

다수의 전기장 분포가 생성되는 단일 미세유로를 이용한 폐암세포 전기천공 및 활성화 분석칩

김민지* · 김태윤* · 조영호*†

* KAIST, 바이오및뇌공학과

Electroporation and Viability Monitoring Chip for Lung Cancer Cells in Single Channel with Multiple Electric Field Zones

Min-Ji Kim*, Taeyoon Kim* and Young-Ho Cho*†

* Dept. of Bio and Brain Engineering, KAIST

(Received January 6, 2012 ; Revised July 3, 2012 ; Accepted July 18, 2012)

Key Words : Cell Electroporation(세포 전기천공), Viability(활성도), Multiple Electric Field(다수의 전기장), Transfection(형질주입)

초록: 본 논문에서는 다수의 전기장 분포가 생성되는 단일 미세유로를 이용한 폐암세포 전기천공 및 활성화 분석칩을 제안하였다. 종래의 세포 전기천공 분석칩은 다수의 전기장 분포를 형성하기 위해 다수의 전극패턴 또는 다수의 미세유로를 필요로 하여 구조가 복잡하였다. 반면, 제안된 세포 전기천공 및 활성화 분석칩은 한 쌍의 전극 사이에서 계단 형상으로 폭이 변화하는 단일 미세유로를 이용하여 다수의 전기장 분포를 형성함으로써 간단한 구조로 세포 전기천공 및 활성도를 분석할 수 있다. 제안된 세포 전기천공 및 활성화 분석칩은 0.3kV/cm 에서 0.5kV/cm 까지 5 단계의 전기장이 발생되도록 설계하였다. A549 와 H23 의 두 종류의 비소세포 폐암세포주를 이용한 성능실험 결과, 활성을 유지하면서 전기천공된 세포의 비율이 0.4kV/cm 의 전기장에서 각각 26.6±0.7% 및 51.4±3.0% 로 가장 높은 값을 보였다. 제안된 세포 전기천공 및 활성화 분석칩은 세포의 형질주입 연구를 위한 집적화된 세포칩으로 응용될 수 있다.

Abstract: We present an electroporation and viability monitoring chip for lung cancer cells in a single channel with multiple electric field zones. Previous electroporation chips utilized multiple microchannels or electrodes to form multiple electric fields, thus resulting in complex structures. However, the present chip can generate multiple electric fields in a single stepwise microchannel between a pair of electrodes, thus achieving the analysis of both cell electroporation and viability with a simple structure. We demonstrate that the electric field of 0.4 kV/cm results in a maximum percentage of 51.4±3.0% and 26.6±0.7% of viable and electroporated human lung cancer cells, H23 and A549, respectively. The present chip has potential for use in integrated cell chips for transfection studies.

- 기호설명 -

V_0 : 전압
 E_i : i 번째 전기장 세기
 ρ : 유체의 비저항
 R : 전체 유로저항
 w_i : i 번째 계단의 유로너비
 h : 미세유로의 높이

$\Delta\phi_i$: 막전위의 차이
 r : 세포의 반지름
 θ : 전기장 방향과 세포 표면의 수직방향과의 각도

1. 서론

세포 전기천공은 세포 내 유전자 및 효소 등의 형질주입⁽¹⁻⁵⁾을 위해 일반적인 생물학 실험에서 널리 사용되고 있다. 이러한 세포 전기천공을 위해

† Corresponding Author, nanosys@kaist.ac.kr
© 2012 The Korean Society of Mechanical Engineers

서는 세포에 일정한 전기장을 인가하여 세포막의 투과성을 일시적으로 높여야 하는데 전기장이 너무 높을 경우 세포막이 영구적으로 파괴되어 세포 활성도에 영향을 줄 수 있다.⁽⁶⁻⁸⁾ 따라서, 안정적인 세포 내 형질주입을 위해서는 다양한 전기장에 따른 세포의 전기천공 특성과 활성도를 동시에 분석할 필요가 있다. 기존 세포 전기천공 특성 분석칩^(9,10)은 다수의 전기장을 세포에 인가하기 위해 다수의 미세 유로를 병렬로 연결⁽⁹⁾하거나 다수의 전극패턴을 집적⁽¹⁰⁾하여 구조가 복잡한 단점이 있다. 이에, 본 연구에서는 한 쌍의 전극 사이에 너비가 계단형으로 변화하는 단일 미세유로를 이용하여 다수의 전기장을 세포에 인가할 수 있는 간단한 구조의 세포 전기천공 및 활성도 분석칩을 제안하였다.

