

연골세포 부착력 평가

이권용[†] · 박상국 · Deahwan Shin* · 박종철**

세종대 기계공학과 의공학연구소
*SWRI, San Antonio, TX, USA
**연세대 의공학학교실

Adhesion Strength Measurement of Rabbit Knee Chondrocyte

Kwon-Yong Lee[†], Sang-Guk Park, Daehwan Shin* and Jong-Chul Park**

Dept. of Mechanical Engineering, Sejong University
*SWRI, San Antonio, TX, USA

**Dept. of Medical Engineering, College of Medicine, Yonsei University

Abstract – In order to prepare for the suitable surfaces of implants or medical devices, quantitative evaluation of adhesion between cells and biomaterials is essential. To better understand adhesion formation between cells and biomaterials, we used the cytodetachment technique which measures the adhesive force of a single cell through changing the culture time and detachment speed. The results showed that the adhesive force could be affected by the culture time of cells on the surface of materials and the detachment speed. Moreover, there was a large discrepancy among the adhesion strength measured by similar techniques conducted on the different cells and substrates. It can be concluded that the variation of the force measurement technique can seriously alter the level of the force required to detach a cell on the surface of materials.

Key words – adhesion strength, quantitative evaluation, chondrocyte, culture time, detachment speed.

1. 서 론

물질과 대상 표면에 대한 세포의 부착현상은 세포의 이동, 성장과 분화 등과 같은 세포에서 일어나는 여러 현상을 조절하는 중요한 인자이다[1]. 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 부착력 측정은 정형외과 및 치과에서 광범위하게 시술되는 implant 재료와 골세포와의 초기 유착을 안정적으로 유도하는 여러 재료학적 및 생물학적 기술에 있어서 그 유착 정도를 평가하는 중요한 시험방법이 될 수 있다. 또한, medical device를 사용한 의료

행위 동안 세포나 조직이 의료기구에 부착함으로써 발생할 수 있는 인체의 상처나 의료기구의 마찰을 최소화하기 위한 적절한 표면처리 된 기구의 개발을 위한 중요한 시험방법으로 사용된다. 실제 implant나 medical device에 적용하기 위해서 우선 고려할 사항은 대상 재료와 세포간의 부착이 가능한지의 여부와 부착 정도를 판단하는 것이다.

그러므로 세포와 대상이 되는 생체재료 간의 상호작용을 이해하고 세포에 대해 적절한 친화성을 갖는 생체 재료들을 구성하기 위해서는 생체재료의 세포와의 친화성을 결정하는 세포 부착력의 정량적 평가(quantitative evaluation)가 절실히 요구된다.

지금까지 생체재료의 세포와의 친화성을 측정하기 위한 여러 방법들이 시도되었다. 이런 방법들 중에서 재료의 표면에 부착된 세포의 수를 세어 생체 친화성을 평가하는 실험방법이 많이 사용되었으나, 이 방법은 세포와 재료 표면 사이의 실제 부착력을 정량적으로 나

[†]주저자 · 책임저자 : kwonlee@sejong.ac.kr

타내 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 대항하는 세포의 adhesive force를 측정하는 방법들이 사용되었다[2,3]. 이 방법들 또한 단일 세포가 아닌 세포군(population of cells)의 부착 정도를 측정하는 실험들로서 세포와 생체재료의 부착에 대한 정성적인(qualitatively) 평가를 제공하지만, 정량적인(quantitatively) 평가는 제공하지 못한다.

최근 단일세포(single cell)에 대한 세포 부착력 측정을 위한 일련의 연구가 있었는데[4-7], Yamamoto 등이 fibroblast cell을 steel cantilever system을 이용해서 부착력을 측정하였으며[5], 김영직 등이 돼지 무릎 연골세포를 사용하여 glass pipette을 이용한 adhesion force를 측정하였다[7]. 또한 Dr. Athanasio group이 bovine articular chondrocyte를 대상으로 glass rod와의 움직임을 photodiode를 통해 측정하여 부착된 세포를 분리시키는데 필요한 force를 측정하였다[4,6].

