

Microfabricated Cell Chip for Cell-based *in vitro* Assay

박제균, 김태한, 이상은, 김수현, 윤규식, 이정건
 LG 전자기술원 소자재료연구소 Synergetic Research Team
 전화 (02) 526-4554, FAX (02) 526-4973

Abstract: A microfabricated cell chip was developed to evaluate drug effect on mouse B16-F1 melanoma cell line. The cell chip system consists of 8-well culture cartridge incorporated with interdigitated array gold electrodes on each well, lock-in amplifier, 8-well cell scanner and computer as a system controller. Impedance of an electrode is increased according to adherent cell growth on the electrode surface. In order to verify drug effect on cell growth and viability, anti-tumor drugs were selected and investigated. The change of impedance was measured differentially between a control electrode containing only media and cell-cultured sample electrodes with time.

서론

최근의 바이오센서 연구 동향은 기존의 분석도구와는 분명한 차별성을 갖는 제품의 소형화, 편의성, 정확성, 신뢰성 등을 부여하기 위한 노력이 강조되고 있다. 세포 수준에서 약물, 독성 물질, ion의 변화 등과 같은 외부 자극에 대한 반응정도를 검출하는 기술은 바이오센서로서의 기능뿐만 아니라 살아있는 세포의 실시간 반응을 통해 기존의 방법으로는 측정 못하는 세포에 의한 복합적인 생리신호를 검출할 수 있는 장점이 있다.¹⁻⁵⁾ 이러한 세포수준에서의 연구는 생리활성물질의 스크리닝을 가능케 하여 그 응용을 동물실험 대체용 *in vitro* 스크리닝 기술 개발과 신약 후보물질에 대한 대량검색(high throughput screening) 등에 확대 적용시킬 수 있다. 본 연구에서는 interdigitated array (IDA) 전극형태의 cell chip을 반도체 미세가공기술로서 제작하고, 세포를 이용한 체외시험법 (*in vitro* assay)으로 활용할 수 있는 방안 에 대해 고찰하였다. 대부분의 동물세포는 미생물과 달리 기질에 의존적으로 붙어 자라며, 또한 세포막의 특성상 절연의 효과를 갖는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 동물세포의 특성을 응용하면 동물세포의 성장 및 활성을 전기적으로 측정할 수 있다. IDA 전극은 손가락 모양의 전극을 미세한 폭으로 중첩시킨 형태의 전극 구조로서 효소반응으로 유발되는 전도도 및 임피던스 변화를 측정하거나,⁶⁾ 전극활성물질의 연쇄적인 산화환원반응을 측정하는 바이오센서와 HPLC 검출기 등에 사용될 수 있다.^{7,8)} 특히, 반도체 미세가공기술을 이용하여 IDA 전극을 제작하는 경우, 수 마이크로 이하의 선폭을 갖는 IDA 전극을 제작할 수 있고, 소형, 저가로 전극을 대량 생산할 수 있는 장점이 있다.

재료 및 방법

본 연구에서는 체외시험법의 하나로서 암세포에 대한 항암제의 효과를 모니터링 하였다. 암세포의 모델로써 쥐의 피부암세포주인 B16-F1 melanoma 세포를 American Type Culture Collection (ATCC)으로부터 분양 받아, 10% fetal bovine serum, 항생제, glutamine이 포함된 DMEM 배지로 조직배양 하였다. 항암제로는 비교적 널리 알려진 etoposide, ellipticine을 선택하였다. 조직배양한 세포가 성장하여 표면에 균일하게 monolayer를 형성한 시점마다 1:10 비율로 계대배양을 하였고, 이들 중 일부를 cell chip에 접종하여 실험에 사용하였다. Cell chip은 유리 기판상에 photolithography 공정에 의해 IDA 금 전극을 형성시킨 후, IDA 전극상의 전극활성 영역을 제외한 나머지 영역에는 폴리이미드(polyimide)로서 절연층을 형성하였다. 다음 poly(dimethylsiloxane)(PDMS)로 8개의 well을 형성시킨 후 IDA 전극이 형성된 기판과 접착하여 cell chip을 완성하였다. 동물세포가 성장함에 따라 변하는 전극의 임피던스값을 측정하기 위하여 lock-in amplifier의 2개 channel을 이용한 차동 측정방식을 택하였다.