2. 구조 및 원리

제안된 세포 전기천공 및 활성도 분석칩(Fig. 1)은 한 쌍의 전극과, 그 사이에서 너비가 계단형으로 변화하는 단일 미세유로로 구성되어 있다. 먼저, 미세유로 내에 세포를 주입한 후, 미세유로의 유입구와 유출구에 삽입된 전극에 펄스 전압신호를 인가하면 미세유로 내에서 다수의 전기장, E_i 가 다음과 같이 발생된다.

$$E_i = \frac{V_o \rho}{R w_i h} \quad (i = 1, \dots, n) \quad (1)$$

여기서, V_o 는 미세 유로 내에 인가되는 펄스전압, ρ 는 유체의 비저항, R 는 전체 유로의 저항, w_i 는 i 번째 유로의 너비, h 는 미세유로의 높이를 나타

나타낸다. 전기장 E_i 에 의해 세포 막전위, $\Delta\phi_i$ 가 다음 아래의 식과 같이 생성된다.⁽¹¹⁾

$$\Delta\phi_i = 1.5rE_i \cos \theta \quad (2)$$

여기서 E_i 는 i 번째 계단의 유로에서 생성되는 전기장의 세기, r 은 세포의 반지름, θ 는 전기장의 방향과 세포 표면의 수직방향과의 각도를 나타낸다. 일반적인 세포의 경우, 외부 전기장으로 인해 0.4~1V의 막전위가 발생하면 세포막의 이온채널이 열려 외부의 입자가 세포 내로 유입되며,⁽¹²⁻¹⁴⁾ 1V 이상의 막전위가 발생하면 외부 액체와 세포질의 삼투압 차이에 의해 세포 분쇄가 일어난다.⁽¹⁵⁾ 제안된 단일 미세유로의 치수는 340V의 펄스전압에 의해 0.3-0.5kV/cm 사이에서 5 단계의 전기장이 발생되도록 Table 1과 같이 설계되었다. 여기서 0.3-0.5kV/cm의 전기장은 기존의 세포 전기천공연구에서 널리 사용되는 영역에서 결정되었다.^(13,16) Figure 2는 Table 1과 같이 설계된 미세유로 내에 생성되는 전기장 영역 분포를 나타낸 것이다.

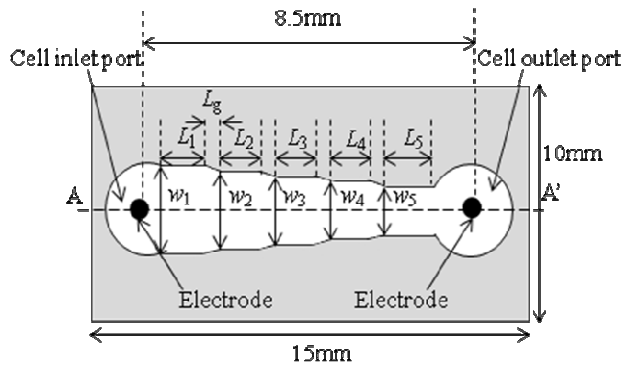


Fig. 1 Cell electroporation and viability monitoring chip

Table 1 Dimension of the designed and fabricated microchannel in the chip of Fig. 1

Channel dimension		Designed [μm]	Fabricated [μm]
Length	$L_1=L_5$	1,300	1,300±100
	$L_2=L_3=L_4$	1,100	1,100±58
	L_g	400	400±100
Width	w_1	334	334±5
	w_2	286	286±3
	w_3	250	250±3
	w_4	222	222±3
	w_5	200	200±0
Height	h	200	200±44

