

# 연골세포 부착력 평가

<sup>1</sup>이권용\*(세종대 기계공학과), <sup>1</sup>박상국(세종대 대학원 기계공학과),

<sup>2</sup>Deahwan Shin(SWRI, USA), <sup>3</sup>박종철(연세대 의학교실)

## Adhesion Strength Measurement of Chondrocyte

<sup>1</sup>K. Y. Lee\*(Mech. Eng. Dept., SeJong Univ.),

<sup>1</sup>S. K. Park(Mech. Eng. Dept., SeJong Univ.),

<sup>2</sup>D. Shin(SWRI, USA),

<sup>3</sup>J. C. Park(Biomedical Eng. Dept., YonSei Univ.)

### ABSTRACT

Quantitative evaluation of substrates for cells is essential to understanding cell-material adhesive interaction and it is also necessary for the development of new biomaterials. Many cells on adhesive molecules will form an organization of actin into bundles and production of the large, highly organized structures termed focal adhesions. To better understand adhesion formations between cells and substrata, we have quantified the force required to displace attached cell. we allowed rabbit knee chondrocyte to attach on a substratum of microscope slide glass. Our results demonstrate that a force is required to detach cells is changed according to detachment time variation.

**Key Words :** Quantitative evaluation, Chondrocyte, Focal adhesion, Detachment time

### 1. 서론

기질(Substrate)에 대한 세포의 부착현상은 세포의 형태, 이동, 성장과 분화 등과 같은 세포에서 일어나는 여러 현상을 조절하는 중요한 인자이다. 인체를 이루는 살아있는 조직과 적절한 친화성이 가장 중요한 특성으로 간주되는 여러 생체재료들의 경우에 특히, 이 재료들의 표면에서 세포와 재료간의 상호작용에 의한 세포의 부착(Cell adhesion)은 생체 친화성(bioactivity)을 측정하는 중요한 방법 중 하나로 여겨지고 있다.

세포의 부착은 정형외과 및 치과용 implant의 초기 기능과, 조직공학으로 형성된 구조체의 기능을 평가하는데 중요한 시험방법이 된다. 조직공학적 적용에서 우선 고려할 사항은 지지체(scaffold)로 기능을 할 재료와 대상 세포간의 부착이 가능한지의 여부와 부착 정도를 판단하

는 것이다.

그러므로 세포와 재료간 상호작용을 이해하고 세포에 대해 적절한 친화성을 갖는 생체 재료들을 구성하기 위해서는 생체재료의 세포의 친화성을 결정하는 세포 부착력의 정량적 평가(quantitative evaluation)가 중요하다.

지금까지 생체재료의 대상 세포와의 친화성을 측정하기 위한 여러 방법들이 시도되었다. 이런 방법들 중에서 재료의 표면에 부착된 세포의 수를 세어 생체 친화성을 평가하는 실험이 이루어졌다. 하지만 이 방법은 세포와 재료 표면 사이의 실제 부착력을 정량적으로 나타내 주지 못한다. 또 다른 방법으로 세포를 원판 위에 부착한 후 원판을 회전시켜 원심력에 의한 세포의 detachment force를 측정하는 방법과 부착된 세포 위에 유체를 흘려줌으로써 전단력에 의한 세포의 detachment force를 측정하는 방법들이 많이 사용되었다. 하지만 이런 방법

들은 하나의 세포가 아닌 세포군(population of cells)의 부착 정도를 측정하는 실험들으로써 세포와 생체재료의 부착에 대한 정성적인(qualitatively) 평가를 제공하지만, 정량적인(quantitatively) 평가는 제공하지 못한다.

최근 single cell 에 대한 세포부착력 측정을 위한 일련의 연구가 있었는데, Yamanoto 등이 fibroblast cell 을 steel cantilever system 을 이용해서 부착력을 측정하였으며, 김영직 등이 돼지 무릎 연골세포를 사용하여 glass pipette 을 이용한 adhesion force 를 측정하였다. 또한 Dr. Athanasio group 이 bovine articular chondrocyte 로 glass rod 를 이용한 photodiode 를 통한 signal 의 변화를 force 로 바꾸어 세포의 부착력을 측정하였다.

