

바이오리액터를 이용한 MC3T3-E1 세포의 기계적 자극에 대한 영향

이인환[†] · 박정훈* · 이승재** · 조동우*** · 강상순****

Effects of Mechanical Stimulation for MC3T3-E1 Cells using Bioreactor

In Hwan Lee, Jeong Hun Park, Seung-Jae Lee, Dong-Woo Cho, Sang Sun Kang

Key Words : Bioreactor(바이오리액터), Mechanical stimulation(기계적 자극), MC3T3-E1

Abstract

It is reported that mechanical stimulation takes a role in improving cell growth in skeletal system. And various research groups have showed that developed bioreactor to stimulate cell-seeded and three-dimensional scaffold. In this study, we designed a custom-made bioreactor capable of applying controlled compression to cell-seeded agarose gel. This device consisted of a circulation system and compression system. In circular system, culture chamber was sealed for prohibiting contamination and media solution was circulated by pump. In compression system, mechanical stimuli were controlled by LabVIEW software and mechanical transfer system. Cell-encapsulated agarose gels were cultured for up to 7 days. There were significant differences between the number of cells grown in dynamic cell culture and in static cell culture from 3 days to 7 days.

1. 서론

세포의 분화, 증식 및 조직 재생에 있어서 물리적 자극에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 최근에는 다양한 물리적 자극이 세포 성장에 중요한 역할을 한다는 실험적인 연구결과가 보고되고 있다. 특히 뼈, 연골조직의 경우는 압축력과 같은 기계적 자극에 영향을 받는 것으로 알려져 있다⁽¹⁻³⁾. 이와 관련하여 기계적 자극을 고려한 동적 배양기의 개발이 이루어지고 있으며 점차 상용화 되어가고 있다. 즉, 배양액의 유동, 축 하중, 전기장 혹은 자기장 등과 같은

물리적 자극을 세포에 가해주는 장치가 개발되고 있다. 하지만 이와 같은 기존 연구들은 단순한 경험적 수준의 반복 자극만을 고려했다는 점에서 한계가 있으며, 또한 매우 고가이고 사용자의 다양한 요구에 부합하기에는 여러 가지 제한이 따르는 단점이 있다. 이에 본 연구에서는 단순한 형태의 자극이 아닌 다양한 모드의 기계적 자극이 세포의 분화, 증식 및 조직재생에 어떠한 영향을 주는지 분석하기 위해 바이오리액터를 제작하였고 이를 이용하여 MC3T3-E1 세포의 배양특성을 살펴 보았다. 특히, 본 연구에서 개발된 바이오리액터는 쾌속조형 기술을 이용하여 신속한 설계 변경 및 프로토타입의 제작으로 개발 기간 및 비용 절감을 할 수 있었다⁽⁴⁾.

2. 바이오리액터의 설계 및 제작

2.1 바이오리액터

뼈, 연골조직 같은 골격계 생체조직은 일반적으로 중력방향에 대한 압축력을 받고 있다. 따라서

[†] 회원, 충북대학교 기계공학부
E-mail : anxanx@chungbuk.ac.kr
TEL : (043)272-3161 FAX : (043)263-2441

* 충북대학교 정밀기계공학과 대학원

** 충남대학교 BK21 메카트로닉스 사업단

*** 포항공과대학교 기계공학과

**** 충북대학교 과학교육과

이러한 환경과 유사하게 바이오리액터를 설계하여야 한다. 배양 챔버 내의 인공지지체에 기계적 자극을 전달해 주기 위해 모터의 회전 운동에 따라 구동부 (moving part)가 볼스크류 축 방향으로 상하 운동을 하게 된다. 이에 따라 구동부에 고정된 압축 바 (compression bar)가 하부에 위치한 인공지지체에 압축을 가하는 구조로 되어 있다. Fig. 1 (a)는 본 연구에서 개발된 바이오리액터의 3D CAD 모델이다. 각각의 인공지지체에 효과적으로 압축 자극을 전달하기 위해서 인공지지체의 미소한 높이 차이에 맞추어 개별적으로 압축 바의 높이를 조정할 수 있도록 설계하였다.

세포 배양을 위해 인큐베이터와 같은 환경이 되도록 CO₂ 가스 농도 (5%), 배양 온도 (36.5°C), 그리고 외부 환경에 의한 오염을 방지하기 위한 독립된 배양 챔버를 구현하였다. Fig. 1 (b)는 본 연구에서 구현한 배양 챔버이다. CO₂ 가스의 유량은 레귤레이터와 플로우메타 (flowmeter)를 연결하여 조절하게 된다. 또한, 챔버 내 배양액의 순환⁽³⁾을 위해 워터베스 (waterbath)에 배양액이 담긴 용기를 넣고, 온도가 36.5°C 로 유지되는 배양액을 두 개의 펌프를 이용하여 공급 및 배수를 담당하게 하였다.

