

혈관모사 마이크로채널이 장착된 3D 종양 세포 배양 시스템의 제작 및 검증 연구

박정연¹ · 고범석² · 김기영² · 이동목³ · 윤길상[†]

한국산기술연구원 뿌리산업기술연구소 형상제조연구부문^{1,†}
한국화학연구원 신약파이프라인연구단 신약기반기술연구센터²
한국생산기술연구원 대경본부 안전시스템연구그룹³

Fabrication and validation study of a 3D tumor cell culture system equipped with bloodvessel-mimik micro-channel

Jeong-Yeon Park¹ · Byum-seok Koh² · Ki-Young Kim² · Dong-Mok Lee³ · Gil-Sang Yoon[†]

Shape Manufacturing R&D Department, Korea Institute of Industrial Technology^{1,†}
Therapeutics & Biotechnology Division, Korea Research Institute of Chemical Technology²
Safety System R&D Group, Korea Institute of Industrial Technology³
(Received March 03, 2021 / Revised June 28, 2021 / Accepted June 30, 2021)

Abstract: Recently, three-dimensional (3D) cell culture systems, which are superior to conventional two-dimensional (2D) vascular systems that mimic the in vivo environment, are being actively studied to reproduce drug responses and cell differentiation in organisms. Conventional two-dimensional cell culture methods (scaffold-based and non-scaffold-based) have a limited cell growth rate because the culture cannot supply the culture medium as consistently as microvessels. To solve this problem, we would like to propose a 3D culture system with an environment similar to living cells by continuously supplying the culture medium to the bottom of the 3D cell support. The 3D culture system is a structure in which microvascular structures are combined under a scaffold (agar, collagen, etc.) where cells can settle and grow. First, we have manufactured molds for the formation of four types of microvessel-mimicking chips: width / height ①100 μm / 100 μm , ②100 μm / 50 μm , ③150 μm / 100 μm , and ④200 μm / 100 μm . By injection molding, four types of microfluidic chips were made with GPPS (general purpose polystyrene), and a 100 μm -thick PDMS (polydimethylsiloxane) film was attached to the top of each microfluidic chip. As a result of observing the flow of the culture medium in the microchannel, it was confirmed that when the aspect ratio (height/width) of the microchannel is 1.5 or more, the fluid flows from the inlet to the outlet without a backflow phenomenon. In addition, the culture efficiency experiments of colorectal cancer cells (SW490) were performed in a 3D culture system in which PDMS films with different pore diameters (1/25/45 μm) were combined on a microfluidic chip. As a result, it was found that the cell growth rate increased up to 1.3 times and the cell death rate decreased by 71% as a result of the 3D culture system having a hole membrane with a diameter of 10 μm or more compared to the conventional commercial. Based on the results of this study, it is possible to expand and build various 3D cell culture systems that can maximize cell culture efficiency by cell type by adjusting the shape of the microchannel, the size of the film hole, and the flow rate of the inlet.

Key Words: 3-dimensional cell culture, Tumor micro environment(TME), Vessel-mimicking, Micro-channel chip, Injection molding

1. 서 론

암세포 배양은 암세포가 정의되고 조절된 조건에서 자라는 자연환경으로부터 분리된 실험과정을 의미한다. 암 치료를 위한 새로운 치료법을 모색하기 위해 그동안 2차원 암세포 배양에 기반한 집중적인 연구가 수행되었지만 암과 종양간의 미세환경

1. 한국산기술연구원 뿌리산업기술연구소 형상제조연구부문
† 교신저자: 한국산기술연구원 뿌리산업기술연구소 형상제조연구부문
E-mail: seviygs@kitech.re.kr

(TME)를 제대로 구현하지 못해 치료제의 한계가 드러났다. 따라서 최근 암-종양간의 미세환경 구축을 위해 지지체 기반(scaffold-based) 또는 비지지체 기반(non-scaffold based) 3차원 배양환경 조성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다¹⁻¹¹⁾.

