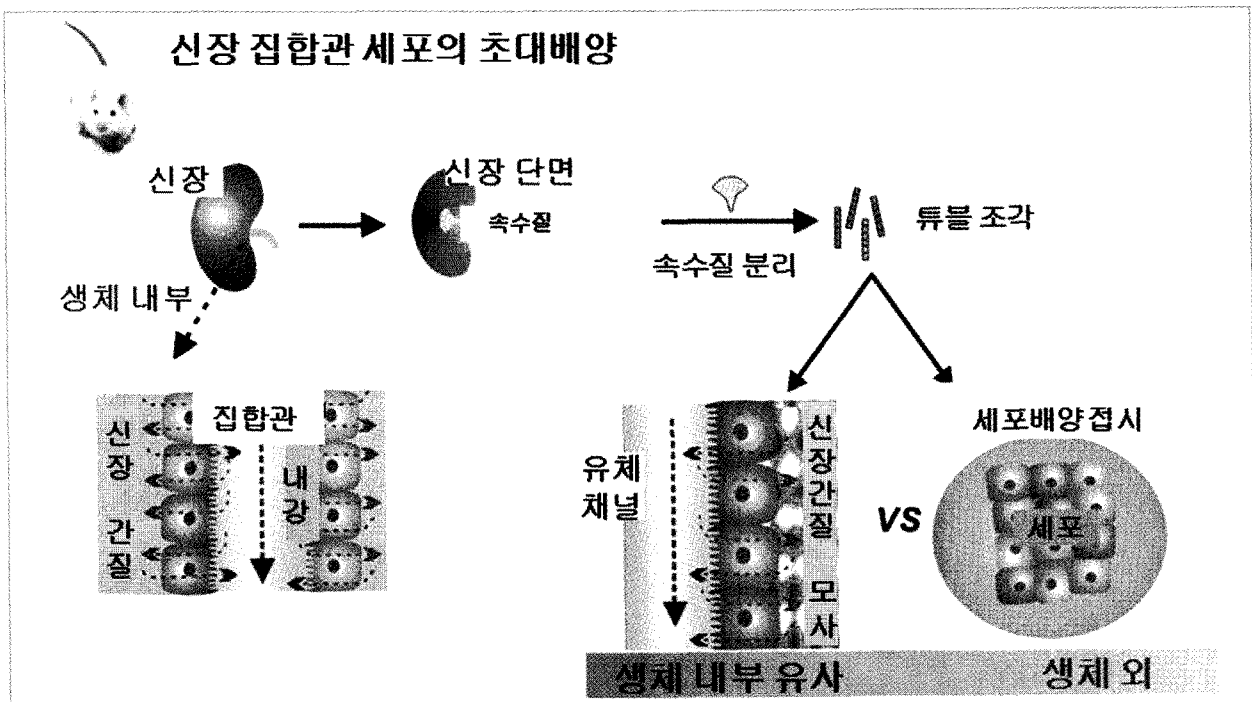
e-mail : sky4u@snu.ac.kr

신장은 우리 몸의 생체 항상성을 유지하기 위해 수분과 전해질 균형을 조절하고 노폐물을 제거해주는 매우 중요한 기능을 수행하는 기관이다. 신장은 약 100만 개의 네프론이라고 하는 기능적 단위로 이루어져 있으며, 하루 약 180리터의 물이 신장을 통과한다. 신장의 기능에 이상이 생기면 부종, 고혈압, 요독증, 신부전, 신장암 등이 발생할 수 있다. 이러한 중요성에도 불구하고, 신장의 복잡한 구조와 복합적인 호르몬에 의한

조절 기작으로 인해 우리 몸의 다른 기관에 비해 신장 주변 환경을 공학적으로 모사하고 신장칩을 제작하는 연구는 거의 진행되지 못했다.

신장세포의 생체 내 주변환경

신장 세포에는 다양한 수분 및 이온 통로 채널 단백질들이 존재하고 있으며, 사구체에서 여과된 체액



▲ 신장 세포의 생체 내부 유사 환경에서의 배양

은 근위세뇨관, 헨리고리, 원위세뇨관, 집합관을 거쳐 소변으로 배출되기 전까지 흡수와 분비 과정을 거친다. 생체 내에서 신장의 각 튜블 세포들은 유체환경에 노출되어 있음에도 불구하고 혈관 등과 같은 조직 세포에 비해 유체환경의 영향에 대해서는 밝혀지지 않은 것들이 많다. 신장 튜블 내부의 유체 흐름은 혈류의 10% 수준으로 비교적 낮은 편이며, 이러한 특성에 반응하는 신장세포의 작용 기작은 매우 흥미로운 것이다.