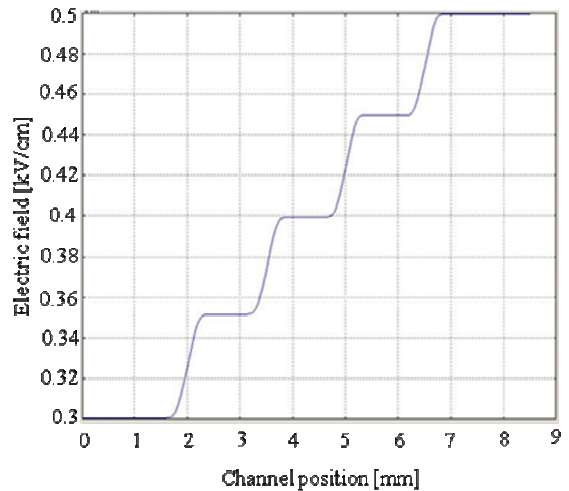


Fig. 2 Analytically estimated electric field in the single channel along A-A' in Fig. 1

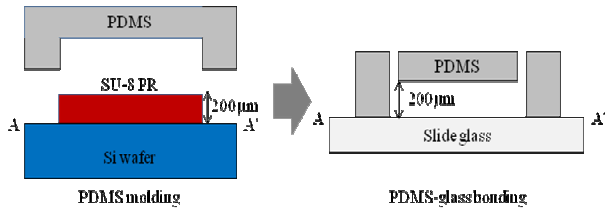


Fig. 3 Fabrication process showing the cross section across A-A' in Fig. 1

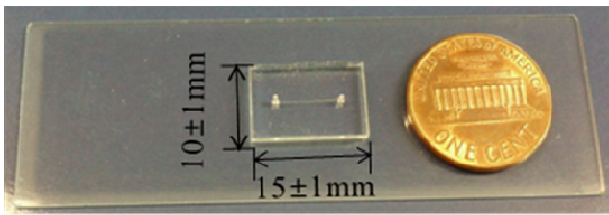


Fig. 4 Fabricated cell electroporation and viability monitoring chip compared with a penny

3. 제작공정

제안된 세포 전기천공 및 활성화 분석칩은 Fig. 3 과 같이 Polydimethylsiloxane (PDMS) 몰딩 및 PDMS-Glass 접합기법을 이용하여 제작되었다. 먼저 200µm 두께의 SU-8 PR 로 제작된 몰드를 이용하여 너비가 계단형으로 변화하는 단일 미세유로를 제작하였다. 이후 미세유로층과 Slide glass 를 O₂ 플라즈마로 처리한 뒤, 접합하여 Fig. 4 와 같이 칩을 제작하였다. 제작된 칩의 Slide glass 내에는 0.5mg/ml 콜라겐을 상온에서 약 2 시간 동안 코팅하여 세포가 잘 부착되도록 하였다.

4. 실험

4.1 실험 과정

폐암은 암사망의 가장 중요한 원인으로 그 중에서도 비소세포 폐암 세포주는 폐암 세포 중 가장 높은 빈도수를 가지며 많은 연구가 진행되어 왔다. 이러한, 비소세포 폐암 세포 내로 원하는 유전자를 주입시켜 형질전환하여 세포의 형광표지와 약물 반응 분석 등을 하기 위해 세포 전기천공이 필요하다.^(9,10,13)

본 연구에서는 A549 와 H23, 2 종의 비소세포 폐암 세포주를 이용하여, 제안된 세포 전기천공 및 활성화 분석칩의 성능을 분석하였다. A549 와 H23 세포를 3x10⁶ cells/ml 의 농도로 미세유로에 주입한 후, 37°C 의 온도와 5%의 CO₂ 농도가 유지되는 배양기에서 3 시간 동안 배양하여 세포를 미세유로 바닥에 부착시켰다. Phosphate Buffered saline(PBS, 전기전도도

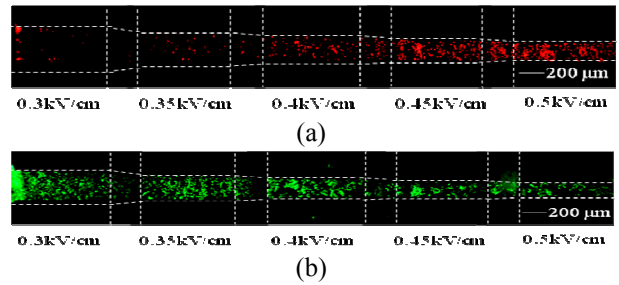


Fig. 5 Fluorescent images of the A549 cells in the single microchannel: (a) Red fluorescent image of the electroporated cells stained with Propidium Iodide (PI); (b) Green fluorescent image of the viable cells stained with Calcein AM

