

## 다공성 젤라틴 미립담체를 이용한 동물세포의 배양시 담체 내외부의 세포 분포 및 전단응력의 영향

임현수 · 김정희\*

한국과학기술원 생물공학과

## Cell Distribution and Shear Effect on Mammalian Cell Growth in Macroporous Gelatin Microcarriers

Hyun-Soo Lim and Jung-Hoe Kim\*

Department of Biotechnology, Korea Advanced Institute of Science and Technology,  
Taejeon 305-701, Korea

**Abstract** — Immobilization of anchorage-dependent animal cells was investigated using macroporous gelatin microcarriers developed in our laboratory. For the observation of the distribution of cells in macroporous beads, Vero-6 cells and CHO cells were cultured and their distribution in macroporous beads was observed using a confocal microscope. In results, the final concentration of Vero-6 cells and CHO cells on macroporous beads was 2~3 times higher than that on commercial solid microcarriers (Cytodex-3). Also, macroporous microcarriers could hold cells in their macropores. Consequently, the pores protected cells against hydrodynamic shear. Based on Kolmogorov eddy length scale, the smaller eddies (80  $\mu\text{m}$ ) showed the detrimental effect on cells in macroporous beads as compared with 160  $\mu\text{m}$  of eddies in conventional solid microcarriers.

1979년 van Wezel(1)이 Sephadex DEAE-50을 부착성 동물세포 배양에 이용한 이후로 고 부가가치의 단백질 생산에 미립담체를 사용한 동물세포의 배양 기술이 급격한 진보를 하고 있다. 그 후 MIT의 연구팀들은 세포의 접종농도와 담체의 직경 및 표면특성에 따른 세포의 성장과 계대 배양법을 연구하였으나(2-4), 세포가 담체의 표면에만 성장함으로써 배양시 발생하는 전단응력에 의한 성장저해와 단위 부피당 세포의 최종농도가 낮은 단점이 있었다(5). 이러한 단점을 극복하기 위하여 Verax에서 collagen을 원료로 스폰지와 유사한 구조의 다공성 담체의 개발에 성공하였고(6) 또한, Percell Biolytica에서도 다공성 담체의 개발에 성공하여 현재 상품화되고 있다. 본 실험실에서는 값이 저렴한 gelatin을 원료로 하여 새로운 형태의 담체(K-beads)를 개발하였고(5), 이를 토대로 하여 세포 성장기에 따른 담체 내외의 세포 분포와 세포 배양기의 교반시 발생하는 전단 응력에 대응한 세포의 보호 정도를 정량적으로 조사하였다.

**Key words:** Cell distribution, macroporous gelatin microcarriers, shear effect

\*Corresponding author

## 재료 및 방법

### 세포주와 사용배지

사용 세포주인 CHO는 미국 Minnesota 대학의 Hu 교수로부터 제공 받았고, Vero-6은 연세대 암센터의 이원영 교수로부터 분양 받았다. CHO는 10% FBS가 함유된 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM)을, Vero-6은 10% Horse Serum이 함유된 DMEM을 배지로 사용하였다.

### 미립담체 및 세포성장의 측정

실험결과를 비교를 위하여 일반 담체로서는 Pharmacia의 Cytodex-3을 사용하였고, 다공성 젤라틴 미립담체(K-beads)는 본 실험실에서 개발한 것을 사용하였다. K-beads의 제조방법은 발표된 바와 같이(5) 젤라틴 용액에 calcium carbonate를 일정량 섞어 미립담체로 만든 후, HCl 용액에서 calcium carbonate를 용해시킨 후 freeze-drying 하여 제조하였다.

세포의 성장속도와 교반시 발생하는 전단응력에 대한 영향을 조사하기 위하여 250 ml spinner vessel (Wilbur Scientific, Inc., Boston, MA)을 사용하였으며

배양액은 100 ml이고 담체 농도는 3 g/l로 하였다. 생존세포 수의 측정을 위하여 담체 부유액 1 ml을 취하여 상등액을 제거하였다. 이후, PBS 용액으로 담체를 2회 세척한 다음 collagenase(2 mg/ml-PBS)와 0.1% trypsin(0.02% EDTA를 함유한 PBS 용액에 녹임)을 3:1로 섞은 용액 1 ml을 첨가하여 30분간 방치하였다. 반응이 완료된 후 일반적으로 알려진 dye exclusion 방법인 0.1% trypan blue 용액을 첨가하여 세포수를 측정하였다(7). 또한, 세포의 부착성을 알기 위하여 spinner의 교반을 멈춘 후 상등액을 취한 다음 0.1M citric acid에 녹여진 0.1%(w/w) crystal violet을 1 ml 첨가하여 세포수를 hemacytometer로 측정하였다.

### 세포의 치사정도 및 치사율의 측정

배양도중 교반에 의한 세포의 손상정도를 정량화하기 위하여 Sigma Diagnostics Kit(No. 228-UV)를 사용하여 배양액 내에 세포가 파괴될 때 방출된 Lactate dehydrogenase(LDH) 활성을 측정하였다. 이 방법의 원리는 LDH에 의하여 lactic acid가 pyruvic acid로의 산화반응시 발생하는 NADH의 생성속도를 측정하는 것이며, 구체적인 실험조건은 50  $\mu$ l의 상등액을 30°C 반응액과 혼합한 후 spectrophotometer(분광광도계)의 cuvette에 옮겨 340 nm에서 1분간 흡광도를 측정하였다. LDH 1 unit는 30°C에서 분당 NADH 1  $\mu$ mole을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

