<학술논문> DOI:10.3795/KSME-A.2008.32.10.844

미소유로의 길이에 따른 통과세포의 파괴율을 바탕으로 한 생체모사 세포 변형성 검사칩에 관한 연구

윤세찬* · 이동우* · 조영호†

(2008 년 3 월 18 일 접수, 2008 년 7 월 21 일 수정, 2008 년 9 월 2 일 심사완료)

Bio-inspired Cell Deformability Monitoring Chips Based on Strain Dependent Digital Lysis Rates

Sechan Youn, Dong Woo Lee, and Young-Ho Cho

Key Words : Cell Deformability (세포 변형성), Erythrocyte Deformability (적혈구 변형성), Cell Lysis (세포 파괴), Red Blood Cell (적혈구)

Abstract

We present a novel cell deformability monitoring chip based on the digitally measured cell lysis rate which is dependent on the areal strain of the cell membrane. This method offers simple cell deformability monitoring by automated high-throughput testing system. We suggest the filter design considering the areal strain imposed on the cell membrane passing through the filter array having gradually increased orifice length. In the experiment using erythrocytes, we characterized the cell deformability in terms of *average fracture areal strain* which was 0.24±0.014 and 0.21±0.002 for normal and chemically treated erythrocytes, respectively. We also verified that the areal strain of 0.15 effectively discriminates the deformability difference of normal and chemically treated erythrocytes, which can be applied to the clinical situation. We compared the lysis rates and their difference for the samples from different donors and found that the present chips can be commonly used without any calibration process. The experimental results demonstrate the simple structure and high performance of the present cell deformability monitoring chips, applicable to simple and cost-effective cell aging process monitoring.

기호설명

S: : 세포막의 표면적
ε: : 세포막의 면적 변형율
K: : 세포막의 면적 변형에 대한 탄성계수
σ: : 세포막의 변형으로 인한 응력
L: : 세포변형성 검사칩내의 미소유로의 길이

† 책임저자, 회원, 한국과학기술원 바이오시스템학과 및 기계공학과, 디지털나노구동연구단
E-mail : nanosys@kaist.ac.kr
TEL : (042)869-8691 FAX : (042)869-8690
* 한국과학기술원 바이오시스템학과, 디지털나노구동연구단

1. 서 론

세포의 변형성은 다양한 혈류 관계 질환의 원인이 되므로 이에 대한 분석이 중요하며 이를 통해 질병의 여부와 진행정도를 판단할 수 있다.[1] 대표적인 사례[2]로 당뇨병 환자에게 나타나는 적혈구의 변형성 감소는 당뇨병의 혈류 관계 합병증의 원인인 혈액의 고점도 증후군을 유발하는 원인이 된다. 이에 따라 주기적인 세포 변형성의 검사가 질병의 진단은 물론, 합병증으로의 발전을 사전에 예방[3]할 수 있다는 점에서 자가진단에 적합한 세포 변형성 검사기의 개발이 요구되고 있다. 본 논문에서는 인체의 비장에서 혈액이 좁은 채널(Sinus)을 통과할 때 변형성이 적은 노화된 적혈구

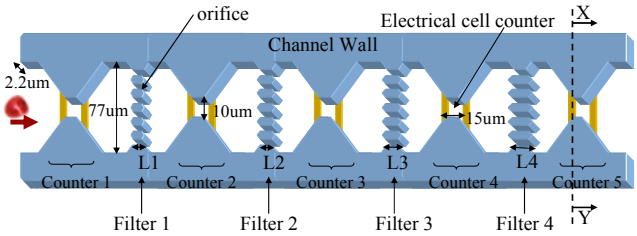
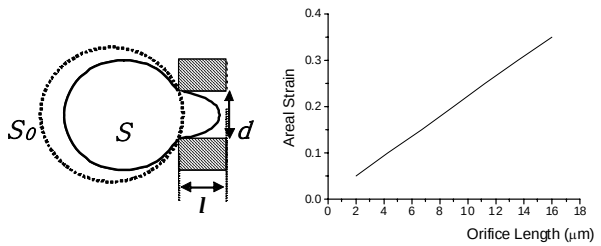


Fig. 1 The structure of the present cell deformability monitoring chips



(a) (b)

Fig. 2 Areal strain in the cell membrane for the orifice length, *l*, and the diameter, *d*: (a) S_0 and S denotes the surface areas of the cell before and after aspiration, respectively; (b) Estimated areal strain of erythrocyte membrane based on the equation (1), for varying orifice length with a fixed orifice diameter , *d*=2μm

가 선택적으로 파괴되는 것을 모사하여, 특정 채널을 통과하는 세포의 파괴율을 바탕으로 세포의 변형성을 검사하는 소자와 방법을 제안하고 관련 소자를 설계, 제작, 실험하였다.