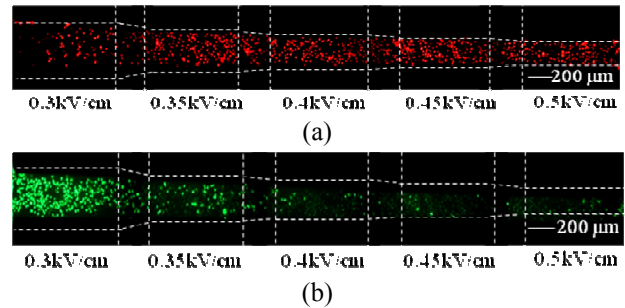


Fig. 6 Fluorescent images of the H23 cells in the single microchannel: (a) Red fluorescent image of the electroporated cells stained with Propidium Iodide (PI); (b) Green fluorescent image of the viable cells stained with Calcein AM

=1.6S/m)과 Propidium Iodide(PI, 농도=1.0mg/ml)의 20:1(v/v)혼합용액을 칩에 주입한 후, 미세유로의 유입구와 유출구에 설치된 백금전극에 340V 크기 및 100msec 간격의 단일 전압펄스를 인가하여 세포를 전기천공시켰다. 이후 10 분 동안 세포를 배양한 후, PBS 와 Calcein AM(농도=4mM)을 혼합하여 만든 2.5 µM Calcein AM 으로 30 분 동안 상온에서 세포를 염색하였다.

그 결과, 전기천공된 세포는 PI 용액이 세포 내로 주입되어 적색형광을 띄었으며, 활성을 유지한 세포는 세포 내 esterase 반응에 의해 Calcein AM 이 가수분해 되어 강한 형광 화합물인 Cacein 을 생성하게 됨에 따라 녹색형광을 띄었다.⁽¹⁷⁾ 형광으로 염색된 세포의 이미지를 분석하여 전기천공율, 활성화도, 및 활성을 유지하면서 전기천공된 세포의 비율을 아래의 수식을 이용하여 측정하였다.

$$\text{Electroporation rate} = \frac{\text{Number of electroporated cells}}{\text{Number of total cells}} \times 100(\%) \quad (3)$$

$$\text{Viability} = \frac{\text{Number of viable cells}}{\text{Number of total cells}} \times 100(\%) \quad (4)$$

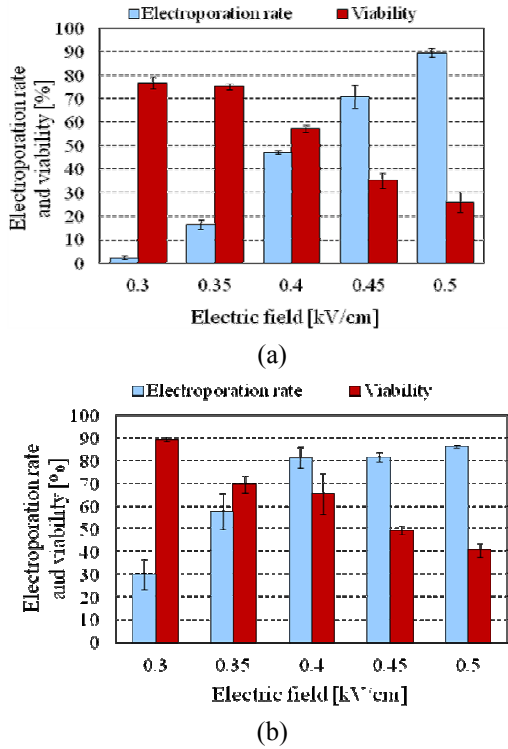


Fig.7 Measured electroporation rate and viability at 5 different electric field zones: (a) A549; (b) H23