본 연구에서는 토끼 무릎 연골에서 분리된 연골세포(chondrocyte)를 유리 표면에 부착시키고, 부착된 하나의 연골세포와 유리표면과의 계면에서의 부착력을 Dr. Shin이 개발한 cyto-detachment system[6]을 이용하여 계면에 평행한 방향으로 shear force를 작용하여 연골세포가 표면으로부터 분리될 때의 detachment force를 직접 측정하는 시스템을 사용하였다. 본 연구는 이전 연구와는 달리 단일세포(single cell)를 대상으로 부착 시간과 detaching speed의 변화에 의한 부착력의 변화를 측정하고, 다른 연구 그룹의 실험 data와의 비교를 통해서 세포와 부착되는 material들과 incubation 시간, detaching speed에 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 transducer는 이 시스템에 사용될 수 없으며 다른 적용방법이 요구된다. 본 연구는 하나의 세포를 재료의 표면으로부터 떼

어 내는데 필요한 방법으로 미세한 force를 효율적으로 측정하기 위하여 cantilever beam theory를 이용하여 detachment force를 계산하였다.

이 장치에 사용되는 기본적인 hardware 장치는 (1) 1 axis piezoelectric translator와 이를 제어하는 controller, (2) 75 μm diameter detaching glass tip, (3) 7 μm carbon filament bundle, (4) dual photodiode와 전기 회로 system, (5) inverted microscope, (6) x-y-z axis linear positioner, 등으로 구성된다.

Forcedml 측정은 75 μm diameter detaching glass tip을 측정하고자 하는 대상 세포의 측면에 위치시키고, tip을 세포와 부착 material의 계면에 평행하게 움직인다. 이때 detaching glass tip에 평행하게 부착된 diameter 7 μm carbon filament의 그림자가 움직임에 따라서 dual photodiode 전류의 변화가 생기며 이를 전압의 변위로 바꾸어 준다. 이 전압은 미리 프로그램된 computer에 의해 displacement로 변환하였다.

결국 세포에 접촉 후 piezoelectric transducer에서 움직인 거리와 세포와 접촉한 부분의 움직임의 차에 의해 cantilever beam의 deflection을 계산할 수 있고, 이는 75 μm detaching glass tip의 Young's modulus, 길이, 면적 관성모멘트를 cantilever beam theory에 적용하여 detachment force를 계산하였다.

2-2. Substrate와 Chondrocyte 준비

유리 슬라이드를 폭, 길이, 두께가 각각 8.0 mm \times 15.0 mm \times 1.0 mm가 되도록 10개를 묶어서 같은 크기로 자른 후, 자른 슬라이드는 autoclave 후 건조시키고 four well chamber에서 chondrocyte를 seeding하려는 면이 위쪽에 있도록 포개어 놓는다. 여기에 토

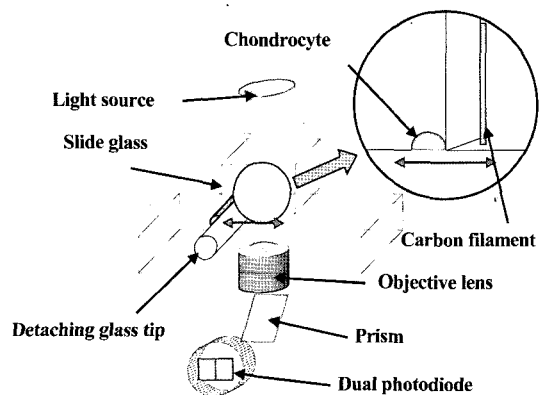


Fig. 1. Detachment force measurement system.

끼 뒷다리 무릎 연골에서 분리되어 primary culture 된 chondrocyte를 passage 5 이내의 것으로 하여, 3×10000 /ml로 세포의 개수를 조절하여 파이펫으로 슬라이드 윗면에 seeding한다. Seeding후 chondrocyte가 부착된 면이 잠길 정도로 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM-L-glutamin, 1 mM Sodium pyruvate, 1 v% penicillin-streptomycin을 포함하는 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM) 배지를 추가한다. Seeding된 chamber는 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하고 2시간 이후 하나의 슬라이드 글라스를 꺼내어 DMEM 배지가 채워진 1 well chamber에 넣어 inverted microscope 상에서 chondrocyte detachment 실험을 수행하였다.

2-3. Detachment Calibration and Experiment

연골세포가 four-well culture chamber에 여러 개로 포개어져 있는 slide glass 위에 seeding 되고, 2-6시간 배양 후 slide glass를 하나 씩 분리하여 one-well culture chamber의 안쪽 왼편 모서리 부위바닥에 위치시킨다. 지름이 75 μ m인 detaching glass tip을 측정하고자 하는 chondrocyte의 측면에 위치하게 하고 조도와 focus를 맞춘다. Micro-manipulator를 실험 전에 전 후진시키며 detaching glass tip의 이동에 따른 dual photo-diode 출력전압의 그래프가 선형인 지점을 선정하고, Target cell을 detaching glass tip으로 직접 누르지 않는 상태로 piezo-transducer를 구동시켜 calibration을 실시하여 detaching glass tip 이동거리와 dual photo-diode 출력전압 사이의 비례상수를 결정한다.