본 연구에서는 토끼 무릎 연골에서 분리된 연골세포(chondrocyte)를 이용하여 유리 표면에 부착시키고, 부착된 하나의 연골세포와 유리표면과의 계면에서의 부착력을 Dr. Shine 이 개발한 detachment measurement system 을 이용하여 계면에 평행한 방향으로 shear force 를 작용하여 연골세포가 표면으로부터 분리될 때의 detachment force 를 직접 측정하는 시스템을 사용하였다. 본 연구는 이전 연구와는 다른 동물의 조직에서 분리된 세포를 대상으로 부착시간과 detaching speed 의 변화에 의한 부착력의 변화를 측정하고, 다른 연구 group 의 실험 data 와의 비교를 통해서 세포와 부착되는 material 들과 incubation 시간, detaching speed 에 따른 부착력의 변화의 양상을 알아보는 것을 목적으로 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 Detachment Measurement System

하나의 세포가 외부의 힘에 의해 대상 재료의 세포와의 계면에서 떨어지는데 필요한 힘을 측정하기 위해서는 지극히 정밀하고 민감하게 force (nano Newton level)를 측정할 수 있는 시스템의 도입이 필수적으로 요구된다. 일반적으로 사용되는 force transducer 는 이 시스템에 사용될 수 없으며 다른 적용방법이 요구된다. 본 연구는 하나의 세포를 detach 시키는데 필요한 방법으로 적은 force 를 효율적으로 측정하기 위하여 cantilever beam theory 를 이용하여 detachment force 를 계산하였다.

이 장치에 사용되는 기본적인 hardware 장치는 (1) 1 axis piezoelectric translator 와 이를 제어하는 controller, (2) 75 $\mu$ m diameter detaching glass

tip, (3) 7 $\mu$ m carbon filament bundle, (4) dual photodiode 와 전기회로 system, (5) inverted microscope, (6) x-y-z axis linear positioner, 등으로 구성된다.

Force 의 측정은 75 $\mu$ m diameter detaching glass tip 을 측정하고자 하는 대상 세포의 측면에 위치시키고, tip 을 세포와 부착 material 의 계면에 평행하게 움직인다. 이때 detaching glass tip 에 평행하게 부착된 diameter 7 $\mu$ m carbon filament 의 움직임으로 dual photodiode 전류의 변화가 생기며 이를 전압의 변화로 바꾸어 준다. 이 전압은 미리 프로그램된 computer 에 의해 displacement 로 변환하였다.

결국 세포에 접촉 후 piezoelectric transducer 에서 움직인 거리와 세포와 접촉한 부분의 움직임의 차에 의해 cantilever beam 의 deflection 을 계산할 수 있고, 이는 75 $\mu$ m detaching glass tip 의 Young's modulus, 길이, 관성모멘트를 계산해서 cantilever beam theory 를 통해 detachment force 를 계산하였다.

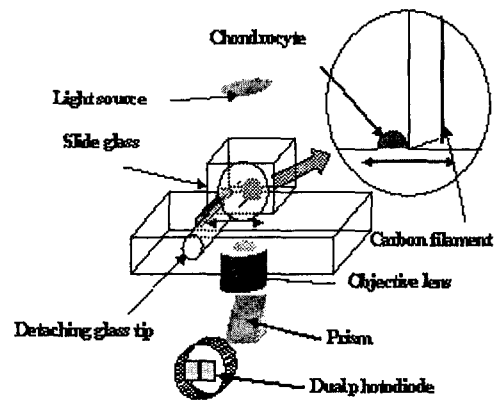


Fig. 1 Detachment force measurement system

### 2.2 Substrate 와 chondrocyte 준비

유리 슬라이드를 폭, 길이, 두께가 각각 8.0mm x 15.0mm x 1.0mm 가 되도록 10 개를 묶어서 같은 크기로 자른 후, 자른 슬라이드는 autoclave 후 건조시키고 four well chamber 에서 chondrocyte 를 seeding 하려는 면이 위쪽에 있도록 포개어 놓는다. 여기에 토끼 뒷다리 연골에서 분리되어 primary culture 된 chondrocyte 를 passage 5 이내의 것으로 하여, 3 x 10000/ml 로 세포의 개수를 조절하여 파이펫으로 슬라이드 윗 면에 seeding 한다. Seeding 후 chondrocyte 가 부착된 면이 잠길 정도로 10% fetal bovine serum(FBS), 2mM - Lglutamin, 1mM Sodium

pyruvate, 1v%, penicillin - streptomycin 을 포함하는 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM) 배지를 추가한다. Seeding 된 chamber 는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator 에서 배양하고 2 시간 이후 하나의 슬라이드 글라스를 꺼내어 DMEM 배지가 채워진 1 well chamber 에 넣어 inverted microscope 상에서 chondrocyte detachment 실험을 수행하였다.