최근, 마이크로 유체 환경과 신장 세포의 기능에 대한 연구가 활발해지고 있다. 몇 가지 연구 결과들을 종합해 보면, 신장 튜블 세포는 유체환경에 반응하여 세포 골격구조가 재배치되며 세포밀착이 강화된다. 이러한 현상은 혈관 내피 세포의 반응과 반대되는 현상으로, 이는 신장의 고유 기능인 물질 이동에 최적화된 환경을 만들기 위한 과정으로 이해할 수 있다.

또한, 신장 세포 배양을 위한 중요한 환경은 신장 튜블의 내강, 간질과 유사한 환경을 만들어 세포를 통한 흡수와 분비 현상이 일어날 수 있는 바닥면을 만

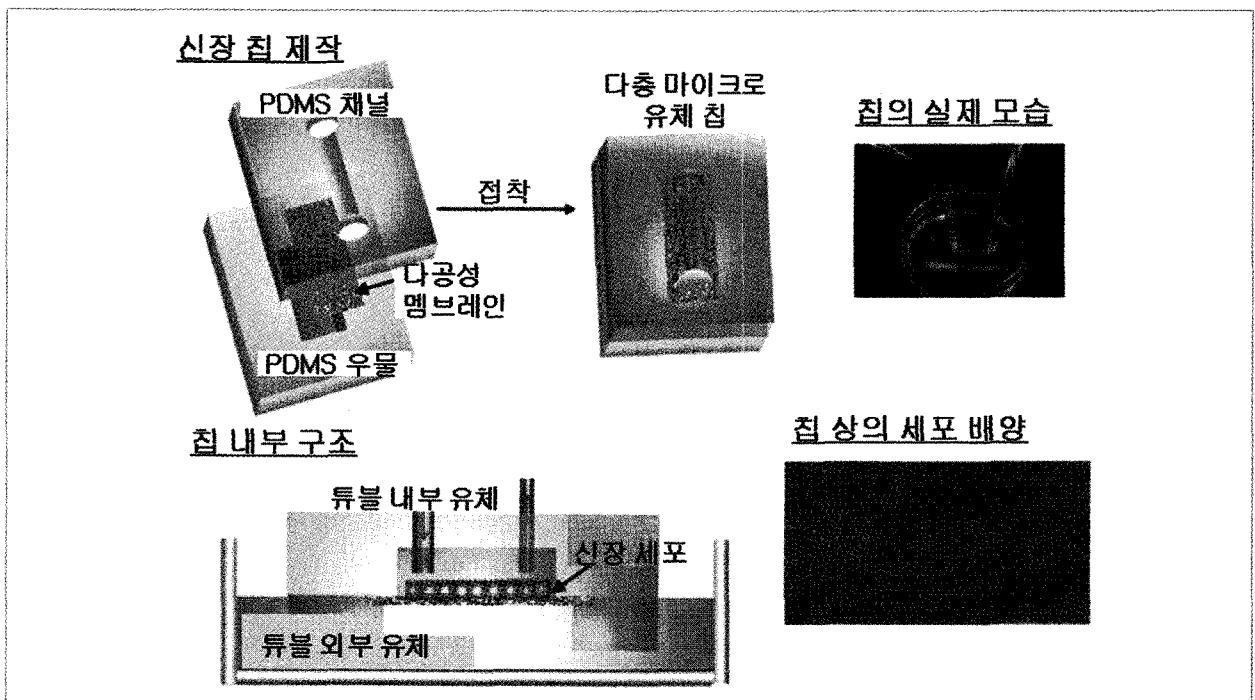
생체 내 환경을 정확히 모사하는 시스템 제작을 위해서는 수십 년 간 세포 배양에 이용되어 온 세포배양용기를 부분적으로 대체할 수 있는 생체환경과 유사한 특성을 가진 칩의 개발이 필요하다.