Calibration에서 사용한 inverted microscope의 조도와 focus를 변화시키지 않고 microscope stage knob을 조절하여 target이 되는 cell의 옆에 지름이 75 μ m인 detaching glass tip의 끝단을 위치시킨다. Calibration에서 결정된 비례상수를 지정하고 piezo-transducer 이동거리를 예상해 지정한다. 이 실험에서 사용된 detaching glass tip 이동거리는 24 μ m로 설정하였으며, detaching speed를 0.75-1.0 μ m로 설정하여 piezo-transducer를 작동시킨 후 원위치 시켜서 detachment force와 displacement를 측정하였다.

3. 결 과

토끼 무릎 연골세포를 slide glass 위에서 2-6시간

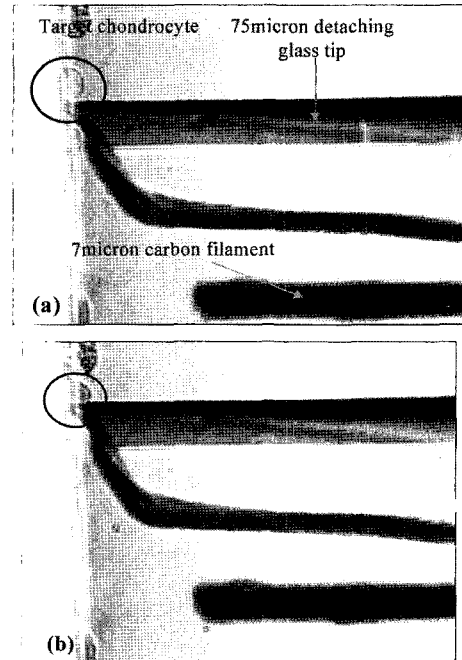


Fig. 2. Photographs showing detaching procedure viewed on an inverted microscope (a) before detachment and (b) after detachment.

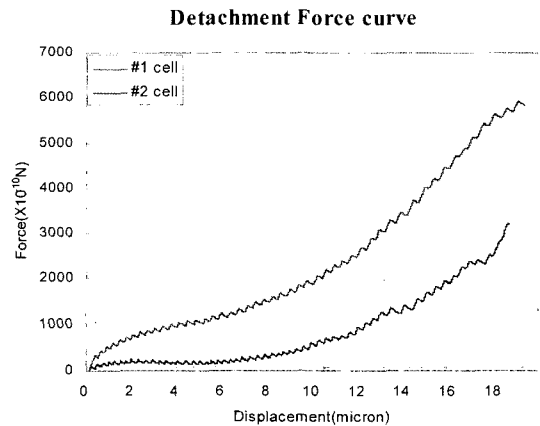


Fig. 3. Detachment force vs. displacement curve for the #1 cell tested with 0.75 μ m/s detaching speed, and for the #2 cell tested with 1 μ m/s detaching speed against chondrocyte cultured for 2 hours.

동안 incubation 시킨 후 앞 절에 언급한 detachment technique을 이용하여 nano-Newton level의 cell adhesive force를 성공적으로 측정하였다. 실험 결과로 다음과 같은 detachment force vs. displacement 그래프를 얻었다(Fig. 3 and Fig. 4). 모든 경우에 detaching

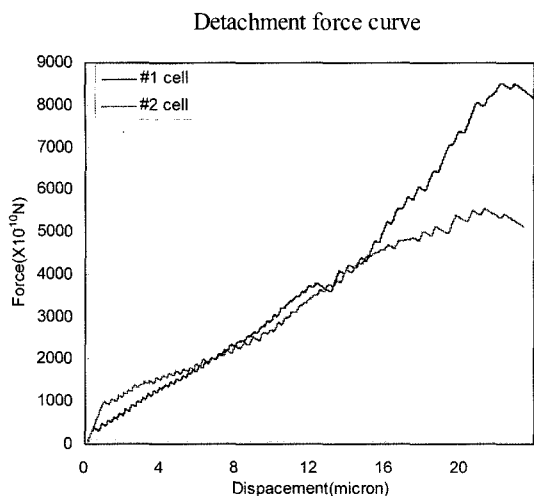


Fig. 4. Detachment force vs. displacement curve for the #1 cell tested with 0.75 $\mu\text{m/s}$ detaching speed, and for the #2 cell tested with 1 $\mu\text{m/s}$ detaching speed against chondrocyte cultured for 6 hours.

speed가 적을 때(0.75 $\mu\text{m/s}$) detaching speed가 큰 경우(1.0 $\mu\text{m/s}$) 보다 detachment force가 큰 것으로 관찰되었고, culture incubation time이 길수록 detachment force가 크게 관찰되었다.