종래의 세포 변형성 검사법에는 미소피펫을 이용한 세포 흡입법[4]과, 변형된 세포의 모양을 광학적으로 분석하는 방법[5,6]과 세포가 특정형상의 필터를 통과하는 시간을 측정하는 방법[7~9]이 있다. 본 논문에서 제시하는 생체모사 세포 변형성 측정 방법은 미소 채널을 통과하는 다수의 세포의 변형성을 동시에 측정함으로써 세포 흡입법[4]에 비해 측정 효율이 높으며 (400cell/min 이상) 고가의 복잡한 광학장비 대신 전기적 세포 계수기를 사용함으로써 광학적인 방법[5,6]에 비해 값싸고 간단한 검사가 가능하다. 또한 필터 통과시간 측정법[7-9]이 통과시간을 세포 변형성의 척도로 사용하는데 반해 본 논문에서 제시하는 생체모사에 의한 방법은 세포의 기계적인 물성이 변형성 판단의 기준이 된다는 점에서 의미를 가진다.

본 연구에서는 미세가공 공정을 통해 집적된 검사장치를 포함하여 자가진단에 적용 가능한 초소형 세포 변형성 검사칩을 개발하는데 목적을 두고 있다.

Table 1 Three types of cell deformability monitoring chips, each having four filters of different orifice lengths*

Device type	Filter 1		Filter 2		Filter 3		Filter 4	
	L_1 [μm]	ε_1	L_2 [μm]	ε_2	L_3 [μm]	ε_3	L_4 [μm]	ε_4
T	2.0	0.04	6.7	0.15	11.2	0.25	16.0	0.37
L	2.0	0.04	4.3	0.10	6.7	0.15	9.0	0.20
U	9.0	0.20	11.2	0.25	13.6	0.31	16.0	0.37

** Each of the Filter i consists of five orifices having the length, L_i, and the identical cross section of 2μm×2.2μm, generating the areal strain of ε_i. for the erythrocytes passing through the orifice*

2. 동작원리 및 설계

2.1 동작원리

Figure 1 은 서로 다른 종류의 네 개의 필터가 직렬로 연결된 세포 변형성 검사칩의 구조를 나타낸다. 각각의 필터는 단면의 형상과 길이가 동일한 7 개의 미소유로를 가지고 있으며, 그 길이(L_i)는 유로를 따라 단계적으로 증가하도록 설계되었다. 세포가 각 필터의 미소유로를 통과할 때 세포막은 변형을 일으키며, 이때의 면적변형율(Areal strain, ε)은 미소피펫 흡입 실험[4] (Fig. 2(a))에서 사용된 모델을 근거로 흡입 전후의 세포의 표면적 S_0, S 에 대하여 아래와 같이 나타낼 수 있다.

$$\varepsilon = \frac{S - S_0}{S} \tag{1}$$

$$\sigma = K\varepsilon,\ (K = 450 dyn/cm^2\ for\ erythrocyte) \tag{2}$$

(1)의 관계식을 바탕으로 세포막에 인가되는 장력을 (2)와 같이 나타낼 수 있다. 세포막의 변형이 동일할 때 세포막에 인가되는 장력은 세포막 고유의 변형성에 비례하므로 세포의 파괴율과 변형성은 비례관계를 가진다. 이를 바탕으로 직경 2μm인 미소유로의 길이에 따라 통과하는 적혈구가 받는 면적변형율은 Fig. 2(b)와 같이 계산된다. 세포가 미소유로를 통과할 때 동일한 면적변형율에 대하여 변형성이 낮은 세포의 세포막에 높은 장력이, 변형성이 높은 세포의 세포막에 낮은 장력이 발생하게 된다. 따라서 점진적으로 증가하는 응력을 인가하는 각 필터에서의 세포의 파괴율이 세포의 변형성에 따라 다르게 나타나게 된다.