일반적으로 세포의 lysis시 배지로 배출되는 LDH가 세포의 damage와 death의 지표가 될 수 있으므로(7), LDH의 배지내 활성도를 측정하여 전단응력으로 인한 세포의 치사 정도 및 치사율을 결정하였다. 그 관계식은 다음과 같이 나타낼 수 있다(7). 즉 생존세포의 성장 속도는 세포의 고유한 성장속도와 치사율과의 차이로 표시할 수 있다.

$$dx/dt = (\mu_i - \mu_d) x = \mu_{app} x \quad (1)$$

그리고 세포가 파괴되었을 때 방출되는 LDH의 양은 죽은 세포에 비례하는 것이다.

$$dE/dt = \alpha \mu_d x - K_d E \quad (2)$$

식 (1)과 식 (2)로부터  $\mu_d$ 에 대한 다음 식을 얻을 수 있다.

$$\mu_d = \frac{[E - E_0 \exp(-K_d t)] (\mu_{app} + K_d)}{[\exp(\mu_{app} t) - \exp(-K_d t)] \alpha x_0} \quad (3)$$

$\alpha$ 는 상수로서 세포 수를 알고 있는 Vero-6를 soni-

cation 하여 세포외부로 유출된 LDH의 활성을 측정한 결과 0.036 U/10<sup>5</sup> cells이었고,  $K_d$ 는 LDH의 활성을 알고 있는 배양액을 37°C, CO<sub>2</sub> Incubator에 두어 시간별 LDH의 활성 감소를 측정한 결과 0.002 hr<sup>-1</sup>이었다. 위의 식 (3)으로부터  $\mu_d$ 를 결정하게 되면 세포의 고유한 성장속도  $\mu_i$  값을 세포의 성장곡선으로부터 구한 겉보기 성장속도  $\mu_{app}$ 와  $\mu_d$ 의 합으로부터 구할 수 있다.

### Kolmogorov Eddy Length Scale의 결정

전단 응력에 의한 세포의 손상을 정량적으로 나타내기 위하여 일반적으로 Kolmogorov eddy length scale를 사용한다(8-10). 이는 turbulent flow에서 eddy의 크기에 따른 세포의 성장성을 판별하는 것으로 그 크기( $\eta$ )는 다음의 식으로 나타낼 수 있다.

$$\eta = (v^3 / \epsilon)^{1/4} \quad (4)$$

여기서  $v$ 는 kinematic viscosity(cm<sup>2</sup>/s)이며 다음과 같다(8).

$$v = \eta_f (1 + 2.5 \psi + 10 \psi^2) / (\rho_f (1 - \psi) + \rho_s (\psi)) \quad (5)$$

그리고 교반시 반응기의 local energy dissipation rate per unit mass( $\epsilon$ )는 다음과 같이 계산된다.

$$\epsilon = N_p n^3 d_i^5 / V \quad (6)$$

여기에서  $N_p$ 는 Reynolds 수가 1000 이상이면 impeller의 형태에 거의 의존하지 않고 약 0.5의 값을 가진다.

### 담체 내외부의 세포분포 관찰

다공성 담체에서의 세포 성장과 세포의 분포를 가시적으로 관찰하기 위하여 최종농도가 0.03% ethidium bromide와 40% methanol인 용액을 취하여 배양액 시료와 1대 1의 부피로 섞은 후 5분간 고정 염색한 후 Phosphate buffered saline(PBS) 용액으로 2번 씻어 내었다. 이후 담체를 confocal microscope로 관찰하여 담체 내·외부에서의 세포의 분포를 조사하였다. 사용한 confocal microscope는 MRC-500 confocal system(Bio-Rad, Boston, MA, USA)으로 시료를 물리적인 절단없이 단층촬영할 수 있는 장치이다. 이 장치를 이용하여 다공성 담체에서의 세포성장 및 담체내외 세포의 분포를 성장초기, 중기 말기로 나누어 관찰하였다. 담체내부의 세포분포를 100.8  $\mu$ m 깊이에 단층촬영하였다.