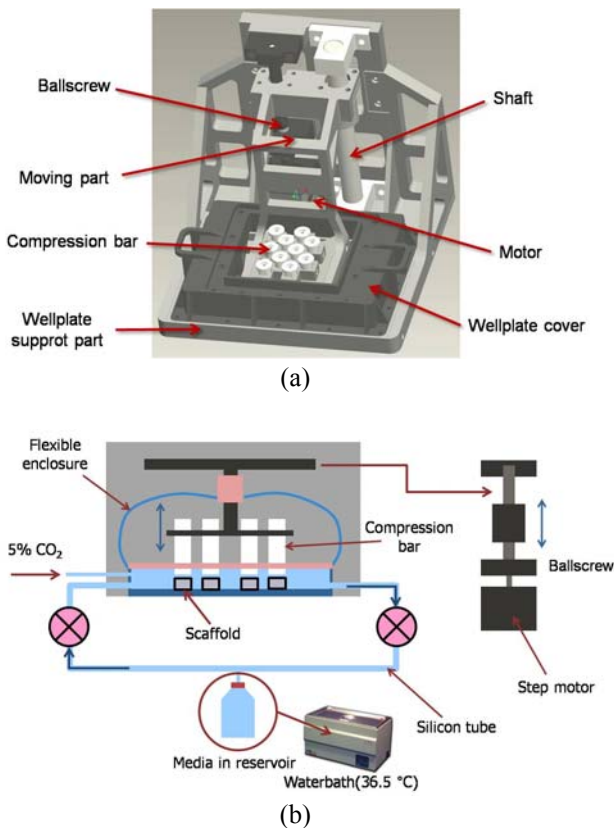


Fig. 1 Design of Bioreactor; (a) CAD model, (b) schematic drawing of independent culture chamber

2.2 제어시스템

배양 챔버 내의 인공지지체에 가해지는 기계적 자극을 제어하기 위해서는 이송부를 제어할 수 있는 별도의 제어 장치 및 제어 소프트웨어가 필요하다. 이를 위해 PC 에 내장된 모션 컨트롤러 (PCI-7334, NI) 및 모터 드라이브(MID-7604, NI)를 이용하여 스텝모터 (PK23-01A, Oriental Motor)를 제어하도록 하였다. 또한 NI (national instrument)社의 LabVIEW 를 이용하여 제어 소프트웨어를 개발하였다. 이를 이용하여 지속적이거나 간헐적인 두 가지 모드의 기계적 자극을 제어할 수 있다 (Fig. 2).

첫 번째 모드의 자극은 일정 횟수의 반복자극과 다음 자극 사이의 일정한 지연시간을 두는 방식으로 이송 속도와 가속도, 그리고 자극의 세기 (인공지지체 높이에 대한 압축 길이)와 반복 자극의 횟수, 반복 자극 사이의 지연시간, 그리고 한 사이클의 총 반복 횟수를 입력 파라미터로 하였다. 한편, 두 번째 모드의 자극은 한 번의 자극을 준 상태에서의 지연시간과 제 위치에서의 반복 지연시간을 두는 방식으로서 이를 반복하게 된다. 입력 파라미터는 이송속도와 가속도, 자극의 세기, 압축 상태에서의 지연시간, 제 위치에서의 지연시간, 한 사이클에 대한 총 반복 횟수이다. Fig. 3 은 본 연구에서 개발된 LabVIEW 프로그램의 스크린 이미지를 나타낸다.