이를 측정하기 위해 각 필터의 입출구에는 전기적 세포계수기[10,11]를 설치하여 파괴되지 않고 필터를 통과하는 세포의 개수를 측정 한다. 각각의 필터를 통과하기 전과 후의 세포의 개수(N_i, N_{i+1})와 초기공급된 세포의 총 개수(N_0)를 기준으로 한

각 필터(필터 i)에서의 세포 파괴율은 아래와 같이 계산된다.

$$Lysis\ rate = \frac{N_i - N_{i+1}}{N_0} \times 100\ (\%) \qquad (3)$$

각 필터에서의 세포의 파괴율을 바탕으로 세포가 파괴되는 면적변형율의 평균을 산출하여 변형성 판단의 척도로 사용한다. 이때 유로벽면이 세포막에 가할 수 있는 전단응력의 영향은 세포변형에 의한 응력에 비해 무시할만한 크기라 가정하였다.

2.2 설계

본 논문이 제안하는 세포 검사기의 구조는 Fig.1에 도시된 바와 같다. 각각의 필터는 동일한 단면(2μm × 2.2μm)을 갖는 7개의 미소유로로 구성되어 있으며 그 길이(L_i)는 유로를 따라 단계적으로 증가하도록 설계 되었다. 각각의 미소유로를 구분짓는 구조물의 폭은 9μm로 하나의 세포가 두개의 미소유로에 동시에 들어가면서 찢어지는 현상을 방지하도록 하였다. 또한 필터의 전반부에는 세개의 기둥 구조물(Fig.5)을 설치하여 세포가 필터에 고르게 분산되도록 하였다. 각 필터의 입출구에는 전기적 세포계수기를 설치하였으며, 세포계수기의 전극간 간격은 15μm로 양 전극에 세포가 동시에 접촉하는 현상을 방지하였다. 사각형상의 단면을 갖는 본 소자는 원형단면으로 해석된 모델과는 다른 양상의 세포변형을 유발할 가능성이 있다. 그러나 사각단면의 유로를 통과할 때 세포가 단면의 전 영역을 채우지는 않을 것으로 예상되어 단면형상에 따른 영향은 크지 않을 것으로 판단된다.

본 세포 변형성 검사칩은 적혈구의 막힘현상 없이 통과할 수 있는 동일한 단면 (2μm × 2.2μm)을 가진 미소채널의 길이를 변화시켜 서로 다른 세 종류의 소자를 설계하였다. 서로 다른 4개의 길이를 갖는 필터군을 갖는 소자내에서 각 소자별 미소유로의 길이는 Table 1과 같이 설계되었다.

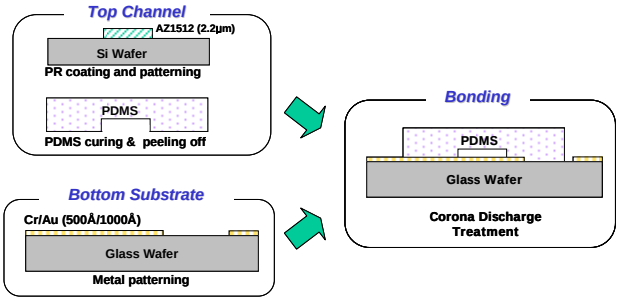


Fig. 3 Fabrication process for the cross section X-Y in Fig. 1

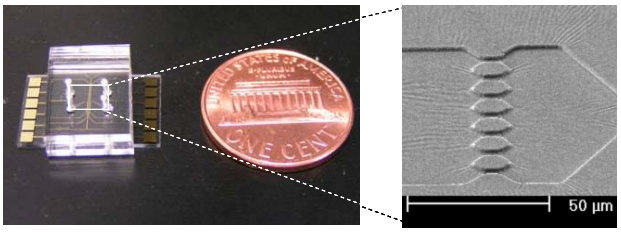
T-device는 0.04~0.37의 면적변형율을 인가할 수 있도록 설계되었으며, L-device는 T-device의 영역 중 하부영역인 0.04~0.20, U-device는 T-device의 상부영역인 0.20~0.37의 범위를 가지도록 설계되었다. L-과 U-device는 T-device가 제공하는 면적변형율의 범위에서 보다 높은 분해능으로 변형성을 검사하기 위함이다.