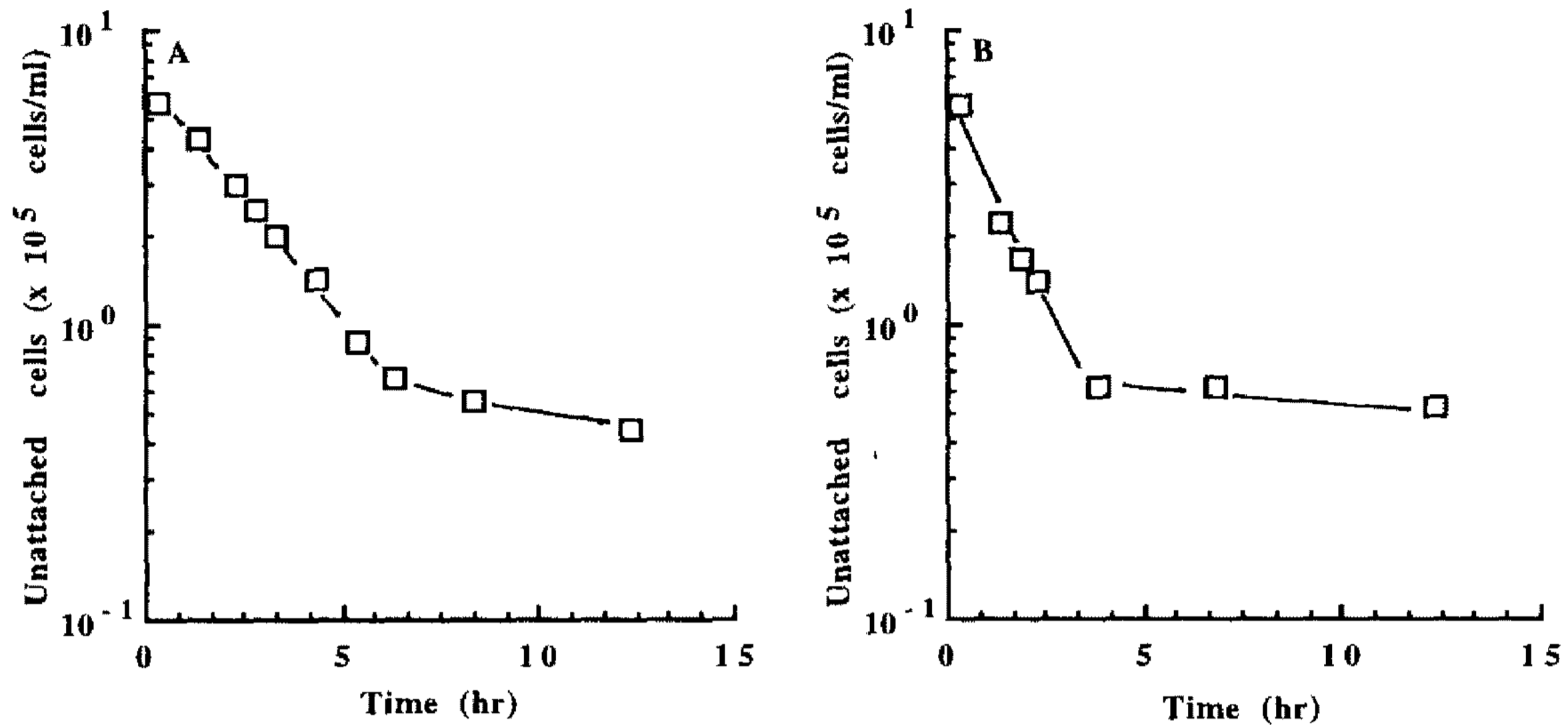


Fig. 1. Attachment kinetics of CHO (A) and Vero-6 (B) cells to macroporous beads. The cultures were agitated continuously at 60 rpm.

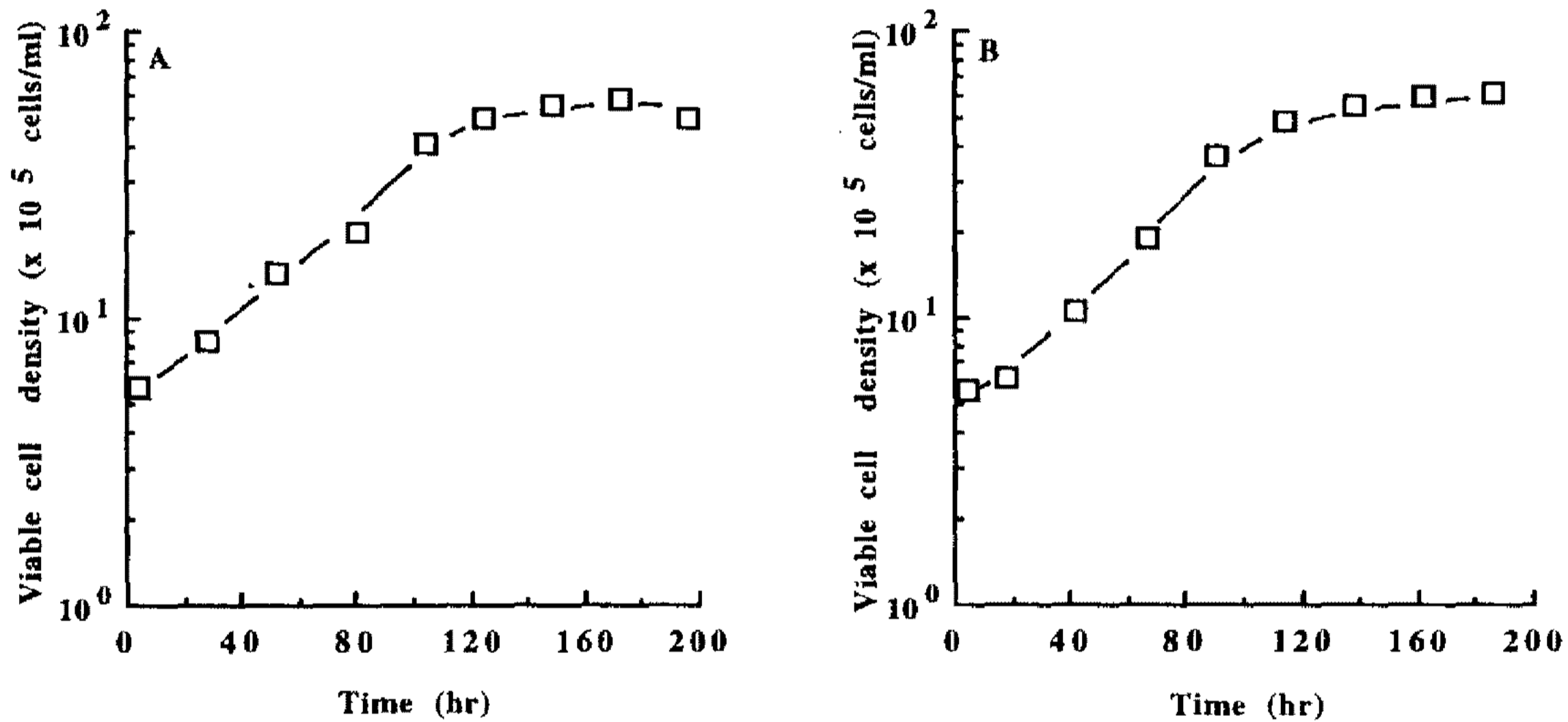


Fig. 2. Growth kinetics of CHO (A) and Vero-6 (B) cells to macroporous beads.

