

정상 간세포와 간암세포의 플라즈마 특성에 관한 비교연구

김대연[†] · 권보미^{**} · 김단비^{**} · 최원호^{**} · 신현정^{*}

Comparative study of plasma effects on human liver normal and cancer cells

Daeyeon Kim, Bomi Gweon, Dan Bee Kim, Wonho Choe and Jennifer H. Shin

Key Words : Cold plasma(저온 플라즈마), Cancer therapy(암치료), Biomedical engineering(의공학)

Abstract

Plasma is 4th state of matters, which consists of electrons, neutral, and ionized particles. In biomedical research, cold plasma, which is generated in atmospheric condition, has been applied to disinfect microorganisms such as bacteria and yeast cells. Because of its low temperature condition, the heat-sensitive medical device can be easily sterilized by the cold plasma treatment. In recent years, the effects of plasma on mammalian cells have arisen as a new issue. Generally, plasma induces intensity dependent necrotic cell death. In this research, we investigate the feasibility of cold plasma treatment for cancer therapy by conducting comparative study of plasma effects on normal and cancer cells. We use THLE-2 (human liver normal cell) and SK-Hep1 (human liver metathetic cancer cell) as our target cells. The needle type of cold plasma is generated by the Helium plasma device. Two types of cells have different onset plasma conditions for the necrosis, which may be explained by difference in electrical properties of these two cell types.

기호설명

d: 전극에서 sample까지의 거리(mm)
r: Helium gas flow rate(lpm)
V: 전극과 기판 사이에 걸어준 전압의 크기(V)
f: 걸어준 전압의 진동수(kHz)
t: sample에 플라즈마를 처리한 시간(sec)

1. 서론

플라즈마는 중성 상태의 기체분자들이 외부에서 가해진 에너지에 의해 이온화되어 에너지가 높은 전자, 이온, 중성 분자들이 혼합되어 있는 상태를 말한다. 일반적으로 대기압보다 낮은 저기압 하에서 플라즈마가 발생하며 높은 온도 특성을 보인다. 이런 저기압 플라즈마는 그동안 많은

연구가 이루어졌고 반도체 공정과 같은 산업에 활발히 이용되어왔다. 한편, 플라즈마 기술의 발전으로 인해 대기압 하에서도 플라즈마를 생성시킬 수 있게 되었다. 이렇게 발생하는 대기압 플라즈마(atmospheric plasma)는 온도가 비교적 낮기 때문에 저온 플라즈마(cold plasma)라고 불린다. 저온 플라즈마는 저기압 플라즈마와 달리 진공 시스템이 필요 없고 온도가 낮아서 여러 분야에 그 활용도가 크다는 장점이 있다.⁽¹⁾ 일반적으로 저온 플라즈마는 내부에 있는 active radical 들에 의해 플라즈마가 닿는 표면에서 저온으로도 활발한 화학반응을 유도할 수 있다. 또한, 플라즈마 가스(gas)의 종류에 따라 처리하는 표면을 친수성 또는 소수성으로 개질 할 수 있다. 이를 이용하여 열에 약한 의류 같은 재료들을 표면 처리할 수 있다.⁽²⁾

바이오 분야에서도 저온 플라즈마를 이용하는 사례들이 늘고 있다. 플라즈마의 저온이면서 높은 화학반응성을 이용하여 의료장비, 특히 열에 약한 장비들을 쉽고 빠르게 살균할 수 있다.^(3,4,5) 또는

[†] 회원, 논문발표자의 소속
E-mail : centralcore@kaist.ac.kr
TEL : (042)869-3271 FAX : (042)869-5230

* 한국과학기술원 기계공학과

** 한국과학기술원 물리학과

화학약품, 화학무기, 생물학무기 등의 제독에도 응용될 수 있다. 또한, 최근에는 biomedical application 으로 mammalian cell 에 플라즈마를 노출시켜서 세포에 가해지는 플라즈마 효과를 알아보려고 하는 연구들이 수행되고 있다.^(6,7) 이 연구들은 대부분 한 종류의 세포를 연구 대상으로 하고 있다. 따라서, 우리 연구에서는 선행연구들과 차별화를 두어 사람의 정상 간세포와 간암세포를 대상으로 플라즈마 특성을 비교하고자 한다. 정상세포와 암세포의 플라즈마 특성 차이를 규명함으로써 플라즈마를 이용한 암치료의 가능성을 알아 볼 수 있을 것이다.