결과 및 고찰

세포가 분열하고 성장함에 따른 임피던스 변화유무를 IDA 전극이 내장된 cell chip을 이용하여 측정이 가능한지의 여부를 알기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. 플라스크 내에서 B16-F1 melanoma 세포를 배양한 후, 트립신으로 세포를 플라스크 바닥으로부터 떼어내서 적정량의 세포를 cell chip의 well에 접종하고, 두개의 well에는 배지만을 첨가하였다. 세포가 접종된 well과 배지만 첨가된 두 개의 well 중 한 개의 well은 차동 측정 방식에서 실험군으로, 배지만 첨가된 나머지 한 개의 well은 차동 측정 방식에서 대조군으로 삼았다. 세포가 접종된 well은 시간이 흐름에 따라 세포분열이 거듭되어 IDA 전극을 덮게 되므로 임피던스 값이 증가함을 알 수 있었다. 대조적으로 배지만 첨가된 well에서는 아무런 임피던스 차이 값을 나타내지 않으므로 시간의 변화에 상관없이 일정한 값을 나타내었다. 이와 같은 결과를 토대로 cell chip을 약물검사에 응용하였다. 위에서와 같은 방법으로 네개의 well에는 세포를 접종하고 두개의 well에는 배지만을 첨가한 후, 항암제로 알려진 etoposide를 농도를 달리하여 실험군인 세포가 접종된 well에 가하였다. 배지만 첨가된 대조군 well과 실험군의 임피던스 차동값을 그림 1에 나타내었다. 실험의 결과에서 보는 바와 같이 세포가 접종된 well에서는 세포의 성장이 약물 농도에 의해 변화함을 세포가 접종된 시료의 곡선의 차이로 확인할 수 있었고, 배지만이 있는 well은 대조군과의 임피던스 차동값의 변화가 없음을 알 수 있었다. 또한 cell chip에 의한 임피던스 측정을 기존의 방법과 비교하기 위하여 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 분석을 cell chip에서와 같은 조건

으로 수행하였다. 세포 접종 후 즉시, 세포 배양 10시간, 30시간, 60시간후의 배지에 MTT solution을 최종 농도가 0.5 mg/ml이 되도록 넣어주고 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 4시간 배양후에 DMSO에 녹여 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정된 결과를 그림 2에 나타내었다. MTT 분석법에 의해 얻어진 세포성장 곡선과 그림 1에서 얻은 cell chip 시스템에 의한 임피던스 결과를 비교시 세포의 활성화 패턴이 유사한 경향을 보였다. 그림 3은 B16-F1 세포에 ellipticine이라는 항암제를 각각의 농도별로 첨가시킨 후 2일간 배양시킨 cell chip을 현미경으로 관찰한 사진이다. 그림에서와 같이 ellipticine 처리농도가 높을수록 세포성장이 저해됨을 알 수 있었고, IDA 전극상부로부터 세포가 떨어져 나가는 양상이 관찰되었다. 따라서, 임피던스 측정방식의 cell chip 시스템을 이용하여 동물세포의 활성도를 측정하는 기존의 off-line 방법을 on-line으로 대체할 수 있는 가능성을 보여 주었다.

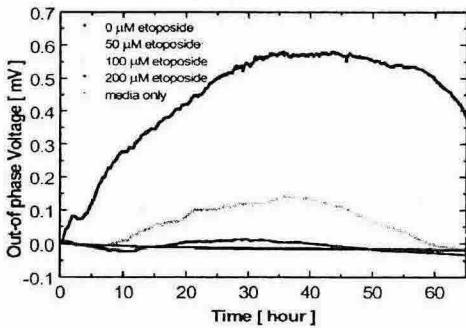


Fig. 1. Impedance measurement of B16-F1 cells for different concentrations of etoposide