결과 및 고찰

다공성 담체에서의 세포부착성과 성장 및 세포분포

Fig. 1A와 Fig. 1B는 부착성과 부유성을 함께 갖는 CHO와 부착성만 갖는 Vero의 다공성 담체에 대한 부착성을 나타내었다. Fig. 1A에서 CHO 세포의 접종 농도는  $5.2 \times 10^5$  cells/ml, 교반속도는 60 rpm이었으며, 5시간까지 일차 함수로 감소하여 약 80%의 부착성을 보여주었으나, Vero-6(Fig. 1B)는 3시간내에 약 90%의 부착성을 보여 CHO 세포보다 약간 빠른 부착특성을 보였다. 한편 Vero-6 세포의 경우 결과는 나타내진 않았으나 Cytodex-3에 대한 세포의 부착성은 앞의 결과와 유사하였다. CHO와 Vero-6의 최종

세포 농도는  $5.0 \sim 5.5 \times 10^6$  cells/ml로서 기존의 담체인 Cytodex-3보다 2~3배의 농도 증가를 보여 주었다 (Fig. 2A와 Fig. 2B). 세포의 분포에 영향을 주는 다공성 담체의 주 특성은 pores의 직경으로 K-beads는 약  $25 \sim 50 \mu\text{m}$ 이고, 담체를 구성하는 matrix가 벌집 형태로 되어 있다.

세포 담체 내외에서의 분포를 관찰하기 위해 Vero 세포 배양 초기, 중기, 말기에 따른 담체 내외에서의 세포분포도를 confocal 현미경으로 관찰하였다(Fig. 3). 1-a,b,c는 K-beads에서 Vero cells의 담체 외부에서의 분포를 그리고 2-a,b,c는 담체 내부에서의 세포 분포를 각각 초기, 중기, 말기로 나누어 사진화 한 것으로 담체 외부와 내부에 세포가 일정 비율로 배양전단계에 걸쳐 고르게 분포되어 있음을 알 수 있었다. 이로써

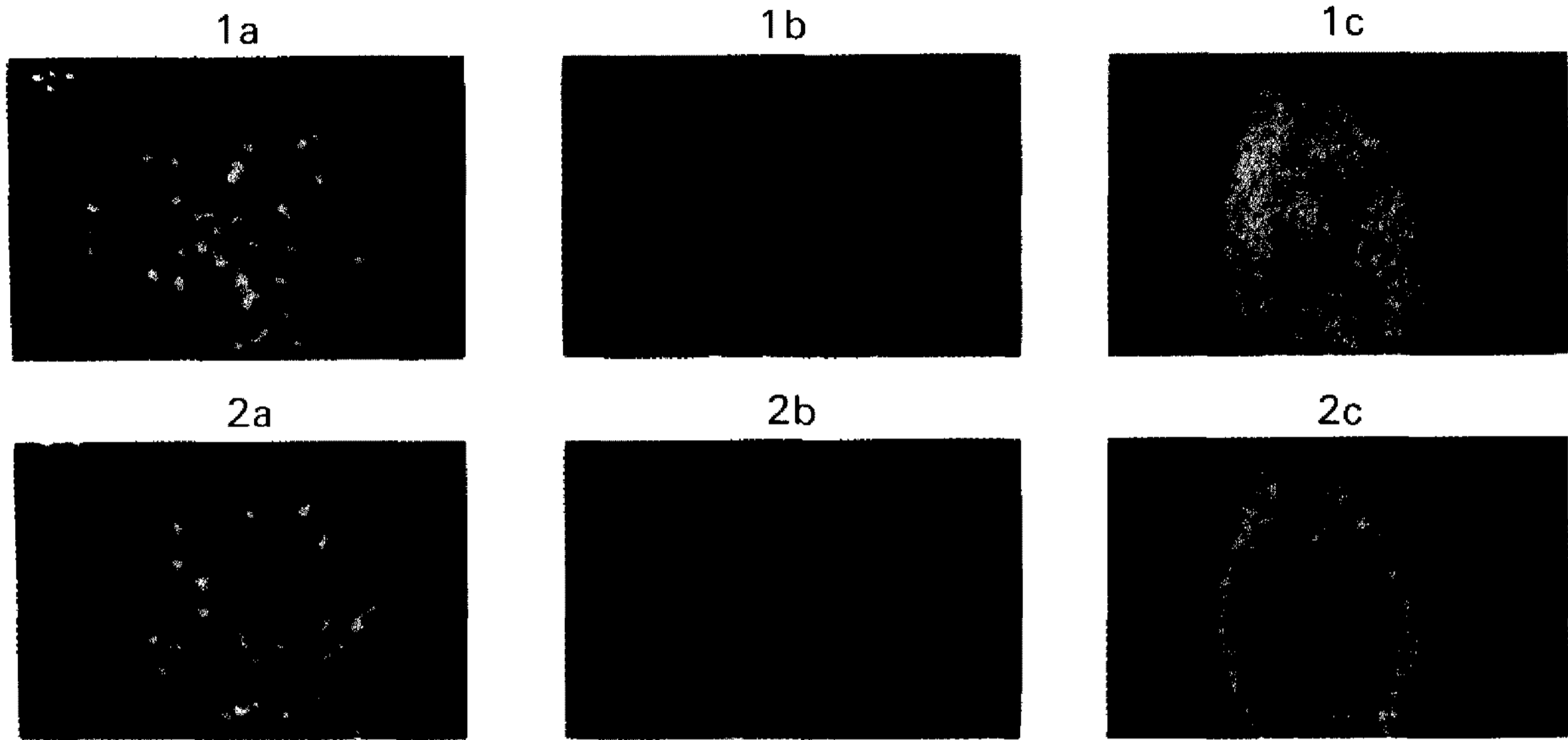


Fig. 3. Distributions of Vero-6 cells inner and outer part of macroporous beads. 1-a,b,c: outside cells of macroporous beads, 2-a,b,c: inside cells of macroporous beads (a: at 24 hrs culture, b: at 72 hrs culture, c: at 144 hrs culture)