들어 주는 것이다. 신장 간질과 유사한 바닥면을 만들기 위해서는 세포의 극성화를 가능하게 하는 다공성 멤브레인 위에서의 배양이 적합하다. 세포의 극성화는 신장 세포 배양의 필수적인 요소임에도 불구하고 많은 연구자들은 수십 년 간 딱딱한 바닥면인 세포배양 접시에서 세포를 배양해 왔다. 특히 생체 내부와 유사한 특성을 지닌 초대배양세포는 동물에서 분리한 후 생체 내부와 전혀 다른

배양 조건에서 배양하게 되면 조직의 고유한 특성을 쉽게 잃어버리게 된다. 그러므로 신장 생체 내부 환경을 모사하기 위해서는 위와 같은 기본적인면서도 필수적인 특성을 잘 파악한 후 이를 유사하게 칩 형태로 제작할 수 있고 미세 조작을 통해 최대한 생체 내부와 비슷한 환경을 만들어주는 것이 중요하다.

마이크로 유체 채널을 이용한 신장 세포 배양

마이크로 유체역학 및 의생명공학 기술을 접목하면 간단하면서도 신장 모사에 필수적인 조건을 갖춘



▲ 신장 칩 제작과 작동 모습

신장 칩을 만들 수 있다. 신장 칩은 신장 세포가 받는 유체 환경을 재현하기 위한 채널, 세포를 통과하는 물질 이동이 가능한 바닥면, 튜블 세포 기저면을 모사한 층의 삼중 구조로 이루어져 있다.

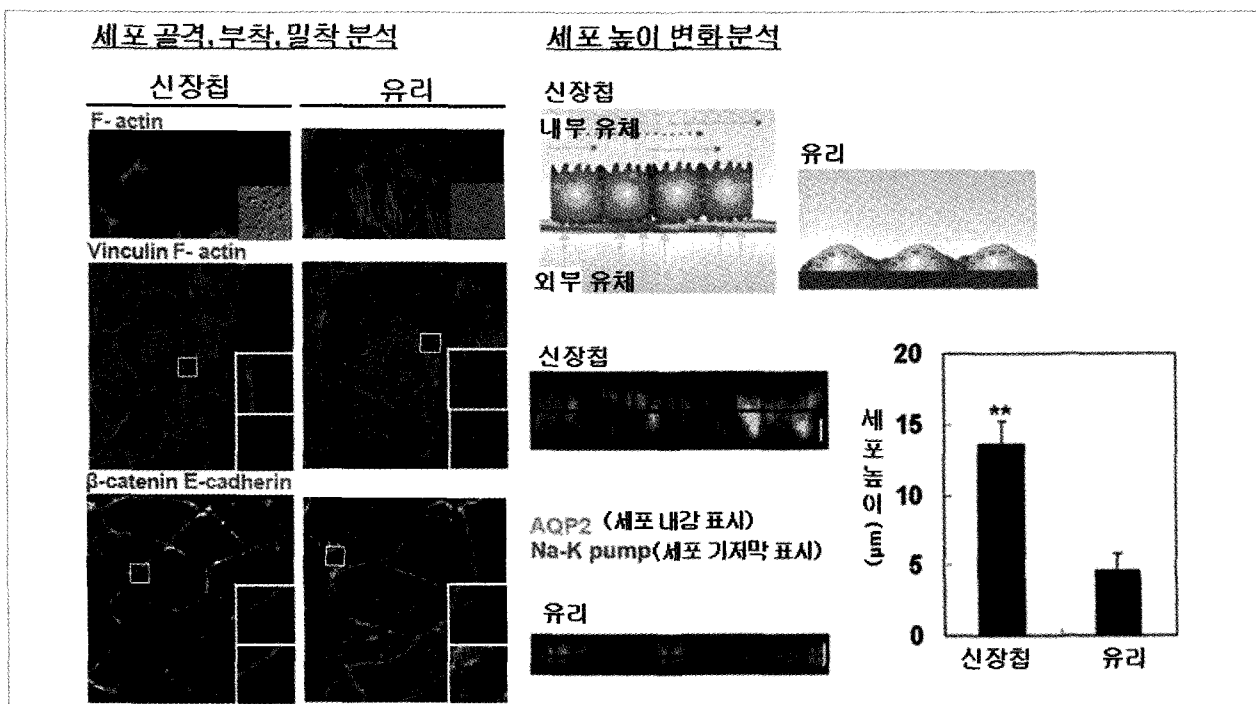
상층의 polydimethyl siloxane (PDMS) 채널은 신장 튜블의 내강을 나타내는 것으로 튜블 내부 유체가 흐르는 부분이다. 마이크로 채널은 리소그래피 공정을 통해 실리콘 마스터를 제작한 후 PDMS로 본을 떠서 손쉽게 제작 할 수 있다. 하층의 PDMS 우물 구조는 신장 튜블의 간질 부분으로 생체 내에서 혈류를 통한 물질 교환이나 호르몬 자극 등이 이루어지는 곳이다. 또한 열려 있는 우물 구조를 이용하면 세포 성장에 필요한 가스 교환과 영양분 공급이 원활하게 이루어질 수 있는 장점이 있다. polyester 재질의 0.4 μ m 사이즈의 구멍이 있는 다공성 멤브레인을 두 PDMS 구조 사이에 넣어 플라즈마로 접합시키면 다층 마이크로 유체 칩의 제작이 완성된다. 이 칩의 특징은 세포를 통한 물질 이동과 세포 기저면과 내강 면을 각각 조절하면서 상호작용이 가능하도록 한 것이다. PDMS 채널에 세포를 넣고 배양한 후 채널을 시린지 펌프에 연결하여 유체 환경을 만들 수 있다. 유체의 조성은 집합관 세포 배양에 일반적으로 이용되는 고삼투압 용액이며, 1dyn/cm² 유체 전단응력으