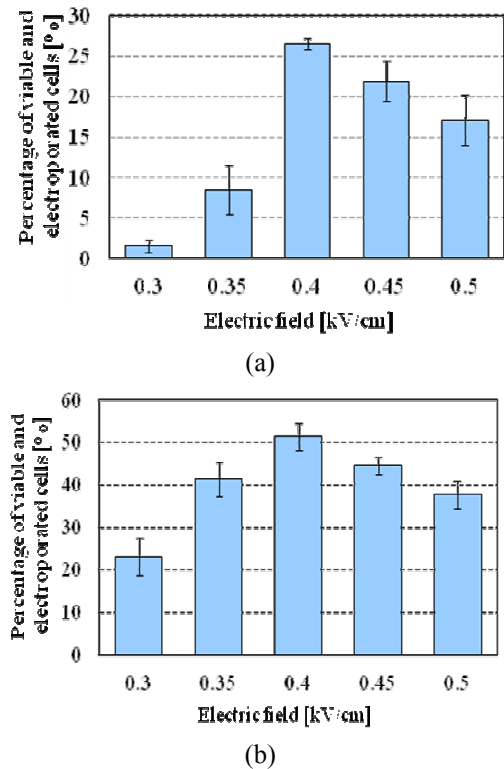


Fig.8 Measured percentage of viable and electroporated cells at 5 different electric field zones: (a) A549; (b) H23

Percentage of viable and electroporated cells

$$= \frac{\text{Number of viable and electroporated cells}}{\text{Number of total cells}} \times 100(\%) \quad (5)$$

4.2 실험 결과 및 토의

Figure 5 와 6 은 각각 A 549 H23 세포주를 PI(적색형광)와 Calcein AM(녹색형광)으로 염색한 이미지를 나타낸 것이다. Figure 5 와 6 의 이미지를 바탕으로 형광으로 염색된 세포를 직접 계수하여 식 (3)과 (4) 를 이용하여 전기천공율과 활성도를 계산한 결과는 Fig. 7 과 같다. Figure 8 은 활성을 유지하면서 전기천공된 세포의 비율을 나타낸 것이다. Figure 7 과 8 의 평균과 표준편차는 세번 반복실험을 통해 얻었다.

Figure 8 의 그래프를 분석한 결과, A549 및 H23 세포가 활성을 유지하면서 전기천공된 비율이 0.4kV/cm 의 전기장에서 각각, 26.6±0.67%와 51.4±3.0%의 최대값을 보여 가장 안정적인 세포 형질주입이 가능한 것으로 관찰되었다. 식 (2)에 의해 0.4kV/cm 의 전기장에서 세포막에 발생하는 전위는 A549 와 H23 세포 각각 0.45V 와 0.5V 으로 계산되었다. 이는 외부의 전기장으로 인하여 0.4~1V 의 세포 막전위가 발생하면 이온 채널이 열려 외부의 입자가 세포 내로 유입된다는 기존 연구 결과⁽¹²⁻¹⁴⁾에 부합하는 것이다.

5. 결 론

본 논문에서는 단일 미세유로를 이용하여 다수의 전기장 분포를 생성할 수 있는 간단한 구조의 폐암세포 전기천공 및 활성도 분석칩을 제안하였다. A549 와 H23 두 종류의 비소세포 폐암세포주를 이용한 결과, 0.4kV/cm 의 전기장에서 세포의 활성을 유지하면서 전기천공된 비율이 각각 51.4±3.0% 및 26.6±0.7% 로 가장 높은 값을 보였다. 본 논문에서 제안된 칩은 간단한 구조로 세포 전기천공과 활성도의 복합적인 분석과 세포 내 형질주입 분석 등을 위한 집적화된 세포 칩으로 쓰일 수 있다.