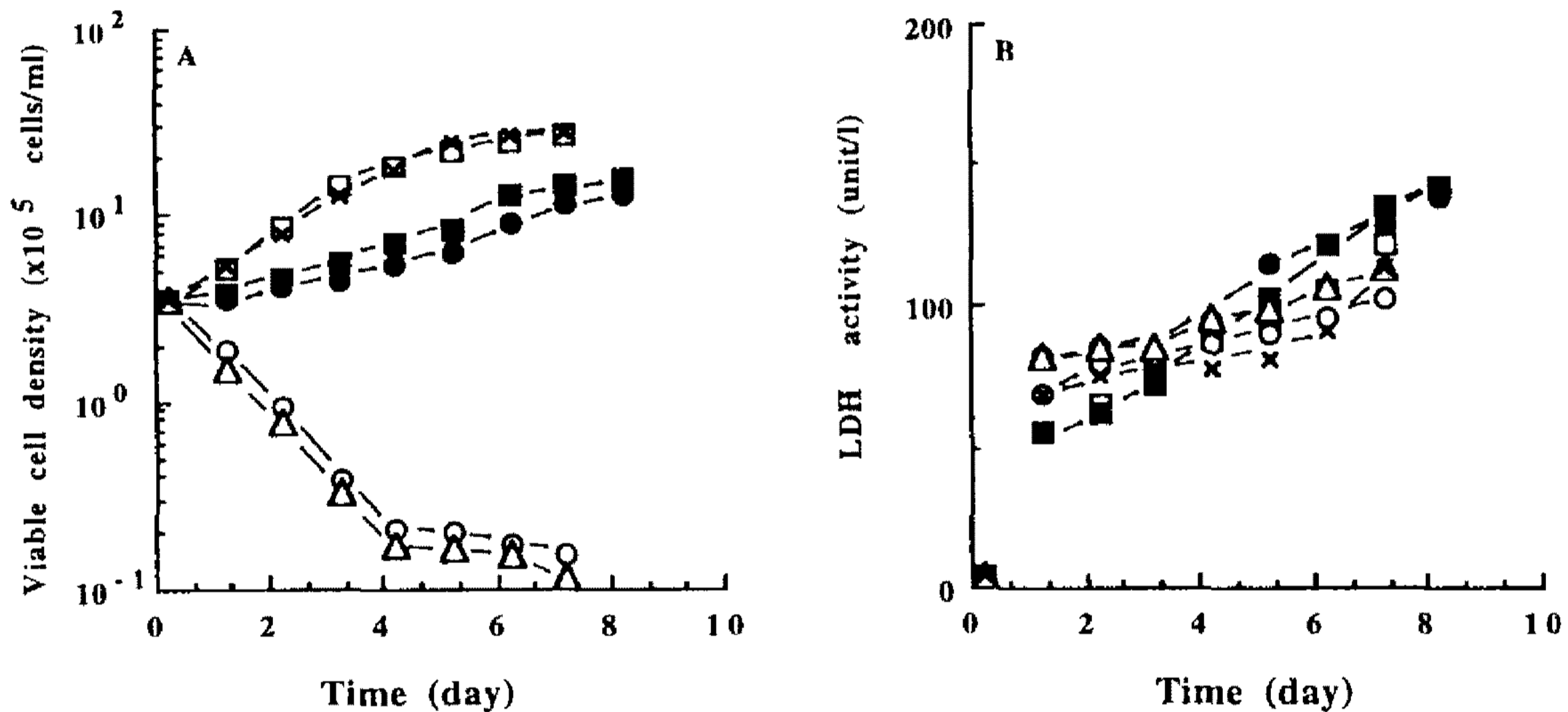


Fig. 4. Effect of agitation speeds on growth (A) and lysis (B) of Vero-6 cells in spinner culture with Cytodex-3.

□: 60 rpm, ×: 100 rpm, ■: 100 rpm, ●: 120 rpm, ○: 150 rpm, △: 200 rpm

K-beads의 경우 배양 과정을 통하여 Vero 세포가 담체의 표면 뿐만이 아니라 내부에서도 안정하게 잘 성장하고 있음을 알 수 있었다.

다공성 젤라틴 미립담체의 Shear-Protection 효과 앞의 결과로부터 세포가 담체의 내부에서도 성장함으로 같은 부피의 생물반응기에서 담체의 표면적을 증가시켜 세포의 최종농도가 높아지는 것을 알 수 있었다. 또 다른 관점에서 세포의 담체내부 이용은 교반식 세포반응기를 사용할 때 발생하는 전단응력에

대한 보호 효과가 클 것으로 기대되어 다음의 실험을 하였다.