2. 실험 장치 설명

2.1 핀 타입 플라즈마 제트 장치

플라즈마 가스는 Helium(99.99% purity) gas 를 사용하였다. 가스는 Fig. 1 과 같이 직경 3mm 의 quartz tube 를 통해 흐른다. 튜브 안에는 pin electrode 가 위치해 있고 glass substrate 위에는 slide glass sample 이 놓이게 된다. Electrode 와 substrate 사이에 AC 전압을 가해주어 electric discharge 로 인해 전극(electrode)에서 기관(substrate)를 향해 내려오는 제트형태의 대기압 플라즈마를 생성시킨다.

2.2 전류-전압 곡선 측정 장치

정상 간세포와 간암세포의 전기적인 특성을 알아보기 위해 Fig. 2 와 같이 substrate 위에 ITO(Indium tin oxide) glass 를 올려놓고 그 위에 세포를 seeding 한 slide glass sample 를 놓은 다음 전극과 기관 사이에 AC 전압을 가해줌에 따라 그 사이에 흐르는 전류를 측정하여 전류-전압 곡선(I-V curve)을 구한다. 이것을 바탕으로 slide glass 위에 있는 세포들의 전기용량(capacitance)를 측정할 수 있다.

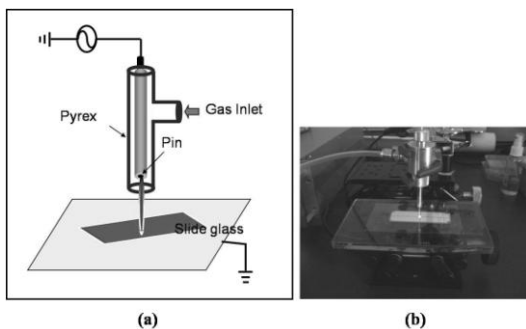


Fig. 1 (a) The schematic of experimental setup for the pin-type plasma jet device and (b) a snapshot of the generated Helium plasma jet

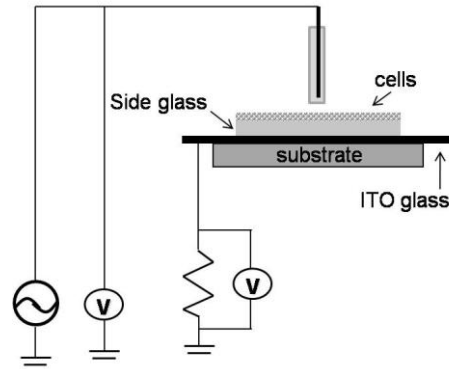


Fig. 2 A schematic of measuring the I-V curve

실제로 측정한 전기용량은 세포를 포함한 slide glass 와 세포를 덮고 있는 DPBS 용액에 해당하는 것이다. 세포를 제외한 다른 조건들은 동일하게 하였기 때문에 전체 전기용량을 측정하여 상대적인 비교를 할 수 있다. 또한, 세포의 coverage 에 따라 이 전기용량 값이 달라질 수 있는데, 실험에서는 70% 정도의 coverage 를 유지시켰다.

3. 실험방법

3.1 플라즈마를 처리할 세포 배양 및 준비

연구 대상세포는 사람의 정상 간세포 THLE-2 cell line(human liver normal cell)과 전이성 간암세포 SK-Hep1 cell line(metathetic cancer cell)을 사용하였다. 모든 세포들은 각 세포에 맞는 media(THLE-2: BEGM + antibiotics(1%) + Fetal Bovine Serum(FBS 10%), SK-Hep1: DMEM + antibiotics(1%) + FBS(10%)) 로 배양하였고(5% 이산화탄소 농도에서 배양) 실험의 편리를 위하여 실험하기 전 slide glass 위에 seeding 하여 배양한 다음 실험하였다. 이때 각 세포마다 동일한 조건을 유지하기 위해서 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(DPBS) 용액으로 2 번씩 rinse 하였다. 그리고 세포가 실험하는 동안 마르지 않도록 하기 위해 플라즈마를 처리하기 전 slide glass sample 표면에 DPBS 를 0.15mm 두께로 덮는다.