3. 제작 및 실험

3.1 제작공정

본 세포 변형성 검사기의 제작공정은 Fig.3에 도시한 바와 같이 전극이 형성된 유리기판의 제작, PDMS (PolyDiMethyl-Siloxane, Supelco Inc., USA)를 이용한 미소 유로의 제작, 제작된 유리 기판과 PDMS 유로의 접합의 세 가지 단계로 이루어진다. 먼저 실리콘 웨이퍼 위에 2.2μm 두께의 SU-8 2002 (Microchem, Newton, MA) 패턴을 형성하고 SU-8 패턴에 PDMS를 주입한 후 85°C 에서 두시간의 경화과정을 거쳐 미소유로를 제작하였다.

또한 Pyrex 웨이퍼 위에 Cr과 Au를 각각 300Å과 1200Å 두께로 증착한 후, 이들 금속박막을 습식식각하여 전극을 형성하였다. 마지막으로 PDMS 표면을 고주파 발생기 BD-10AS (Electro-Technic Products, INC)를 이용하여 약 10초간 플라즈마 처리를 한 후 기판과 PDMS유로를 접합하였다.



(a) (b)

Fig. 4 Fabricated device with filters: (a) Device size compared with a penny; (b) SEM photograph of the filter, having seven identical orifices

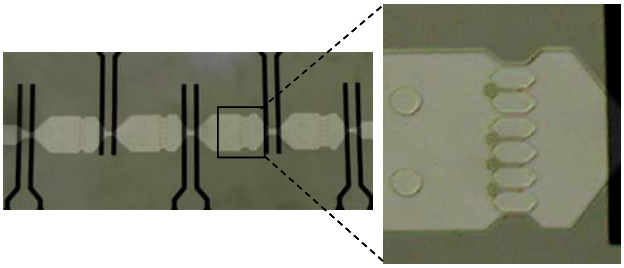


Fig. 5 An image showing the erythrocytes passing through the filter array

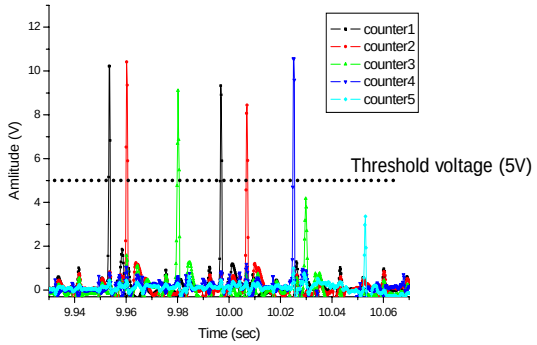


Fig. 6 Threshold voltage for the electrical cell counter, discriminating normal erythrocyte signal from debris noise

PDMS 표면을 플라즈마 처리할 경우 표면에 hydroxyl기가 생겨 유리기판과의 접착이 가능해진다[12]. 접착은 현미경을 통해 위치를 확인하면서 수작업으로 행하였으며 약 5μm 오차의 정밀도를 얻을 수 있었다. 제작된 소자의 SEM이미지는 Fig.4와 같다.

3.2 시료 전처리 과정

본 논문에서는 제안된 세포 변형성 검사기의 성능 평가를 위해 인체에서 추출한 적혈구를 사용하였다. 혈액은 세명의 기증자로부터 채취되었으며 원심분리기를 (1500rpm, 3 분) 이용하여 적혈구를 분리하였다

본 논문에서는 제작된 소자의 성능시험을 위하여 정상 적혈구와 화학처리[13]된 적혈구의 비교실험을 수행하였다. 화학처리를 통해 적혈구의 변형성을 인위적으로 감소시키기 위하여 0.5mM Azo-dicarboxylic acid (Sigma, St. Louis, MO) 용액에 60 분간 처리한 후 각각의 시료를 1×PBS에 적혈구 농도 1.0×10^6 cells/ml 수준으로 희석하였다. 이 과정에서 세포막 단백질인 spectrin의 crosslink가 강해져 세포의 변형성이 감소하게되며 이는 당뇨병환자의 적혈구가 변형성이 감소하는 기작과 동일한 것이다.