Fig. 4, 5는 Cytodex-3와 K-beads에서 Vero-6 세포를 배양할 때 교반속도에 따른 세포의 성장과 세포가 손상을 받아 파괴되었을 때 방출되는 LDH의 변화를 나타낸 것이다. 여기서 LDH는 세포의 치사를 나타내는 하나의 지표이다. 세포를 접종 후 5시간 동안은 60 rpm에서 교반하여 세포가 완전히 담체에 부착되도록 한 후 교반속도를 60~300 rpm까지 변화시켰다. Table 1은 Fig. 4, 5의 실험 결과로부터 성장에 관한

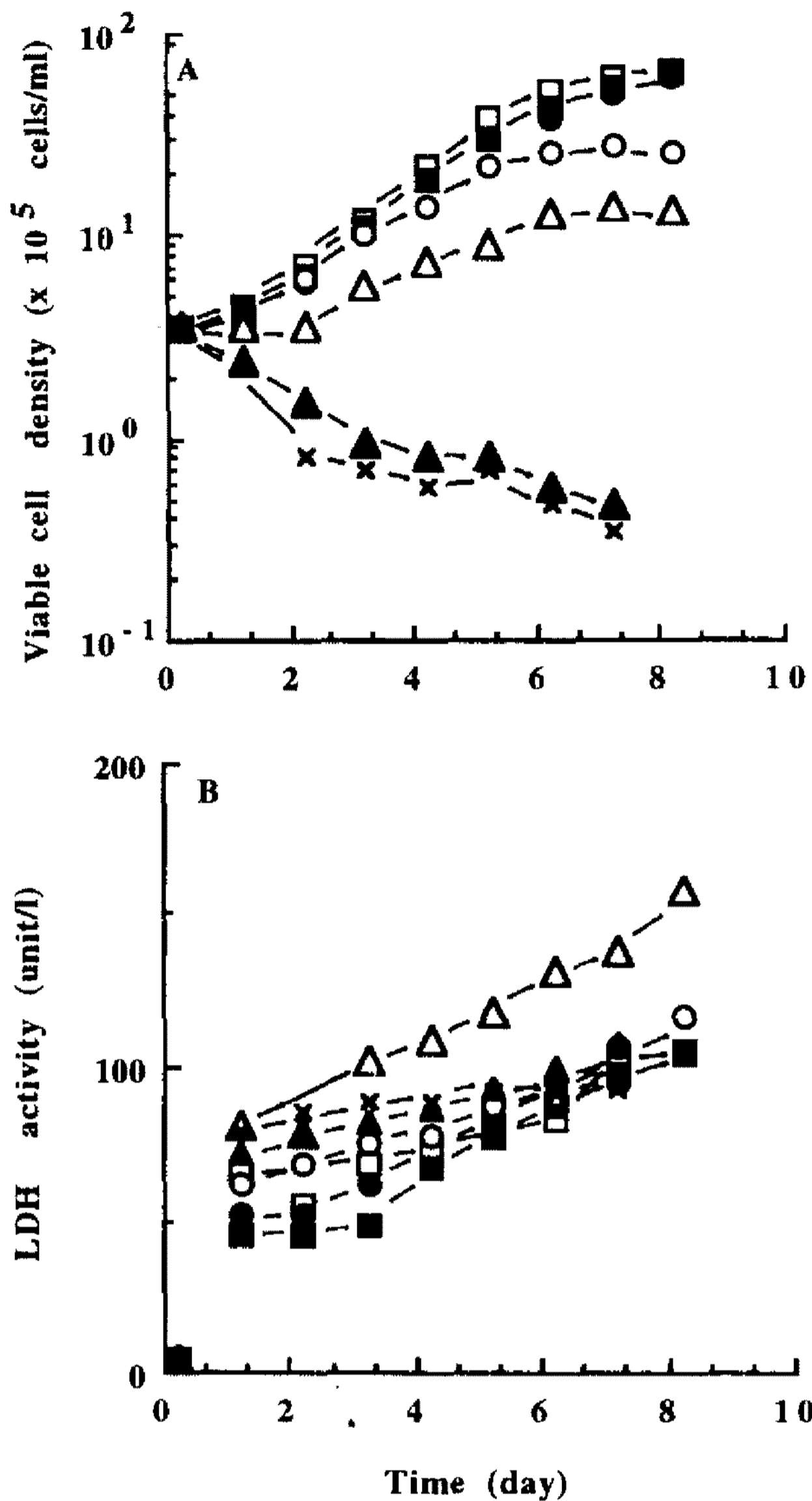


Fig. 5. Effect of agitation speeds on growth (A) and lysis (B) of Vero-6 cells in spinner culture with macro-porous beads.

□: 60 rpm, ■: 100 rpm, ●: 120 rpm, ○: 150 rpm, △: 200 rpm, ▲: 250 rpm, ×: 300 rpm

속도정수들을 정리한 표이다. Cytodex-3의 경우 100 rpm 이상에서 실험적으로 측정되는 세포의 겉보기 성장 속도( $\mu_{app}$ )( $0.0105 \text{ hr}^{-1}$ )가 60 rpm일 때에 비하여 ( $0.0209 \text{ hr}^{-1}$ ) 크게 감소하였고 상대적으로 치사율( $\mu_d$ )은 80 rpm까지 증가한 후 감소하였다. 이 이유로는 100 rpm 이상에서 세포의 성장초기 치사율이 높아 생존세포의 농도 감소로 인하여 세포의 고유한 성장 속도  $\mu_i$  값의 감소와 치사율 평가 기간(2일에서 5일 까지) 동안의 치사율도 낮게 평가되었다. 세포의 고유한 성장속도  $\mu_i$  값은 60과 80 rpm에서는 약  $0.023 \text{ hr}^{-1}$ 로 유사한 값을 보였으나, 100 rpm 이상에서는 이 값이 1/2로 감소하였다(Table 1). 이는 전단응력이

Table 1. Summary of growth and death rates of Vero-6 cells cultured on Cytodex-3 and macroporous beads (Data from Fig. 4 and 5)