후 기

본 연구는 교육과학기술부 신기술융합성장동력사업인 “융합기술을 이용한 혈중암세포 기반 신개념 암 예후 예측 진단 원천기술 개발”의 세부과제 “CTC 활성유지 선별 및 다중특성 분석기술 개발” (과제번호 2011K000864)의 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

- (1) Weaver, J. C., 2003, "Electroporation of Biological Membranes from Multicellular to Nano Scales," *IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insul.*, Vol. 10, pp. 754~768.
- (2) Prasanna, G. L. and Panda, T., 1997, "Electroporation: Basic Principles Practical Considerations and Applications in Molecular Biology," *Bioprocess Engineering*, Vol. 16, pp. 261~264.
- (3) Serpersu, E. H. and Tsong, T. Y., 1984, "Activation of Electrogenic Rb⁺ Transport of (Na,K)-ATPase by an Electric Field," *J Biol Chem*, Vol. 259, pp. 7155~7162.
- (4) Serpersu, E. H., Tsong, T. Y. and Kinoshita, K., 1985, "Reversible and Irreversible Modification of Erythrocyte Membrane Permeability by Electric Field," *Biochim Biophys Acta*, Vol. 812, pp. 779~785.
- (5) Friedrich, U., Stachowicz, N., Simm, A., Fuhr, G., Lucas, K. and Zimmermann, U., 1998, "High Efficiency Electrotransfection with Aluminum Electrodes Using Microsecond Controlled Pulses," *Bioelectrochem. Bioenerg.*, Vol. 47, pp. 103~111.
- (6) Fox, M. B., Esveld, D. C., Valero, A., Luttge, R., Mastwijk, H. C., Bartels, P. V., van den Berg, A. and Boom, R. M., 2006, "Electroporation of Cells in microfluidic Devices: A Review," *Anal Bioanal Chem*, Vol. 385, pp. 474~485.
- (7) Gabriel, B. and Teissie, J., 1995, "Control by Electrical Parameters of Short- and Long-Term Cell Death Resulting from Electroporation of Chinese Hamster Ovary Cells," *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1266, pp. 171~178.
- (8) Rubinsky, B., 2007, "Irreversible Electroporation in Medicine," *Technology in Cancer Research and Treatment*, Vol. 6, pp. 255~259.
- (9) Kim, J. A., Cho, K., Shin, Y. S., Jung, N. C. and Chang, J. K., 2007, "A Multi-Channel Electroporation Microchip for Gene Transfection in Mammalian Cells," *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 22, pp. 3273~3277.
- (10) Jain, T. and Muthuswamy, J., 2007, "Bio-Chip for Spatially Controlled Transfection of Nucleic Acid payloads into Cells in a Culture," *Lab chip*, Vol.7, pp. 1004~1011.
- (11) Lee, S. W. and Tai, Y. C., 1999, "A Micro Cell Lysis Device," *Sensor and Actuators A*, Vol.73, pp.74~79.
- (12) Frida, F.R., Farre, C., Brennan, C., Weber, S. G., Nolkranz, K., Jardemark, K., Chiu, D. T. and Orwar, O., 2000, "Characterization of Single-Cell Electroporation by Using Patch-Clamp and Fluorescence Microscopy," *Biophysical Journal*, Vol. 79, pp. 1993~2001.
- (13) Choi, Y. S., Kim, H. B., Kwon, G. S. and Park, J. K., 2009, "On-Chip Testing Device for Electrochemotherapeutic Effects on Human Breast Cells," *Biomed Microdevices*, Vol.11, pp. 151~159.
- (14) Khine, M., Lau, A., Ionescu-Zanetti, C., Seo, J. and Lee, L. P., 2005, "A Single Cell Electroporation Chip," *Lab Chip*, Vol. 5, pp. 38~43.
- (15) Lee, D. W. and Cho, Y. H., 2007, "A Continuous Electrical Cell Lysis Device Using a Low DC Voltage for a Cell Transport and Rupture," *Sensors and Actuators B*, Vol.124, pp. 84~89.
- (16) Bao, N., Le, T. T., Cheng, J. X. and Lu, C., 2010, "Microfluidic Electroporation of Tumor and Blood Cells: Observation of Nucleus Expansion and Implications on Selective Analysis and Purging of Circulating Tumor Cells," *Integr Biol.*, Vol. 2, pp. 113~120.
- (17) Sanfilippo, S., Canis, M., Ouchchane, L., Botchorishvili, R., Artonne, C., Janny, L. and Brugnol, F., 2011, "Viability Assessment of Fresh and Frozen/Thawed Isolated Human Follicles: Reliability of Two Methods (Trypan Blue and Calcein AM.Ethidium Homodimer-1)," *J Assis Reprod Genet.*, Vol. 28, pp. 1151~1156.