3.2 플라즈마 처리 과정

생성되는 플라즈마의 세기는 전극과 sample 사이의 거리, gas flow rate, 걸어준 전압의 크기 및 진동수에 비례하게 된다. 따라서 정상세포와 암세포의 플라즈마 특성을 비교분석하기 위해서는 이런 플라즈마 조건을 일정하게 해주어야 한다. THLE-2 와 SK-Hep1 cell 모두 다음과 같은 플라즈마 조건을 사용하였다. $f = 50 \text{ kHz}$, $r = 2 \text{ lpm}$, $d = 15 \text{ mm}$, $t = 30 \sim 120 \text{ sec}$, $V = 950 \sim 1000\text{V}$ 이 조건 하에서

sample 에 플라즈마를 처리하여 염색 후 live/dead assay 를 한다.

3.3 염색 및 이미징 과정

염색은 플라즈마 처리 후 slide glass 를 기울여서 DPBS 를 제거한 다음 live/dead assay dye 를 넣어 7 ~ 10 min. 동안 염색하였다. 염색이 끝나면 sample 을 형광 현미경에 올려놓고 형광 이미지를 관찰하여 live/dead assay(green: live cell, red: dead cell)를 한다.

4. 실험결과

4.1 플라즈마 처리에 따른 SK-Hep1 의 특성

플라즈마 전압과 노출시간(exposure time)을 바꿔가면서 SK-Hep1 세포의 플라즈마 특성을 알아보았다. 세포에 플라즈마를 처리할 때 낮은 전압이나 짧은 노출시간에서는 플라즈마를 처리하지 않은 샘플과 별다른 차이가 없이 대부분의 세포가 살아있다. 반면, 플라즈마에 의해 세포괴사(necrosis)가 일어나는 경우는 일반적으로 Fig. 3 와 같은 형상을 가지고 있다. 플라즈마를 처리한 영역은 두 동심원으로 나눌 수 있는데, 안쪽의 작은 원은 dead zone(죽은 세포 영역)이고 안쪽 원과 바깥쪽 원사이의 도넛 모양의 영역은 void zone(세포가 떨어져나간 곳)이다. 입력전압이 증가할수록 플라즈마에 의해 영향을 받는 세포 영역이 넓어지는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 입력전압이 클수록 플라즈마의 세기가 크고 이로 인해 세포에 더 큰 영향을 미친다는 것을 말해주는 결과이다.

4.2 SK-Hep1 과 THLE-2 의 플라즈마 특성비교

SK-Hep1 과 THLE-2 세포의 플라즈마 특성을 비교, 분석하기 위하여 모든 플라즈마 생성 조건과 처리 조건을 동일하게 하여 세포괴사가 일어나는지 여부를 실험하였다. 하나의 실험조건에서도 sample 에 따라 세포괴사가 일어나는 것과 그렇지 않은 경우가 발생하여서 통계적으로 sample viability(전체 sample 수에 대한 세포괴사가 일어난 sample 수의 비율)를 알아볼 필요성이 있었다. 동일한 실험 조건들에 대하여 SK-Hep1 세포의 sample viability 가 THLE-2 세포보다 전반적으로 높다는 것을 확인할 수 있었다. 또한, SK-Hep1 의 경우 가장 낮은 입력전압에서부터 세포괴사가 일어나는 반면, THLE-2 는 입력전압이 1200V 가 되어도 세포괴사가 일어나지 않는 것을 확인하였다.