3.3 실험장치 구성

세포 변형성 검사기의 성능 평가를 위하여 준비된 시료를 Syringe pump (Hamilton, Reno, NV)를 통하여 0.15μl/min의 유량으로 검사기에 주입하였다. 검사기의 주입구와 배출구에는 16V의 bias 전압이 인가되었는데 이를 통해 세포계수기에서의 저항 변화를 전압의 변화로 측정하는 것이 가능하다. 세포계수기에서의 전압의 변화는 차동증폭기 AD524 (Analog Devices)를 통해 증폭되며 이를 5kHz의 sampling rate으로 측정하여 MATLAB 7.0 을 이용하여 분석하였다.

Table 2 Lysis rates* measured in T-devices for the normal and the treated erythrocytes passing through the orifice length, L*i*

Cell condition	Lysis rate across the filters with the orifice length, L*i* [μm]			
	L1=2μm	L2=6.7μm	L3=11.2μm	L4=16μm
Normal	16.2 ± 3.7%	18.7 ± 5.0%	47.9 ± 6.0%	17.1 ± 5.0%
Treated	14.0 ± 3.0%	36.3 ± 6.6%	36.9 ± 3.8%	11.9 ± 3.3%

* Lysis rates are expressed by the format of mean ± standard deviation.

Table 3 Comparison of deformability estimated in terms of average fracture areal strain* measured in T-devices

Cell condition	Avg. orifice length for the fracture (μm)	Avg. areal strain for the fracture
Normal	10.5±0.6	0.24±0.014
Treated	9.1±0.1	0.21±0.002
Difference	1.4±0.6	0.03±0.014

* Areal strains are expressed by the format of mean ± standard deviation.

Table 4 Accumulated lysis rates* and their maximum differences measured for samples from three different donors

Cell condition	Accumulated lysis rate (%) at maximum point		
	Sample A*	Sample B*	Sample C*
Normal	41.3±4.5	37.9±1.9	41.9±2.0
Treated	59.0±3.7	56.5±5.2	61.8±1.6
Difference	17.8±5.8	18.6±5.6	19.9±2.6

* Lysis rates are expressed by the format of mean ± standard deviation

* Donor Information(age, gender): A(28, female), B(27, male), C(25, male)

Figure 5는 세포 변형성 검사칩에 주입된 적혈구들이 미소필터를 통과하는 모습을 보여준다. 이 과정에서 첫번째와 두번째 필터에서는 적혈구가 통과하는 모습을 쉽게 관찰할 수 있었지만 세번째와 네번째 필터에서는 그 수가 적게 관찰되었다. 이를 통해 필터를 통과하는 적혈구가 선택적으로 파괴되었음을 확인하였다. 각 필터의 양단에 설치된 세포계수기에서 얻어낸 신호는 Fig.6과 같은데, 피크가 높은 신호는 파괴되지 않은 적혈구를, 피크가 낮은 신호는 파괴된 적혈구의 찌꺼기를 나타내는 신호이다. 따라서 임계전압 5V를 기준으로 파괴되지 않은 적혈구의 신호를 구분하여 개수를 측정하였다.

4. 성능시험 결과 및 고찰

정상 및 화학처리된 샘플에 대하여 400cell/min의 처리속도로 T-device에서 측정된 각 필터에서의 적혈구의 파괴율은 Table 2에 정리된 바와 같다. 실험 결과 적혈구들은 2μm×2.2μm의 단면을 가지

는 길이 2~16μm 의 유로를 지나며 선택적으로 파괴된다는 것을 확인하였다. 이는 직경이 1μm 미만이며 길이가 10μm인 모세혈관을 적혈구가 통과할 수 있다는 P. Abatti의 선행연구 결과와는 차이를 보이는데, 이는 인체에서 혈관의 sphincter 근육이 순간적으로 혈관단면적을 조절하는데 비해 본 논문에서 제작한 검사칩의 경우 단면이 고정된 PDMS구조물을 사용한데서 기인한 것으로 판단된다. 그러나 이와 같은 차이와 관계없이 제안된 미소유로가 세포의 변형성에 따라 파괴율을 달리할 수 있다는 점에서 세포 변형성 검사가 가능하다. 단 제안된 검사칩에서 얻은 결과를 바탕으로 세포의 건강상태를 판단하는데 있어서는 임상에서의 추가적인 연구를 통해 신뢰성을 높이는 것이 요구된다.