로 5시간 동안 자극하였을 때 세포 내부의 구조적 변화가 충분히 일어났다.

신장 칩에서 배양된 세포의 구조적 변화

일반적으로 세포 배양에 이용되는 이차원 평면 바닥에서 배양된 세포와 신장칩에서 배양된 세포는 구조, 기능 면에서 현저한 변화를 보인다. 세포의 골격 구조인 액틴(actin) 단백질은 유리바닥면에서 배양되었을 때 세포 내부에 진하고 조밀하게 분포하고 있다. 그러나 신장칩에서 유체 환경과 극성환경에 노출되었을 때 액틴 단백질은 세포 내부에서는 분해되어 점조직과 같은 형태로 변하고 세포 막 주변으로는 더욱 진하게 분포되는 구조적 변화를 보인다. 세포가 바닥면에 부착될 때 중요한 기능을 하는 빈쿨린(vinculin) 단백질도 액틴의 구조적 변화에 의해 신장칩과 유리면에서 전혀 다른 분포를 보인다. 세포밀착에 관여하는 카테닌(β -catenin)과 캐드헤린(E-cadherin) 단백질은 신장칩에서 배양된 세포에서 더욱 밀착된 형태로 분포가 바뀌는 것을 알 수 있다.

또한 신장칩에서 배양된 세포는 유리바닥에서 배양된 세포보다 2배 이상 높이가 신장되는 것을 알 수

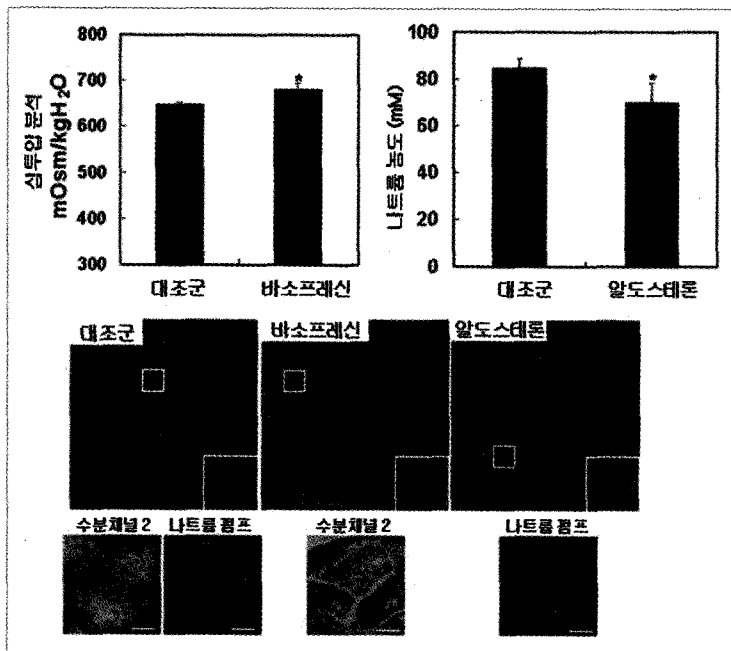


▲ 유리면과 신장칩에서 배양된 세포의 비교

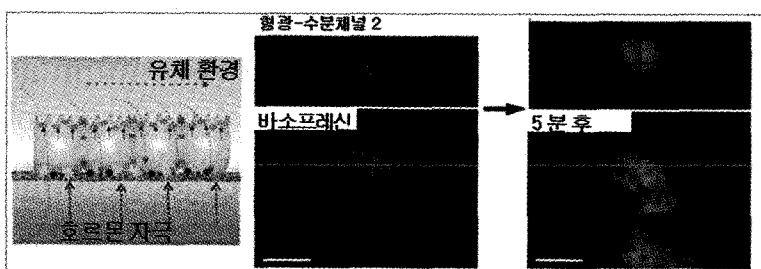
있다. 이러한 현상은 세포의 기저막에 분포하는 단백질과 세포 내강에 분포하는 단백질을 각각 면역형광 염색하여 컨포칼 현미경을 통해 z축으로 각각 사진을 찍어 분석할 수 있다. 일반적으로 세포는 2차원 평면 바닥에서 매우 납작하게 자라나지만 이것은 실제 생체 내부의 세포 모습과는 매우 다른 것이다. 세포가 극성화 최적화되고 생체 내부와 비슷한 조건이 되었을 때 세포는 고유 모습을 갖게 되고 이것은 높이 변화로도 나타나는 것이다.

생체 신장 모사 칩은 신장 생리학 연구에 도움이 될 뿐만 아니라 향후 신장 질환에 대한 양한 약물을 검출할 수 있는 스크리닝 툴이나 조직공학을 위한 조직의 복원, 재생 또는 대체 기술로 적용될 수 있을 것이다.