본 연구에서는 TME 환경 모사를 위해 연결 한천 배양용 지지체와 미세혈관을 모사한 미세유체칩을 결합한 3차원 세포배양 시스템을 제안하고자 한다. 이 구조는 지지체 내에 시딩된 암세포가 한천 내에서 3차원으로 성장하기 때문에 복잡한 암-종양 미세환경을 생체 내와 가깝게 모방하고, 앵커리지와 무관한 성장조건으로 암세포가 콜로니를 형성하기 때문에 암세포 진행 및 이동능력을 모니터링 할 수 있다. 또한 지지체 하단에 미세혈관을 모사한 구조물을 배치함으로써 지지체 내의 암세포가 지속적으로 배양액을 공급 받을 수 있다. 지지체에 배양액을 효율적으로 공급할 수 있는 미세유체칩의 형상(폭, 높이) 및 박막필름에 적용할 포어 직경을 최적화 하는 연구를 수행하였다.

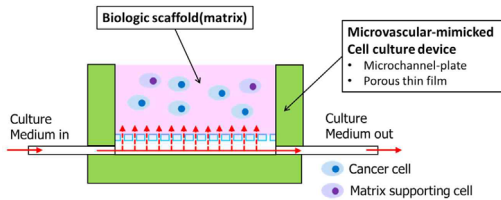


Fig. 1 Schematic diagram of 3D tumor cell culture system

2. 3차원 암세포 배양 시스템 제작

2.1. 미세유체칩 설계 및 제작

Fig. 2와 같이 지지체 하단에 배치될 미세유체칩의 채널은 그 형상을 기계가공기로 쉽게 가공하기 위해 최소 치수 50 μ m을 갖으면서 용적 및 높이/폭 중형비별로 4가지 종류로 설계되었다. 4가지 미세채널의 등가직경을 계산해 보면 100 μ m 전후로 소동맥(arterioles)과 유사한 직경을 가진다. 미세혈관을 모사한 채널부 외에 reservoir 및 입수부/출수부 직경 및 길이, 입수부에서 채널부사이의 유로, 미세유체칩의 외곽 치수는 모두 적용하게 적용하였다.

Fig. 4와 같이 성형품 형상 코어만 쉽게 교체하여 4종류의 미세유체칩을 성형할 수 있도록 3단 금형으로 제작하였다. 금형 외곽부는 절삭가공, 미세채널부는 NC 방전가공 방법을 적용하였다. 코어 소재는 알루미늄 합금(HRD-6), 몰드베이스 소재는 NAK

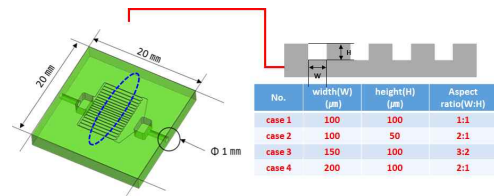


Fig. 2 Microfluidic Chip Design

80, 미세유체칩 소재는 GPPS(general purpose polystyrene)을 사용하였으며, 100톤 사출기(스프루 직경 26mm) 상에서 Table 1. 조건을 적용하여 Fig. 4. 과 같이 시사출하였다.

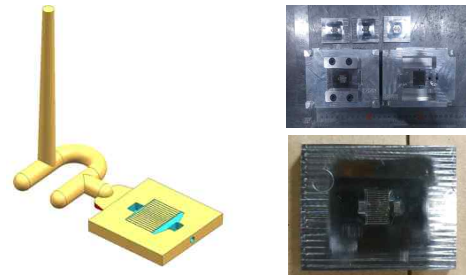


Fig. 3 Injection mold design for microfluidic chip fabricating

Table 1 Injection molding condition

condition	dimension	value
maximum injection pressure	kgf/cm ²	55
injection velocity	mm/sec	120
v/p switch-over	% volume filled	62.5
packing pressure-time	kgf/cm ² -sec	50-3
melting temperature	°C	250
mold temperature	°C	50
cooling time	sec	10