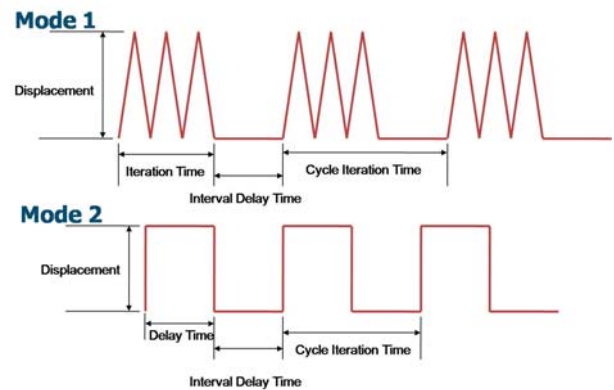


Fig. 2 Two modes of mechanical stimulation

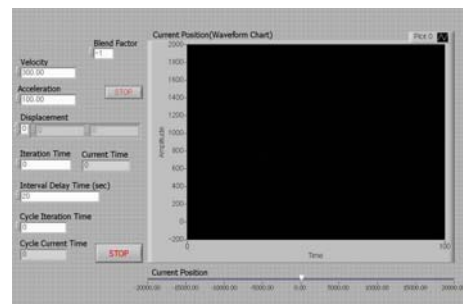


Fig. 3 Screen image of developed control software

본 연구에서 개발된 바이오리액터에 대한 각 부품은 상용화된 RP 장비 (Eden250, Sysopt)를 이용하여 제작되었다. 구동실험을 통하여 제어 소프트웨어의 성능을 검증하였으며 RP 장비의 사용 수지의 재료 물성치를 분석하여 세포가 배양되는 환경에 적합함을 확인하였다. 한편, 인공지지체에 직접적으로 접촉되는 부분은 테프론 (Teflon)을 이용하여 가공하였다.

3. 세포 실험 결과

3.1 아가로스 젤 (agarose gel) 제조

기계적 자극에 대한 세포의 배양 특성을 살펴보기 위하여 세포가 포함되어 있는 아가로스 젤을 이용하여 디스크 모양의 인공지지체를 제조하였다. 2% 농도의 세포 캡슐형 아가로스 젤을 만들기 위해 4%의 아가로스 용액 (10ml)과 세포가 부유된 배양액 (MC3T3-E1, n=10, 8×10^5 /ml, 10ml, α -MEM + 10% FBS)을 1:1의 비율로 섞는다. 이렇게 2% 농도로 맞춰진 혼합 용액을 원통형 ($\text{Ø}10 \times 5\text{mm}$)으로 제작된 몰드에 주입하여 경화시킨다. 아가로스 젤은 약 40°C 이상에서는 점성을 갖는 액체상태로 존재하고 상온에서는 젤 형태로 굳어지는 성질을 갖고 있다. Fig. 4는 아가로스 젤을 이용하여 인공지지체를 제조하는 공정을 나타내고 있으며, Fig. 5는 실제 제조되어진 세포 캡슐형 아가로스 인공지지체와 배양 챔버에 놓여진 모습이다.

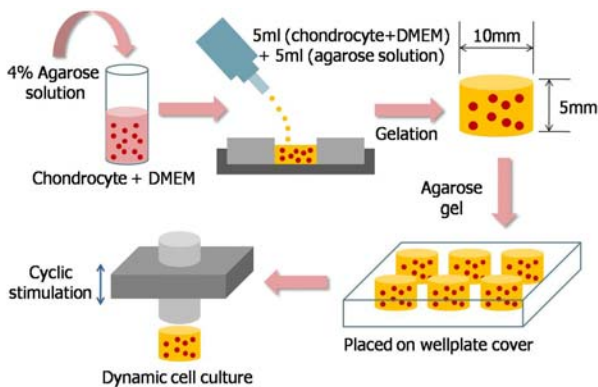


Fig. 4 Schematic diagrams showing the dynamic cell culture procedure of agarose gel

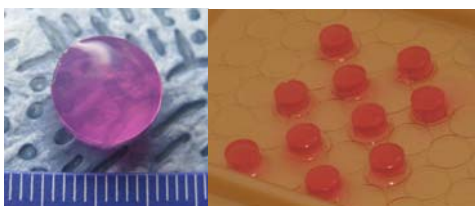


Fig. 5 Fabricated disk-shaped agarose gel for dynamic cell culture

3.2 세포 배양

제조된 아가로스 인공지지체를 정적 배양을 위해 기계적 자극이 없는 일반적인 culture dish와 동적 배양을 위한 기계적 자극을 줄 수 있는 배양 챔버에 각각 놓는다. 배양 챔버에 놓인 아가로스 인공지지체에는 압축 바를 이용한 압축력이 가해지게 된다. 본 연구에서는 5mm의 압축 변위 (아가로스 인공지지체 높이의 10%)로 일일 8시간씩, 1Hz의 주기로 사인파형의 압축을 아가로스 인공지지체에 가해주며 총 7일 동안 동적 세포 배양 실험을 수행하였다.