신장칩에서 세포를 통과하는 물질 이동 분석



▲ 다양한 호르몬에 반응하는 물질 이동과 채널 단백질 분석



▲ 실시간 수분채널 이동 분석

집합관 세포는 항이뇨 호르몬인 바소프레신에 반응하여 수분을 흡수하게 된다. 이것에는 수분채널 2 단백질이 깊이 관여한다. 자극이 없을 때 수분채널 2 단백질은 세포 내부의 소포에 존재하고 있다가 기저막 부분의 호르몬 수용체에 의해 호르몬 자극이 전달되면 이 수분 단백질은 내강 막 쪽으로 이동하게 되어 수분이 세포로 들어올 수 있는 통로 역할을 한다. 또한 알도스테론 호르몬은 나트륨 이온 채널 단백질을 활성화시켜 나트륨 이온의 흡수를 자극한다. 신장칩을 이용하면 이러한 생체 내부 다양한 신장의 기능을 칩 상에서 유사하게 재현할 수 있다. 생체 내부와 유사한 조건을 만들기 위해 유체환경에서 신장의 간질 부분에 호르몬을 넣어주고 튜블 내강 부분의 유체를 모아 수분의 이동과 나트륨 이온의 이동을 분석하면, 호르몬을 처리하지 않은 대조군에 비해 호르몬을 처리한 실험군에서 물질의 이동이 일어나는 것을 확인할 수 있다. 또한 호르몬 자극에 반응하여 액틴 단백질의 구조가 변화하고 수분채널 단백질 2는 내강 막 쪽으로 위치 이동을 하고 나트륨 펌프 단백질은 활성화되는 것을 면역형광염색을 통해 확인하였다.

이와 같이 신장 칩을 이용해서 신장 세포가 생체 내에서 받는 다양한 범위의 전단응력을 조절하면서 세포의 구조적, 기능적 변화를 분석할 수 있고 기저면을 통한 호르몬이나 약물의 자극에 대한 변화를 테스트 할 수 있다. 예를 들어, 수분대사와 관련된 질병 치료를 위한 신약개발에 있어서 수분채널 2 단백질의 이동을 분석함으로써 수분 흡수에 기능을 하는지 여부를 쉽게 구분할 수 있다. 수분채널 2에 형광 물질을 달아서 세포에 넣은 후 호르몬 자극이 이루어지는 기저막 부분에 신약 물질을 넣고 실시간으로 수분채널 단백질의 이동을 분석하면 고효율 스크리닝이 가능하다.