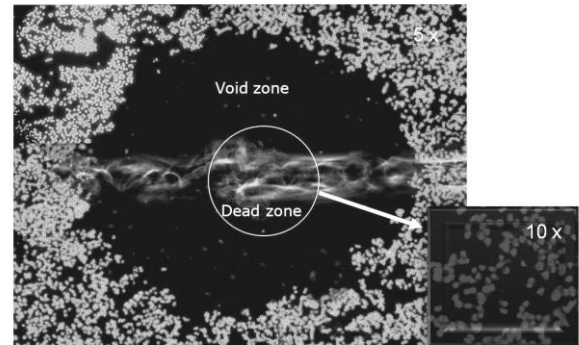


Fig. 3 A microscopic image of plasma-treated SK-Hep1 cells(bright dots-live cells, dark dots-dead cells): V= 950V, t= 120s

4.3 SK-Hep1 과 THLE-2 의 전기용량 비교

실험방법에서 기술한 과정을 거쳐서 두 세포의 전체 전기용량(capacitance)를 측정하고 비교, 분석해보았다. 세포에 의하여 주어지는 전기용량은 세포가 slide glass 표면을 덮고 있는 면적에 의존할 것으로 생각된다. 따라서 비교적 동일한 cell coverage(~70%)를 가지고 두 세포의 전체 전기용량을 측정하여 그 상대적인 비율을 구해보았다. THLE-2 세포가 SK-Hep1 세포보다 1.13 배 더 큰 전체 전기용량을 나타내었다. 전기용량과 유전상수(dielectric constant)는 비례하고 세포를 제외한 다른 실험 조건들은 동일하므로 전체 전기용량을 비교함으로써 정상세포가 암세포보다 유전율이 높다는 것을 알 수 있다. 즉, 반대로 암세포의 전도도가 더 좋다고 해석할 수 있다.

5. 토의

Necrosis 가 일어난 세포의 경우 Fig. 3 과 같이 dead zone 과 void zone 이 전형적으로 나타난다. 이렇게 phase separation 을 보이는 이유는 핀타입 플라즈마의 특성에서 찾아볼 수 있을 것이다. 핀타입 플라즈마의 profile 은 플라즈마 중심에서 밀도가 가장 높고 가장자리로 갈수록 Gaussian 분포를 갖는다.⁽⁸⁾ 따라서 플라즈마 밀도가 가장 높은 중심에서는 세포에 미치는 플라즈마의 세기가 커서 세포괴사를 유발할 것이다. 반면, 가장자리 근처에서는 낮은 플라즈마 밀도로 인해 세포에 미치는 플라즈마 세기가 작아서 주로 cell detachment 를 유발하여 diffused out 되었을 것으로 생각된다. 이를 증명하기 위해서는 플라즈마를 처리한 후에 sample 에 있는 DPBS 용액을 모아서 그 안에 떨

어저나간 세포들이 얼마나 있는지 알아보아야 할 것이다.

한편, 플라즈마로 처리된 영역의 가장 자리를 보면 살아있는 세포와 죽은 세포 또는 떨어져나간 세포의 경계가 확실하다는 것을 알 수 있다. 따라서 이런 플라즈마 장비를 암치료에 응용한다면 종양이 있는 부분의 암세포들을 큰 정확도를 가지고 국소적으로 제거할 수 있을 것이다.

SK-Hep1 과 THLE-2 의 비교실험에서는 동일한 조건에서도 세포괴사가 일어나는 경우와 그렇지 않는 경우가 동시에 발생할 때가 있었다. 따라서 sample 수가 많지 않을 경우 오차가 크게 발생할 수 있으므로 정확한 실험결과와 해석을 위해서는 앞으로 더 많은 sample 에 대하여 실험해야 할 것이다.

전기용량 비교실험을 통하여 우리는 앞에서 알아보았던 정상세포와 암세포의 플라즈마 특성의 차이를 설명할 수 있다. 한편, 세포의 정확한 전기용량을 측정하기 위해서는 세포를 제외한 DPBS 용액, Slide glass 만의 전기용량을 따로 측정해야 할 것이다. 하지만, 정상세포와 암세포의 전기용량의 상대적인 차이만 고려하는 경우 전체 전기용량을 비교하는 것으로 충분할 것이다. 그러나 세포의 coverage 를 정확히 제어하기 힘들 수 있다는 사실을 감안하면 많은 수의 sample 을 가지고 전기용량을 측정하여 오차를 줄여야 할 것이다. 플라즈마는 동일한 입력전압에서 전극과 기판사이의 전도도가 클수록 더 세게 발생된다. 따라서 전도도가 높은 암세포의 경우 정상세포보다 플라즈마가 더 세게 발생하여 세포괴사를 일으키기 시작하는 onset voltage 가 낮게 될 수 있다. 이를 좀더 명확히 입증하기 위해서는 두 세포의 경우 발생하는 플라즈마의 세기를 측정해보아야 할 것이다.