세포의 파괴율을 도식화한 Fig. 7에서 화학처리된 적혈구들의 미소유로 길이에 따른 파괴율의 분포가 정상 적혈구들의 경우와 상이함을 알 수 있다. 특히 두번째 필터의 경우 화학처리된 적혈구의 파괴율이 월등히 높아 같은 필터에서도 변형성에 따라 파괴율이 달라짐을 확인하였다. 이를 정량화하기 위해 각 샘플이 파괴된 미소유로 길이의 평균값(Table 3)을 계산한 결과 정상적혈구와 화학처리된 적혈구의 경우 각각 10.5±0.6μm와 9.1±0.1μm로 측정되었다. 이를 면적변형율 (Areal strain, ε)로 변환할 경우, 정상 및 화학처리된 적혈구가 파괴되는 면적변화율의 평균값이 각각 0.24±0.014와 0.21±0.002임을 뜻한다.

따라서 본 논문에서 제안한 검사칩은 세포의 변형성의 차이를 구분해낼 수 있으며, 세포가 파괴되는 면적변형율의 평균값을 세포의 변형성을 판단할 수 있는 척도로 사용할 수 있음을 확인하였다.

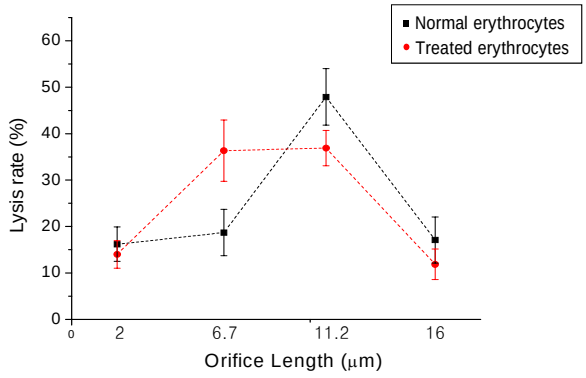
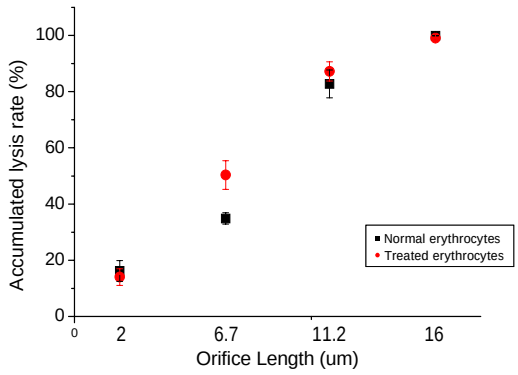


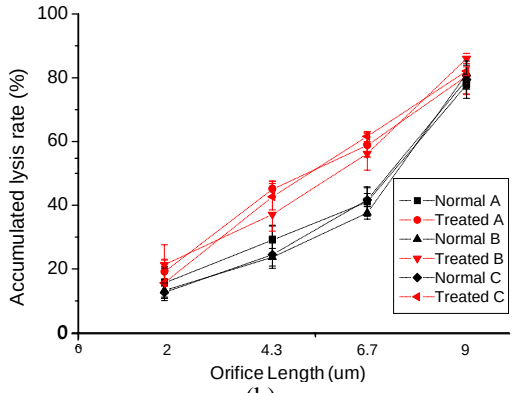
Fig. 7 Lysis rates and their distribution measured in T-devices for normal and chemically treated erythrocytes

한편 각 단계에서 측정된 파괴율 역시 세포의 변형성에 따른 차이를 보임을 확인할 수 있었는데, 이를 확인하기 위해 각 단계에서의 파괴율을 누적하여 계산한 결과 (Fig. 8(a)) T-device의 두 번째 필터(ε=0.15)에서 두 종류 적혈구의 파괴율이 가장 큰 차이를 보였다. 이를 보다 높은 정확도로 측정하기 위해 L-device로 측정을 수행한 결과 역시 동일한 면적변형율(ε=0.15)을 갖는 세번째 필터에서 그 차이가 가장 크게 나타남을 확인할 수 있었다.

이를 임상에서의 간단한 검사에 적용하기 위해서는 여러 사람의 정상적인 적혈구들의 변형성 및 그 편차가 비정상 적혈구들의 변형성 및 그 편차와 서로 겹치지 않아야 한다. 이를 확인하기 위하여 세 사람에게서 기증받은 적혈구 샘플을 사용하여 실험을 수행하였다. 그 결과Fig. 8(b)와 같이 L-device의 세 번째 필터(ε =0.15)에서 정상적인 피실험자들의 적혈구가 36.0~48.5%의 범위의 파괴율을 나타내는 한편 화학처리된 적혈구의 경우 51.3~63.4%로 파괴율의 범위가 확실한 차이를 보여, 본 검사칩이 서로 다른 사람의 적혈구에 대하여 변형성의 편차와 무관하게 정상 및 비정상 세포를 구분할 수 있음을 확인하였다 (Table 4).