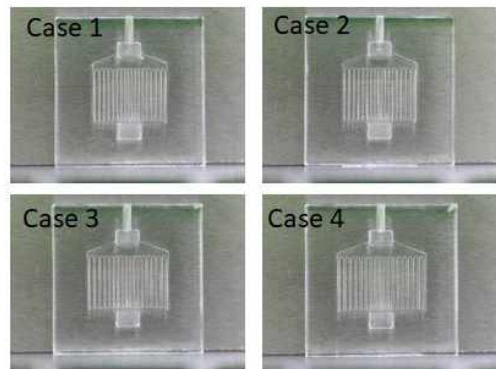


Fig. 4 4 case of Microfluidic Chips Molded from GPPS

4가지 미세유체 칩 위에 PDMS 필름을 부착한 다음 파란색 잉크를 주입한 결과 Fig.5와 같이 폭 대 종횡비가 1 대 1인 case 1은 출수부 reservoir까지 잉크가 유동한 후 다시 입수부 쪽으로 역류가 발생되는 반면, 폭 대 종횡비가 1.5 대 1 이상인 case 2-4는 역류현상 없이 잉크가 고르게 흐름을 관찰하였다. 미세유체 칩과 PDMS 필름 간에 기포가 갇히지 않게 접촉한다면 미세채널 위에 형성될 한천 지지체 안으로 지속적으로 배양액을 주입할 수 있을 것으로 판단된다. 3차원 암세포 배양 시스템 구축 시 유량을 최소화하기 위해 폭 100 μ m, 높이 50 μ m의 미세채널이 구비된 case 2를 미세유체 칩으로 선정하였다.

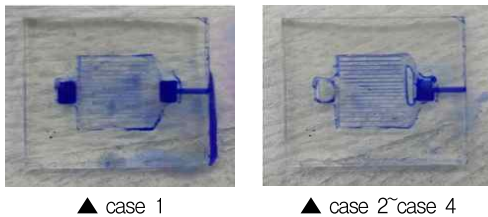


Fig. 5 Flowability result

2.2. PDMS 필름 및 Porous 구조 형성

앞에서 성형된 미세유체칩은 상부가 오픈된 형태이다. 채널 형상 별 배양액의 유동성을 평가하기 위해서 PDMS(polydimethylsiloxane)을 페트리디쉬 위에 스프인코팅 후 열경화하여 두께 100 μ m의 PDMS 필름을 성형한 다음 미세유체칩 위에 접착하여 0.1 ml/min의 속도로 배양액을 주입하였다. 또한 미세유체 칩 채널위에 직경 1/25/45 μ m의 포어가 1mm 간격으로 형성된 박막구조를 제작하기 위하여 페트리디쉬 위에 경화된 PDMS 그대로 펄토초레이저(Spitire Ace, Spectra Physics, US)를 이용하여 Fig 5와 같이 포어구조를 형성하였다.

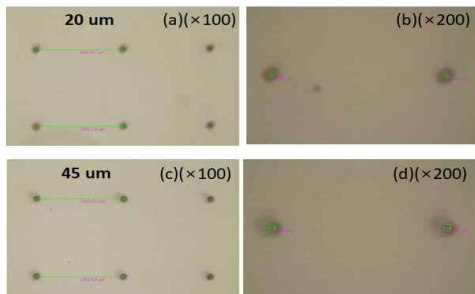


Fig. 6 Observation of a plastic pore film with a target diameter of 20 μ m(a) and (b) and 45 μ m(c) and (d)