Carriers	RPM	$\mu_{app}$ ( $\times 10^{-1}/\text{hr}$ )	$\mu_d$ ( $\times 10^{-1}/\text{hr}$ )	$\mu_i$ ( $\times 10^{-1}/\text{hr}$ )
Cytodex-3	60	0.209	0.019	0.228
	80	0.180	0.050	0.230
	100	0.105	0.031	0.136
	120	0.081	0.029	0.110
	150	-0.307	-	-
	200	-0.329	-	-
Macro-porous	60	0.229	0.006	0.235
	100	0.217	0.012	0.229
	120	0.226	0.013	0.239
Micro-carrier	150	0.189	0.015	0.204
	200	0.130	0.034	0.164
	250	-0.180	-	-
	300	-0.220	-	-

일정값을 초과하면 세포고유의 성장속도까지 감소함을 의미한다. 반면에 K-beads의 경우는 세포의 겉보기 성장 속도( $\mu_{app}$ )가 120 rpm까지는 전혀 차이가 없이  $0.022 \sim 0.023 \text{ hr}^{-1}$ 를 보였으며, 150 rpm에서는 약간 감소되어  $0.019 \text{ hr}^{-1}$ 로 나타났다. 그리고 세포의 고유한 성장속도인  $\mu_i$  값은 이 구간에서 거의 변화가 없었다. 세포의 겉보기 성장속도( $\mu_{app}$ )는 200 rpm( $0.013 \text{ hr}^{-1}$ ) 이상에서 60 rpm( $0.0229 \text{ hr}^{-1}$ )보다 약 1/2로 감소되었으며,  $\mu_i$  값도 약  $0.024 \text{ hr}^{-1}$ 에서  $0.016 \text{ hr}^{-1}$ 으로 크게 감소되었다(Table 1). 그리고 60 rpm에서 세포의 최종농도는 K-beads가 cytodex-3보다 2배 이상 높았다. 결과적으로 K-beads의 경우 단위 부피당 높은 표면적을 제공할 뿐 아니라 전단응력에 의한 세포의 치사를 크게 감소시켜 주었다.

이상의 결과를 정량적으로 분석하기 위하여 Kolmogorov eddy length scale(8-10)로 나타내었다. 일반적으로 eddy는 turbulent flow에서 다양한 크기로 분포되어 있으며 그 크기가 적을수록 담체 표면의 세포에 더 큰 에너지를 전이하여 담체로부터 세포의 탈착과 성장 저해를 일으킨다. Fig. 6에서 처럼 K-beads의 경우는 80~90  $\mu\text{m}$ 에서, Cytodex-3의 경우에는 이미 보고된 바(10)와 같이 140~150  $\mu\text{m}$  이하에서 현저히 세포의 성장을 저해시킴을 확인하였다. 즉 다공성 담체인 K-beads의 경우 기계적인 힘에 대한 저항력이 표면에만 세포가 성장하는 Cytodex-3에 비하여 약 1.5~2배 정도 증가됨을 알 수 있었다.