세포캡슐형 아가로스 인공지지체는 각각 인큐베이터와 바이오리액터의 배양 챔버 내에서 총 7일 동안 정적/동적으로 배양되었다. 7일 중 1일째, 3일째, 7일째에 세포의 증식에 대한 평가 실험을 위해 cell counter와 증식된 세포를 관찰하기 위한 형광 염색을 수행하였다. Fig. 6은 세포의 정적 배양과 동적 배양에 대한 세포의 증식을 그래프로 나타낸 것이고, Fig. 7은 세포캡슐형 아가로스 인공지지체에 대한 7일째의 형광 이미지를 나타낸 것이다. 붉은 점으로 염색된 세포의 수가 동적 배양의 경우 훨씬 많은 것으로 관찰되어 바이오리액터로 기계적 자극을 준 동적 배양에서 세포의 증식이 더 효과적으로 일어난 것으로 판단된다.

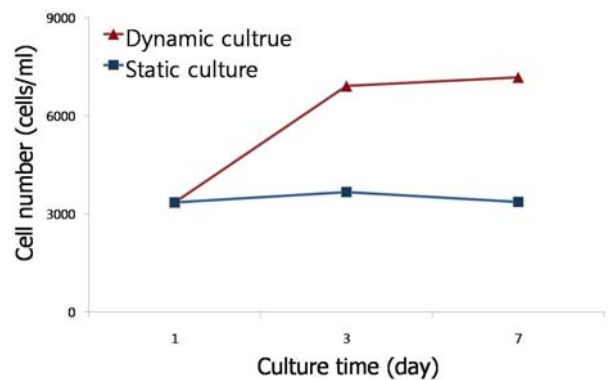


Fig. 6 Number of MC3T3-E1 cells in dynamic and static culture

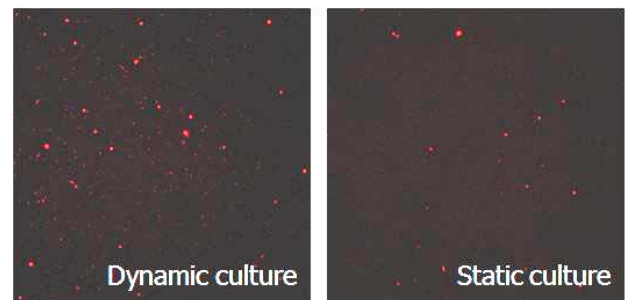


Fig. 7 Fluorescence images of agarose gels at 7 days ($\times 100$)

4. 결 론

본 연구를 통하여 다양한 기계적 자극에 대한 세포의 배양 특성을 분석할 수 있는 바이오파이퍼를 개발하였으며, MC3T3-E1 세포를 이용하여 그 영향에 대한 실험을 수행하였다. Cell counter 분석 결과를 살펴보면 일반적인 정적 배양보다 기계적 자극이 주어지는 동적 배양 조건에서 세포의 개체 수가 증가하는 것을 알 수 있었다. 또한, 7 일째의 형광이미지를 살펴보면 동적 배양의 경우 정적 배양 경우보다 많은 수의 세포가 염색되어 보여지는 것으로 보아 기계적 자극이 세포의 증식에 영향을 주는 것으로 사료된다. 향후 다양한 기계적 자극 조건에 대한 세포의 분화, 증식에 대한 영향을 분석하고자 한다.

참고문헌

- (1) G. E. Nugent-Derfus, T. Takara, J. K O'Neill, Cahill, S. Gortz, T. Pong, H. Inoue, N. M. Aneloski, W. W. Wang, K. I. Vega, T. J. Klein, N. D. Hsieh-Bonassera, W. C. Bae, J. D. Burke, W. D. bugbee, R. L. Sah, 2007, "Continuous passive motion applied to whole joints stimulates chondrocyte biosynthesis of PRG4," *OsteoArthritis and Cartilage*, Vol. 15, No. 5, pp. 566~574.
- (2) John D. Kisiday, Moonsoo Jin, Michael A. DiMicco, Bodo Kurz, Alan J. Grodzinsky, 2004, "Effects of dynamic compressive loading on chondrocyte biosynthesis in self-assembling peptide scaffolds," *Journal of Biomechanics*, Vol. 37, No. 5, pp. 595~604.
- (3) James A. Cooper Jr., Wan-ju Li, LeeAnn O. Bailey, Steve D. Hudson, Sheng Lin-Gibson, Kristi S. Anseth, Rocky S. Tuan, Newell R. Washburn, 2007, "Encapsulated chondrocyte response in a pulsatile flow bioreactor," *Acta Biomaterialia*, Vol. 3, No. 1, pp. 13~21.
- (4) 박정훈, 이인환, 이승재, 조동우, 2008, "기계적 자극을 고려한 bioreactor 개발," 대한기계학회 바이오공학부문 춘계학술대회 논문집, pp. 98-99.