3. 3차원 암세포 배양 시스템 구축 및 성능 결과

Fig 7과 같이 지지체-포러스 필름(직경 1/25/45 μ m)-미세채널 칩이 결합된 3차원 암세포 배양 시스템을 6 well plate 내에 고정시킨 다음 UV 멸균하였다. 멸균된 18G 마이크로 니들을 멀티 주사기 주입 펌프(KD220, KD Scientific, Holliston, MA)에 연결하고 미세 유체 장치의 입구에 두었다. 0.8% 한천을 포함한 배양액 3 ml를 포러스 필름 위에 배치하여 37 $^{\circ}$ C에서 15분, 4 $^{\circ}$ C에서 30분 방치하여 응고시켰다. 그 위에 대장암세포(SW480, 1×10^5 ea/cm 2) 및 0.8% 한천을 포함한 배양액 2ml를 첨가한 다음 4 $^{\circ}$ C성에서 20분 동안 응고시켰다. 그 다음 2ml의 배양액을 첨가하여 4시간 동안 인큐베이터 안에서 배양시켰다. 펌프를 통해 미세유체칩에 24시간 마다 0.1ml/min의 주입속도로 배양액을 공급하였다. 배양 종료 후 용해 완충액 및 CyQuant $^{\circ}$ 염료를 추가로 첨가 한 후, 520 nm에서의 형광을 측정하여 SW480 증식을 측정하였다. Muse $^{\circ}$ Caspase-3 / 7 분석 키트를 사용하여 Muse $^{\circ}$ 세포 분석기 (Merck Millipore)를 사용하여 고정 장치가 없는 배양 된 SW480과 미세 유체 장치의 세포 사멸 비율을 측정하였다.

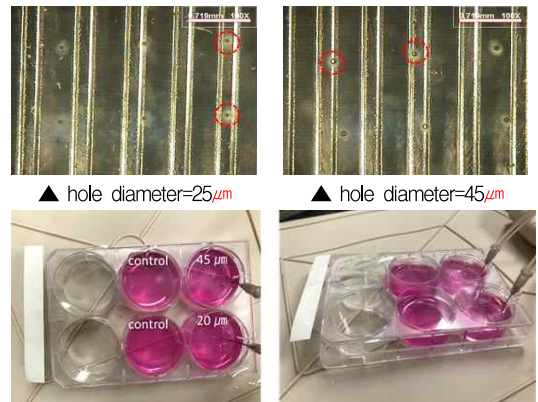


Fig. 7 Composition of 3D tumor cell culture environment combining agar scaffold-porous film-microchannel in 6-well plate

그 결과 1 μ m 홀이 가공된 PDMS 포러스 필름 결합 배양시스템의 SW480 생존율(proliferation) 및 세포 고사율(apoptotic ratio)이 가장 나쁜 결과를 보인 반면에, 홀 직경이 증가할수록 생존율은 증가하고 세포 고사율은 감소됨을 확인하였다. 특히 홀 직경

이 45 μm 인 배양시스템에서의 세포생존율은 1.3배증가하고, 세포 사멸율은 70% 수준으로 감소되었다. 이는 기존 상용품인 multi-well plate 내 insert well에 구비된 포어의 크기 및 밀도와 대치되는 결과이다. 즉, 기존 제품은 포어 직경이 10 μm 이내여야 세포가 밀로 가라앉지 않고 성장할 수 있지만, 본 연구를 통해 개발된 3차원 암세포 배양시스템은 응고된 한천 내에서 암세포가 고정된 상태로 성장하면서 미세유체 칩으로부터 배양액을 공급받기 때문에 포어 직경이 크면 클수록 3차원 배양환경 조성에 유리하다고 판단할 수 있다.