### 2.3 Detachment calibration and experiment

연골세포가 four-well culture chamber 에 있는 slide glass 위에 seeding 되고 2-6 시간 배양 후 slide 조각을 하나 씩 분리하여 one-well culture chamber 의 안쪽 왼편 모서리 부위바닥에 위치시킨다. 75µm detaching glass tip 을 측정하고자 하는 chondrocyte 의 측면에 위치하게 하고 조도와 focus 를 맞춘다. Micro-manipulator 를 실험 전에 전 후진시키며 detaching glass tip 의 이동에 따른 dual photo-diode 출력전압의 그래프가 선형인 지점을 선정하고, Target cell 을 detaching glass tip 으로 직접 누르지 않는 상태로 piezo-transducer 를 구동시켜 calibration 을 실시하여 detaching glass tip 이동거리와 dual photo-diode 출력전압 사이의 비례상수를 결정한다.

Calibration 에서 사용한 inverted microscope 의 조도와 focus 를 변화시키지 않고 microscope stage knob 을 조절하여 target 이 되는 cell 의 옆에 detaching glass tip 의 끝단을 위치시킨다. Calibration 에서 결정된 비례상수를 지정하고 piezo-transducer 이동거리를 예상해 지정한다. 이 실험에서 사용된 detaching glass tip 이동거리는 24 µm로 설정하였으며, detaching speed 를 0.75-1.0 µm/s 로 설정하여 piezo-transducer 를 작동시킨 후 원위치 시켜서 detachment force 와 displacement 를 측정하였다.

### 3. 결과

토끼 무릎 연골세포를 slide glass 위에서 2-6 시간 동안 incubation 시킨 후 앞 절에 언급한 detachment technique 을 이용하여 nano Newton level 의 cell adhesive force 를 성공적으로 측정하였다. 실험 결과로 다음과 같은 detachment force vs. displacement 그래프를 얻었다 (Fig. 3 and Fig. 4). 모든 경우에 detaching speed 가 적을 때 (0.75 µm/s) detaching speed 가 큰 경우 (1.0 µm/s) 보다 detachment force 가 큰 것으로 관찰되었고, culture incubation time 이 길수록 detachment force 가 크게 관찰되었다.



Fig. 2 Photographs showing detaching procedure viewed on an inverted microscope (a) before detachment and (b) after detachment.

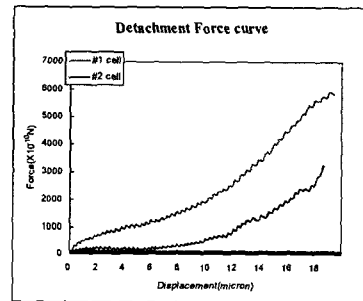


Fig. 3. Detachment force vs. displacement curve for the #1 cell tested with 0.75 µm/s detaching speed, and for the #2 cell tested with 1 µm/s detaching speed against chondrocyte cultured for 2 hours.

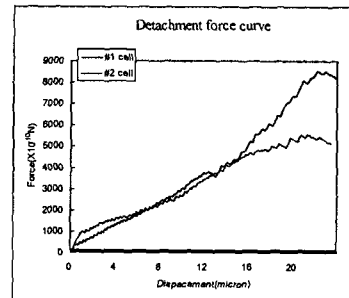


Fig. 4. Detachment force vs. displacement curve for the #1 cell tested with 0.75 µm/s detaching speed, and for the #2 cell tested with 1 µm/s detaching speed against chondrocyte cultured for 6 hours.

cultured for 6 hours.