이상과 같은 결과에서 담체의 표면을 기존의 것과는

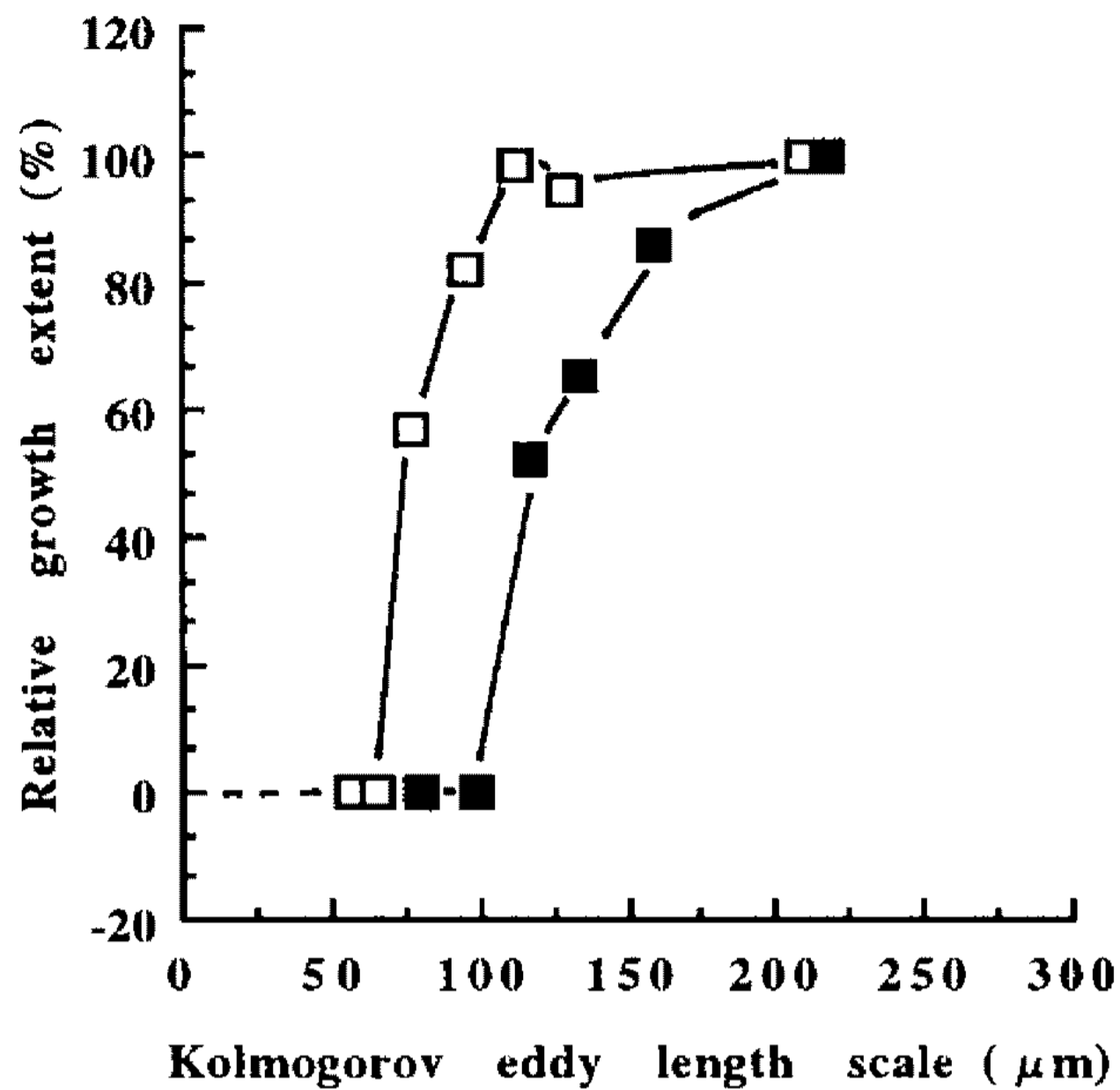


Fig. 6. Relative growth of Vero-6 cells on beads as a function of Kolmogorov eddy length scale.

□: cells on macroporous beads, ■: cells on Cytodex-3

달리 세포가 쉽게 침투하여 자랄 수 있도록 다공의 형태로 제조함으로써 세포를 3차원적으로 성장하게 하여 최종세포농도를 현저히 증가시킬 수 있었고, 또한 담체 외부에 작용하는 물리적 전단 응력을 효율적으로 차단하여 세포의 성장저해를 최소화 할 수 있었다.

## 요 약

본 실험실에서 개발된 다공성 젤라틴 미립담체를 동물세포 배양에 이용한 결과, Vero와 CHO 세포가 모두 담체의 내외부에서 잘 성장함을 알 수 있었다. 또한 세포가 담체 내부의 공극에서도 자람으로써 넓은 표면적을 제공 받아 세포농도가 2~3배 정도 증가되었다. 전단 응력에 의한 세포의 손상도 현저히 감소시킬 수 있었으며 이것을 Kolmogorov eddy length scale로 정량적으로 나타냈을 때 그 값은 80~90 μm로서 전단응력에 대한 저항력이 일반 담체보다 약 1.5~2배 정도 증가되었다.

## 감사의 말

본 연구는 한국과학재단의 국제공동연구비와 생물공정연구센터의 지원하에 수행된 연구의 일부로서 이에 대하여 감사드립니다.

## Nomenclature

- $\alpha$  : conversion factor (units/ $10^5$  cells)
- $d_i$  : impeller diameter (cm)
- $E$  : LDH activity (units/l)
- $E_o$  : initial LDH activity (units/l)
- $K_d$  : decay rate constant of LDH (1/hr)
- $\mu_{app}$  : apparent specific growth rate (1/hr)
- $\mu_d$  : specific death rate (1/hr)
- $\mu_i$  : intrinsic specific growth rate (1/hr)
- $n$  : impeller speed (revolution/s)
- $N_p$  : dimensionless power number
- $\eta_f$  : fluid viscosity (g/cm s)
- $\rho_f$  : fluid density (g/cm<sup>3</sup>)
- $\rho_s$  : microcarrier density (g/cm<sup>3</sup>)
- $\psi$  : volume fraction of solids
- $t$  : culture time (from 24 hrs to 120 hrs)
- $V$  : reactor volume (cm<sup>3</sup>)
- $\nu$  : kinematic viscosity (cm<sup>2</sup>/s)
- $x$  : cell density (cells/ml)
- $x_o$  : initial cell density (cells/ml)

## 참고문헌

1. Van Wezel, A.L. 1979. Microcarrier culture of animal cells, Pp. 372-377. In A.L. van Wezel (ed.) Tissue culture: Methods and application, Academic press, New York.
2. Hu, W.S., J. Meier, and D.I.C. Wang. 1985. A mechanistic analysis of the inoculum requirement for the cultivation of mammalian cells on microcarriers. *Biotech. Bioeng.* **27**: 585-595.
3. Hu, W.S., D.J. Giard, and D.I.C. Wang. 1985. Serial propagation of mammalian cells on microcarriers. *Biotech. Bioeng.* **27**: 1466-1476.
4. Hu, W.S. and D.I.C. Wang. 1987. Selection of microcarrier diameter for the cultivation of mammalian cells on microcarriers. *Biotech. Bioeng.* **30**: 548-557.
5. Lim, H.S., J.H. Choi, and J.H. Kim. 1990. Development of macroporous gelatin microcarrier and its characterization for anchorage-dependent animal cell culture, Pp. 161-164. *Proc. APBioChEC'90*. Kyungju, Korea.
6. Dean, R.C., S.B. Karkare, P.G. Phillips, N.G. Ray, and P.W. Runstadler. 1987. Continuous cell culture with fluidized sponge beads, Pp. 145-167. In B.K. Lydersen (ed.), *Large scale cell culture technology*, Hanser publisher, New York.
7. Kim, J.H. and W.S. Hu. 1989. Initial culture conditions affect the sensitivity of HepG2 cells to

- excessive mechanical agitation. *Cytotechnology* **2**: 135-140.
8. Cherry, R.S. and E.T. Papoutsakis. 1988. Physical mechanisms of cell damage in microcarrier cell culture bioreactors. *Biotech. Bioeng.* **32**: 1001-1014.
9. Kunas, K.T. and E.T. Papoutsakis. 1990. Damage mechanisms of suspended animal cells in agitated bioreactors with and without bubble entrainment. *Biotech. Bioeng.* **36**: 476-483.
10. Croughan, M.S., E.S. Sayre, and D.I.C. Wang. 1989. Viscous reduction of turbulent damage in animal cell culture. *Biotech. Bioeng.* **33**: 862-872.

(Received 25 May 1994)