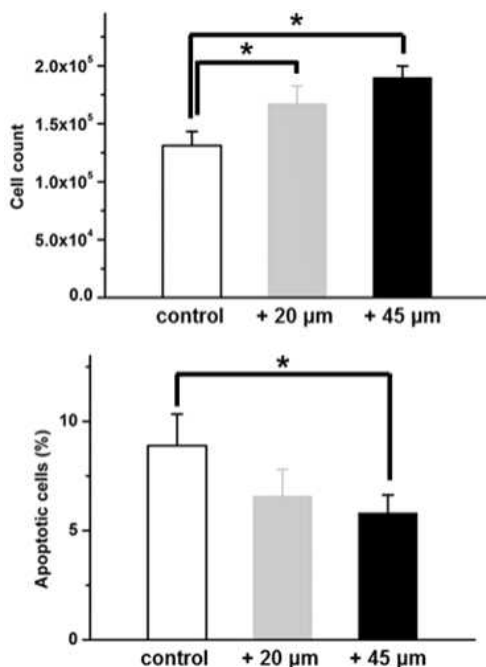


Fig. 8 Comparison of cell growth rate and apoptotic ratio of colorectal cancer cells (SW450) in 3d cancer cell culture system by porous film diameter

4. 결론 및 토의

본 연구에서는 체외에서 암-미세환경 구축이 가능한 새로운 배양시스템을 제안하고자 미세채널 칩 및 포러스 필름을 제조 한천 지지체와 결합된 최종 3차원 배양 시스템을 구축하였다. 유동평가 및 암세포 배양 실험 결과, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 미세유체 칩에 구성된 마이크로 채널의 폭:높이 종횡비는 1.5 대 1 이상이어야 배양액이 역류하

지 않고 미세혈관을 모사한 채널을 고르게 유동할 수 있다.

2) 기존 제품과는 달리, 미세유체 칩 위에 결합된 포러스 필름에 구성된 홀이 크면 클수록 한천 지지체에 배양액을 공급하여 세포가 배양되는 환경이 조성될 수 있다.

본 연구의 결과를 바탕으로 마이크로 채널의 형태, 필름 홀 크기, 입구의 유량을 조절하여 세포 유형별로 세포 배양 효율을 극대화 할 수 있는 다양한 3D 세포 배양 시스템을 확장 및 구축 할 수 있습니다.

저자기여

혈관모사 미세채널 칩 및 porous film 성형에 관한 연구 주저자는 한국생산기술연구원 박정연 연구원이, 세포 지지체 배양 평가 관련 연구는 한국화학연구원 고범석 선임연구원이 주저자임을 밝힙니다.

후기

본 연구는 한국산업기술연구원의 기관주요사업(바이오 부품 적용을 위한 선택적 투과성의 다층 3차원 기저막 구조 제작 금형기술개발, Kitech EO-200070)과 NST 프로그램(역생공학 기법을 이용한 3차원 세포배양 기반 신약평가 기술개발, CAP-15-10-KRICT)의 재정적 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- 1) Sourla, A., Doillon, C., & Koutsilieris M., "Three dimensional type I collagen gel system containing MG-63 osteoblastlike cells as a model for studying local bone reaction caused by metastatic cancer cells", *Anticancer Research*, 16(5A), pp. 2773-2780, 1996.
- 2) Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T., & Kumar, D. S., "Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review", *International Journal of Polymer Science*, Volume 2011, pp. 1-19, 2011.
- 3) Bergenstock, M. K., Balaburski, G. M., Lau, W., Sun, W., Sun, Q., & Liu, Q., "Polystyrene