이 실험결과를 이용하여 일차적으로는 주위의 정상세포에는 피해를 주지 않고 간암세포를 선택적으로 죽일 수 있을 것이다. 더 나아가 다른 암에 대해서도 동일한 연구들을 통해 암치료 분야에 새로운 수술방법을 제시할 수 있을 것이다.

6. 결 론

저온 플라즈마를 이용하여 암치료가 가능한지를 알아보기 위하여 사람의 정상 간세포와 간암세포를 가지고 연구하였다. 세포에 플라즈마를 처리하면 국소적인 영향만 플라즈마에 의해 영향을 받아 세포괴사나 detachment 가 일어나게 된다. 또한, 두 세포의 플라즈마 특성을 비교, 분석해본 결과 정상 간세포는 높은 전압의 플라즈마 실험조건에서

간암세포보다 더 큰 생존율을 나타내었다. 반면, 간암세포는 낮은 전압에서부터 세포괴사가 일어나기 시작하였다. 이런 onset voltage 의 차이는 두 세포의 전기적인 특성차이, 즉 유전율 차이에서 기인한다고 할 수 있다. 이 실험결과 들을 바탕으로 우리는 암치료를 대상으로 하는 의공학 분야에 새로운 연구방법을 제시할 수 있을 뿐 아니라 새로운 암치료 기술을 제안할 수 있을 것이다.

참고문헌

- (1) Heimann, R. B. and Vu, T. A., 1997, "Low-pressure plasma-sprayed (LPPS) bioceramic coatings with improved adhesion strength and resorption resistance," *J. Thermal Spray Technol.*, Vol. 6, pp. 145~149.
- (2) Radetic, M., Jovic, D., Jovancic, P., Trajkovic, R. and Petrovic, Z. Lj., 2000, "The Effect of Low-Temperature Plasma Pretreatment on Wool Printing," *Textile Chem. Col.*, Vol. 32, No. 4, pp. 55-60.
- (3) Stoffels, E., Flikweert, A. J., Stoffels, W. W. and Koresen, G. M. W., 2002, "Plasma needle: A nondestructive atmospheric plasma source for fine surface treatment of (bio)materials," *Plasma Sources Sci. Technol.*, Vol. 11, No. 4, pp. 383~388.
- (4) Kieft, I. E., Laan, E. P. v. d. and Stoffels, E., 2004, "Electrical and optical characterization of the plasma needle," *New J. Phys.*, Vol. 6, No 1, pp. 149.
- (5) Moisan, M., Barbeau, J., Moreau, S., Pelletier, J., Tabrizian, M. and Yahia, LH., 2001, "Low-temperature sterilization using gas plasma: A review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms," *Int. J. Pharm.*, Vol. 226, pp. 1~21.
- (6) Kieft, I. E., Darios, D., Roks, A. J. M. and Stoffels, E., 2005, "Plasma treatment of mammalian vascular cells: A quantitative description," *IEEE Trans. Plasma Sci.*, Vol. 33, No 2, pp. 771~775.
- (7) Stoffels, E., Kieft, I. E. and Sladek, R. E. J., 2003, "Superficial treatment of mammalian cells using plasma needle," *J. Phys. D: Appl. Phys.*, Vol. 36, pp. 2098~2913.
- (8) Radu, I, Bartnikas, R. and Wertheimer, M. R., 2003, "Dielectric barrier discharges in helium at atmospheric pressure: experiments and model in the needle-plane geometry," *J. Phys. D: Appl. Phys.*, Vol. 36, pp. 1284~1291.