4. 토 론

Table 1은 본 연구결과와 다른 실험방법을 통해 단일세포 수준(single cell level)에서의 세포의 부착력을 측정한 연구자들의 실험결과와 비교를 보여준다. 본 실험 결과의 cell adhesive force는 Yamamoto등의 결과와 비슷한 정도를 보이지만 Athanasio등 과 김영직 등의 결과 보다는 10배 이상의 큰 것으로 나타났다. 여

러 실험 간에는 technique의 차이, 세포가 부착되는 표면의 재질의 차이, 표면재질에 부착하는 세포 종류의 차이, incubation time의 차이, 등에 의하여 직접적인 결과 비교가 어려운 상태이며, 또한 이 연구들에서는 정보가 제공되지 않은 세포와 세포가 부착하는 재질의 접촉표면 거칠기 차이 등이 cell adhesive force 측정 결과 영향을 주었을 것으로 사려된다.

같은 실험적 technique이 사용되었으나 다른 동물에서 분리된 chondrocyte (bovine articular)가 사용된 Athanasio 등의 실험에서 나타난 10배 이상의 adhesive force의 차이는 대상이 되는 연골세포의 크기에 의한 차이 때문인 것으로 생각된다. 또한 cell seeding 이후 부착력을 측정하기 위해 대상 cell을 microscope 위에서 선정할 때, 같은 시간동안 배양한 세포일지라도, cell의 형상이나, 크기 등이 매우 다양하게 분포하고 있어서 대상 cell의 선정에 따른 adhesive force의 결과 분포도 매우 크게 나타나는 경향이 관찰되었기 때문에 세포 선정에 따른 부착력의 차이가 나타날 수 있다는 것을 고려할 수 있다.

앞으로 더 많은 실험을 통해서 보다 확실한 detachment force의 차이점의 원인이 밝혀지면, cell의 종류나 material 또는 표면을 코팅하는 substrate의 종류에 따른 cell detachment의 mechanism을 밝히는데 좋은 자료로 사용될 것이라 판단된다. 또한 더 나아가 생체 내에 들어가는 여러 가지 biomaterials과 이와 반응하는 여러 세포의 물질과의 부착 특성을 파악함으로써 이를 통한 adhesion에 영향을 미치는 factor들을 조절함으로써 cell과 materials 간의 optimized condition의 형성을 유도할 수 있도록 biomaterials이나 medical devices에 대한 임상적 적용을 위한 좋은 자료로 이용될 수 있을 것이라 기대된다.

Table 1. Comparison of applied technique and cell detachment force

Cell type	Rabbit knee chondrocyte	Bovine articular chondrocyte ⁽⁶⁾	Murine fibroblast L929 ⁽⁵⁾	Porcine knee chondrocyte ⁽⁷⁾
Applied techniques				
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 μm glass cantilever	75 μm glass cantilever	L-shaped steel cantilever	1-2 β - dia. pipette cantilever

후 기

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

참고 문헌

1. Edelman C. M., "Cell adhesion molecules," *Science*, pp. 291, 1983.
2. Sung K-LP, Kwan M. K., Maldonado F. and Akeson W. H., "Adhesion strength of human ligament fibroblasts". *Journal of Biomechanical Engineering*, Vol. 116, pp. 237-42, 1994.
3. Garcia A. J., Ducheyne P. and Boettiger D., "Quantification of cell adhesion using a spinning disc device and application to surface-reactive materials". *Biomaterials*, Vol. 18, pp. 1091-1098, 1997.
4. Shin D. and Athanasiou K. A., "Cytoindentation for obtaining cell biomechanical properties," *Journal of Orthopedic Research*, Vol. 17, pp. 880-890, 1999.
5. Yamamoto A., Mishima S., Maruyama N. and 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," *Journal of Biomedical Material Research*, Vol. 50, pp. 114-124, 2000.
6. Athanasio K. A., Thoma, B. S., Lanctot D. R., Shin D., Agrawal C. M. and Lebaron R. G., "Development of the cytodetachment technique to quantify mechanical adhesiveness of the single cell," *Biomaterials*, Vol. 20, pp. 2405-2415, 1999.
7. 김영직, 신정욱, 박기동, 이진우, 김정구, 지경수, 류수하, "세포와 고분자 표면간의 정량적 부착력 측정," *생체재료학회지*, 제6권, 제2호, pp. 65-71, 2002.