Cell type Applied techniques	Rabbit knee chondrocyte	Bovine articular chondrocyte <sup>(6)</sup>	Murine fibroblast L929 <sup>(5)</sup>	Porcine knee chondrocyte <sup>(7)</sup>
Incubation time	2-6 hrs	2 hrs	1-2 days	8 hrs-5 days
Attached material	Glass	Glass	Glass, Polystyrene	PCL, PLLA, PLGA
Detaching speed ( $\mu\text{m/s}$ )	0.75-1.0	1	20	n/a
Adhesive force (nN)	250-850	25-50	150-680	7-56
Probe type	75 $\mu\text{m}$ glass cantilever	75 $\mu\text{m}$ glass cantilever	L-shaped steel cantilever	1-2 $\mu\text{m}$ dia. pipette cantilever

Table 1 Comparison of applied technique and cell detachment force

#### 4. 토론

Table 1 은 본 연구결과와 다른 연구자들의 실험결과의 비교를 보여준다. 본 실험 결과의 cell adhesive force 는 Yamamoto 등의 결과와 비슷한 정도를 보이지만 Athanasio 등과 김영직 등의 결과 보다는 10 배 이상의 큰 것으로 나타났다. 여러 실험 간에는 technique 의 차이, 대상 cell 의 차이, incubation time 의 차이, 등에 의하여 직접적인 결과 비교가 어려운 상태이며, 또한 정보를 알 수 없는 접촉표면 거칠기 차이 등이 cell adhesive force 측정 결과 영향을 주었을 것으로 사려된다.

같은 실험적 technique 이 사용되고 다른 동물에서 분리된 chondrocyte (bovine articular)가 사용된 Athanasio 등의 실험에서 나타난 10 배 이상의 adhesive force 는 대상 chondrocyte 의 크기에 차이가 있는 것으로 사려된다. Cell seeding 이후 대상 cell 을 microscope 위에서 선정할 때, culture incubation time 이 같을 지라도, cell 의 형상이나, 크기 등이 매우 다양하게 분포하고 있어서 대상 cell 의 선정에 따른 adhesive force 의 결과 분포도 매우 크게 나타나는 경향이 관찰되었다.

앞으로 더 많은 실험을 통해서 보다 확실한 force 의 차이의 원인이 밝혀지면, cell 의 종류나 material 또는 substrate 에 따른 cell detachment 의 mechanism 을 밝히는데 좋은 자료로 사용될 것이라 판단된다. 또한 더 나아가 생체 내에 들어가는 여러 가지 biomaterial 과 이와 반응하는 여러 세포의 물질과의 부착 특성을 파악함

으로써 이를 통한 adhesion 에 영향을 미치는 factor 들을 조절함으로써 cell 과 materials 간의 optimized condition 의 형성을 유도할 통해 biomaterials 의 임상적 적용을 위한 좋은 자료로 이용될 수 있을 것이라 기대된다.

#### 후기

본 연구는 2001 년 보건복지부 보건의료기술 연구 개발사업 (01-PJ1-PG3-31400-005)의 연구비 지원으로 수행 되었습니다. 이에 감사드립니다.

#### 참고문헌

1. Edelman CM. Cell adhesion molecules. Science 1983;291
2. Sung K-LP, Kwan MK, Maldonado F, Akeson WH. Adhesion strength of human ligament fibroblasts. J Biomech Eng 1994; 116:237-42
3. Garcia AJ, Ducheyne P, Boettiger D. Quantification of cell adhesion using a spinning disc device and application to surface-reactive materials. Biomaterials 1997;18:1091-8
4. Shin D, Athanasiou KA. Cytoindentation for obtaining cell biomechanical properties. L Orthop Re 1999; 17:880-890
5. Yamamoto A, Mishima S, Maruyama N, Sumita M. Quantative evaluation of cell attachment to glass, polystyrene, and fibronectin- or collagen-coated

- polystyrene by measurement of cell adhesive shear force and cell detachment energy. *J Biomed Mater Res* 2000; 50:114-124.
6. Athanasio KA, Thoma, BS, Lanctot DR. Shin D, Agrawal CM, Lebaron RG. Development of the cytodetachment technique to quantify mechanical adhesiveness of the single cell. *Biomaterials* 1999; 20:2405-2415
  7. 김영직, 신정욱, 박기동,, 이진우, 김정구, 지경수, 류수하, ‘세포와 고분자 표면간의 정량적 부착력 측정, 생체재료학회지, 제 6 권 2 호, pp.65-71, 2002.