- scaffolds: A novel tool for in vitro three-dimensional cancer models”, The First AACR International Conference on Frontiers in Basic Cancer Research, October pp. 8-11, 2009.
- 4) Fisher, K. E., Pop, A., Koh, W., Anthis, N. J., Saunders, W. B., & Davis, G. E., “Tumor cell invasion of collagen matrices requires coordinate lipid agonist-induced G-protein and membrane-type matrix metalloproteinase-1-dependent signaling”, *Molecular Cancer*, 5(69), 2006.
 - 5) Torkian, B. A., Yeh, A. T., Engel, R., Sun, C. H., Tromberg B. J., & Wong, B. J., “Modeling aberrant wound healing using tissue-engineered skin constructs and multiphoton microscopy”, *Archives of Facial Plastic Surgery*, 6(3), pp. 180-187, 2004.
 - 6) Kobayashi, K., Yoshida, A., Ejiri, Y., Takagi, S., Mimura, H., Hosoda, M., Matsuura, T., & Chiba K., “Increased expression of drug-metabolizing enzymes in human hepatocarcinoma FLC-4 cells cultured on micro-space cell culture plates”, *Drug Metabolism Pharmacokinetics*, 27(5), pp. 478-485, 2015.
 - 7) Kermanizadeh, A., Løhr, M., Roursgaard, M., Messner, S., Gunness, P., Kelm, J. M., Møller, P., Stone, V., & Loft, S., “Hepatic toxicology following single and multiple exposure of engineered nanomaterials utilising a novel primary human 3D liver microtissue model”, *Part Fibre Toxicol*, 11(56), 2014.
 - 8) Guzman, A., Ziperstein, M. J., & Kaufman, L. J., “The effect of fibrillar matrix architecture on tumor cell invasion of physically challenging environments”, *Biomaterials*, 35(25), pp. 6954-6963, 2014.
 - 9) Vinci, M.; Gowan, S., Boxall, F., Patterson, L., Zimmerman, M., Court, W., Lomas, C., Mendiola, M., Hardisson, D., & Eccles, S. A., “Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation”, *BMC Biology*, 10, (29), 2012.
 - 10) Jang, M., Neuzil, P., Volk, T., Manz, A., & Kleber, A., “On-chip three-dimensional cell culture in phaseguides improves hepatocyte functions in vitro”, *Biomicrofluidics*, 9(3), 034113, 2015.
 - 11) Wan, C. R., Chung, S., & Kamm, R. D., “Differentiation of embryonic stem cells into cardiomyocytes in a compliant microfluidic system”, *Annals of Biomedical Engineering*, 39 (6), pp. 1840-1847, 2011.

저자 소개

박 정 연(Jeong-Yeon Park)

[정회원]



- 2016년 2월 : 인하대학교 고분자공학과 (공학석사)
- 2011년 11월~현재 : 한국생산기술연구원 형상제조연구본부(금형), 연구원

< 관심분야 >

고분자가공-물리화학, 사출성형해석, 마이크로구조 성형

고 범 석(Byumseok Koh)



- 2013년 12월: 미시간 대학교-앤아버 약제학 (이학박사)
- 2016년 3월~현재: 한국화학연구원 의약바이오연구본부, 선임연구원

< 관심분야 >

약물 스크리닝, 오가노이드, 나노바이오소재

김 기 영 (Ki Young Kim)

[비회원]



- 2002년: 부산대학교 생물학과 (이학박사)
- 2003년 ~ 현재: 한국화학연구원 의약바이오연구본부, 책임연구원

< 관심분야 >

3D 생체질환모델, 질환치료제 개발

윤 길 상 (Gil-Sang Yoon)

[정회원]



- 2004년 2월: 인하대학교 기계공학과 (공학박사)
- 2015년 3월~2018년 2월: 과학기술연합대학원(UST) 패키징공학과, 교수
- 2018년 3월~2020년 3월: 한국생산기술연구원, 급형기술그룹, 그룹장
- 2020년 4월~현재: 한국생산기술연구원, 형상제조연구부문, 부문장

< 관심분야 >

CAD/CAM/CAI, 사출금형, 마이크로 가공, 정밀측정

이 동 목 (Dong-Mok Lee)



- 2005년 8월: 대구대학교 자연자원학과 (농학박사)
- 2002년 11월~2008년 1월: 성모여성병원 시험관아기센터 실장
- 2011년 3월~현재: 한국생산기술연구원 바이오메디칼생산기술센터, 수석연구원

< 관심분야 >

줄기세포, 세포대량생산, 3차원세포배양