

전단응력에 의한 골육종 세포의 칼슘이온 시응답 특성 측정

박소희*, 신정욱*, 정옥찬**

인제대학교 BK21 사업단*, 인제대학교 의용공학과**

Measurement of Time response of Calcium Ion in MG-63 Cells Induced by Shear Stress

So Hee Park*, Jung Wook Shin*, Ok Chan Jeong**

Team of BK21*, Department of biomedical engineering**, INJE University

Abstract - This paper presents the time responses of calcium (Ca²⁺) ion concentration of MG-63 cells induced by a constant shear stress in micro channel were observed in the real time. Most of cells have similar rising time. There were some time delays because of the initial position of the cell in the micro channel along the pressure-driven fluid flow. The concentration of Ca²⁺ exponentially decreased while time constant of each profile did not have any relation to the peak value of concentration.

1. 서 론

가장 원초적이고 근본적인 세포 생물학의 목적들 중에 하나는 세포가 처한 환경으로부터 기인되어지는 다양한 종류의 자극으로 인하여 세포가 어떠한 거동을 하는지 또 그 환경적 자극 요인과 세포 거동 사이의 상관관계를 이해하는 것이다 [1]. 세포 외부 환경적 자극으로는 기계적, 전기적, 열적, 세포간의 상호작용, 세포와 기관사이의 작용, 수용성 혹은 화학적 인자 등이 있으며, 이러한 외부 자극들의 복합적인 작용으로 세포내 신호 체계를 통하여 확산, 이동, 유전자 발현 등이 일어나게 된다. 이러한 세포 환경적 자극의 중요성은 잘 알려져 있고 많은 연구들이 진행되어 왔으나, 기존 실험 방법 및 도구에 있어 고정밀도로 반복 재현 가능한 것인가에 대해서는 많은 의문점 및 불확정성을 내포한다.

본 연구에서는 micro fluidics 제어 기술을 바탕으로 미세 세포칩을 이용하여 골육종 세포의 외부 기계적 환경을 제어한다. 마이크로 채널 양단의 압력차에 의하여 발생된 유량으로부터 세포에 전단응력을 인가하고, 동시에 골세포의 mechano-transduction에 있어서 중요한 인자인 세포내 Ca²⁺의 신호를 공초점 현미경을 이용하여 실시간으로 관찰한다.

2. 본 론

그림 1은 실험 장치도이다. 간략한 세포칩 제작 및 세포 준비 그리고 실험 방법은 아래와 같다.

2.1 미세 세포칩 제작

세포 배양 및 기계적 자극 실험을 위한 마이크로 세포칩은 polymer MEMS 기술로 제작하였다. 미세 유체 채널이 형성된 PDMS (Polydimethylsiloxane) 구조와 cover glass를 plasma 처리하여 접합하였다. 세포칩에 내장된 세포 배양 및 자극 인가를 위한 미세 채널의 너비, 높이, 길이는 각각 1 mm, 0.5 mm, 10 mm 이다. 완성된 세포칩은 UV 소독 및 laminin 코팅으로 처리하였다.

2.2 세포 배양 및 칼슘 염색

MG-63 (human osteosarcoma cell line)은 DMEM-HG (Dulbecco's Modified Eagle Media-high glucose, Gibco, USA)에 10% FBS (Gibco), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (Gibco)을 기본 배지로 사용하였다. 한국세포주은행에서 분양 받은 세포를 마이크로 칩에 1×10⁵ cells/ml로 파종하고, 37 °C에서 5 % CO₂ incubator에서 배양하였다. 칼슘 염색은 세포 파종 24 시간 경과 후에 배양 배지에 10 µM fluo-4/AM (Molecular Probes, USA)과 0.05 % (w/v) Pluonic® F-127 (Molecular Probes, USA), 그리고 1% (w/v) HEPES (Gibco, USA)를 첨가한 후 30 분 동안 배양하였다.

2.3 전단응력 인가

컴퓨터로 제어 가능한 공압 시스템을 이용하여 세포칩 내에 유량을 조절하였다. 유량의 파형은 계단함수 형태로 이고, 크기는 7 ml/min이다. 이는 27 dyne/cm²의 전단응력을 미세채널 내에 위치한 세포에 인가한 효과와 등가이다.

2.4 관찰 결과

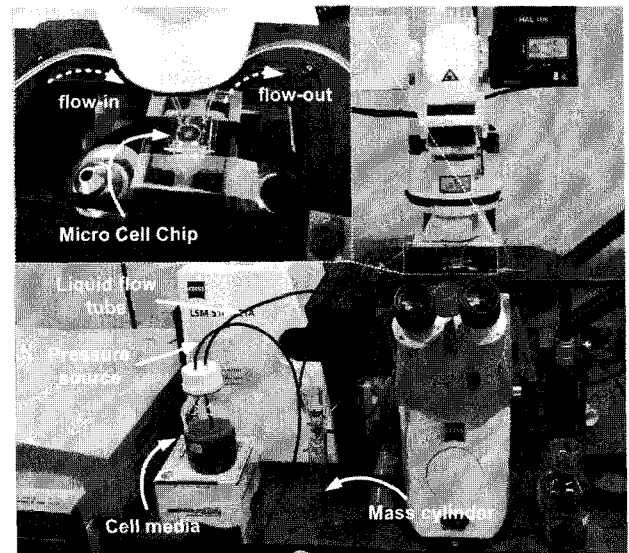
그림 2는 전단응력 인가에 따른 세포 내 칼슘농도의 시응답 특성 그래프의 예시이다. 자극 인가 후 대부분의 세포로부터 관찰된 칼슘 농도는 대략 30 여초 이내에 최고치에 이르고, 그 이후 농도가 낮아지는 경향을 보였다. 추후 시응답 특성을 바탕으로 단일 세포의 모델링이 진행할 예정이다.

3. 결 론

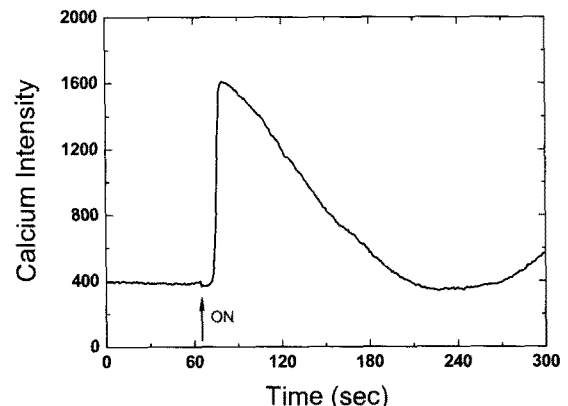
본 연구에서는 micro fluidics 기술을 사용하여 전단응력을 미세 세포 칩에 인가하였으며, 실시간으로 골육종 세포내 칼슘농도를 관찰하였다.

[참고 문헌]

[1] Dino Di Carlo and Luke P. Lee, "Dynamic Single-Cell Analysis for Quantitative Biology", Analytical Chemistry, pp. 7918-7926, 2006.



<그림 1> 실험 장치도



<그림 2> Ca²⁺의 실시간 응답 특성의 예시