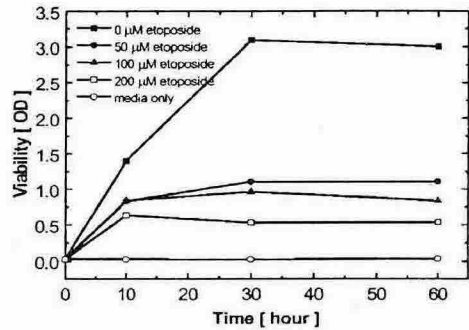


Fig. 2. MTT colorimetric assay of B16-F1 cells for different concentrations of etoposide

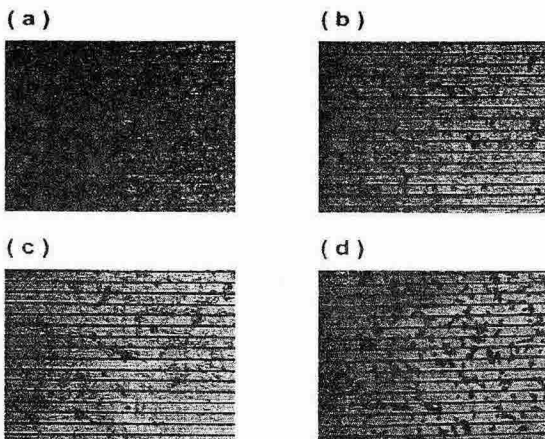


Fig. 3. Photograph of the B16-F1 cells after ellipticine treatments (after 48 hr) (a) 0 μM (b) 5 μM (c) 10 μM (d) 20 μM ellipticine

요약

미세 가공 기술을 이용하여 제작된 IDA 전극을 활용하여 임피던스 측정방식의 cell chip으로의 응용에 대해 고찰하였다. IDA 전극은 기존의 반도체 공정으로서 손쉽게 제작할 수 있고, 대량 제작시 전극의 재현성 확보가 용이하고 소형화 할 수 있으며 낮은 단가로 제작될 수 있는 장점이 있다. IDA 전극을 채용한 cell chip을 B16-F1 melanoma 세포 배양에 적용한 결과, 세포성장과 임피던스 변화량이 상관성을 보였고, 세포의 성장을 저해하는 약물의 투과시 cell chip의 임피던스 변화 역시 기존의 방법과 유사한 결과를 보여 주었다.

참고문헌

1. B. Wolf, M. Brischwein, W. Baumann, R. Ehret, and M. Kraus, "Monitoring of cellular signalling and metabolism with modular sensor-technique: The PhysioControl-Microsystem (PCM)" (1998), *Biosensors and Bioelectronics*, 13, 501-509.
2. I. Giaever and C. R. Keese, "A morphological biosensor for mammalian cells" (1993), *Nature*, 366, 591-592.
3. H. M. McConnell, J. C. Qwicki, J. W. Parce, D. L. Miller, G. T. Baxter, H. G. Wada, and S. Pitchford, "The CytosensorTM Microphysiometer: biological applications of silicon technology" (1992), *Science*, 257, 1906-1912.
4. R. Ehret, W. Baumann, M. Brischwein, A. Schwinde, and B. Wolf, "On-line control of cellular adhesion with impedance measurements using interdigitated electrode structures" (1998), *Med. Biol. Eng. Comput.*, 36, 365-370.
5. M.-C. Vernhes, P.-A. Cabanes, J. Teissie, "Chinese hamster ovary cells sensitivity to localized electrical stress" (1999), *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 48, 17-25.
6. W. Y. Lee, K. S. Lee, T. H. Kim, M. C. Shin, and J. K. Park, "Microfabricated conductometric urea biosensor based on sol-gel immobilized urease" (2000), *Electroanalysis*, 12, 78-82.
7. R. Hintsche, M. Paeschke, U. Wollenberger, U. Schnakenberg, B. Wagner, and T. Lisec, "Microelectrode arrays and application to biosensing devices" (1994), *Biosensors and Bioelectronics*, 9, 697-705.
8. H. Tabei, M. Takahashi, S. Hoshino, O. Niwa, and T. Horiuchi, "Subfemtomole detection of catecholamine with interdigitated array carbon microelectrodes in HPLC" (1994), *Anal. Chem.*, 66, 3500-3502.