(a)



(b)

Fig. 8 Accumulated lysis rates measured for the normal and chemically treated erythrocytes in: (a) T-devices; (b) L-devices for samples from three different donors

5. 결 론

본 논문에서는 비장에서의 노화 적혈구의 선택적 파괴를 모사하여 미소유로의 길이에 따라 세포에 인가되는 면적변형율을 바탕으로 한 세포 변형성 검사칩을 설계, 제작 시험하였다. 시험 결과 정상 적혈구와 화학처리된 적혈구가 파괴되는 미소유로 길이의 평균값은10.5±0.6μm와 9.1±0.1μm로 차이를 보임을 확인하였으며, 이는 각각 0.24±0.014와 0.21±0.002의 파괴 면적변형율에 해당하므로 이러한 차이를 통하여 세포의 변형성을 판단하는 것이 가능함을 확인하였다. 또한 면적변형율 0.15의 값을 가지는 미소필터가 가장 효과적으로 정상적혈구와 화학처리된 적혈구의 변형성을 구분해냄을 확인하였으며 이를 이용하여 임상에서의 간단한 진단이 가능하다.

본 논문에서 제시하는 세포 변형성 검사칩은 고가의 측정장비를 필요로 하지 않아 저렴하고 간단한 세포 변형성 측정이 가능하여 집적화된 자가진단 칩 등에 응용하는 것이 가능하다. 또한 다수의 샘플에서 측정된 세포 변형율과 특정질병간의 상관관계를 규명하는 후속연구를 통해 임상에서의 적용가치 향상이 기대된다.

후 기

본 연구는 과학기술부/한국과학재단 창의적연구진흥사업(디지털나노구동연구단)인 "생체모사기법을 응용한 디지털나노구동기관의 구현에 관한 연구" 과제의 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

(1) Mokken, F. Ch., Kedaria, M., Henny, Ch. P., Harderman, M.R. and Gelb, A.W., 1992, "The Clinical Importance of Erythrocyte Deformability, a Hemorheological Parameter," *Ann. Hematology*, Vol. 64, pp. 113~122.

(2) Caimi, G. and Presti, R. Lo, 2004, "Techniques to Evaluate Erythrocyte Deformability in Diabetes Mellitus," *Acta Diabetol*, Vol. 41, pp. 99~103.

(3) Starzyk, D., Korbut, R. and Gryglewski, R. J., 1999, "Effects of Nitric Oxide and Prostacyclin on. Deformability and Aggregability of Red Blood Cells of Rats ex Vivo and in Vitro," *J. Physiol. Pharmacol.* Vol. 50, pp. 629~637.

(4) Waugh, R. and Evans, E., 1979, "Thermoelasticity of Red Blood Cell Membrane," *Biophys. J.*, Vol. 26, pp. 115~132.

(5) Shin, S., 2004, "Laser-Diffraction Slit Rheometer to Measure Red Blood Cell Deformability," *Review of the Scientific Instruments*, Vol. 75, pp. 559~561.

(6) Dobbe, J.G.G., Streekstra, G.J., Hardeman, M.R., Ince, C. and Grimbergen, C.A., 2002, "The Measurement of the Distribution of Red Blood-Cell Deformability Using an Automated Rheoscope," *Cytometry*, Vol. 50, pp. 313~325.

(7) Hanss, M. F., Guillet, R., Vassauk, D. and Hanss, G., 1989, "Apparatus and Process for Determining the. Deformability of the Red Corpuscles in the Blood," U.S. Patent 4835457, May 30.

(8) Ogura, E., Abatti, P. J. and Moriizumi, T., 1991, "Measurement of Human Red Blood Cell Deformability Using a Single Micropore on a Thin Si3N4 Film," *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Vol. 38, pp. 721~726.

(9) Abatti, P., 1997, "Determination of the Red Blood Cell Ability to Traverse Cylindrical Pores," *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Vol. 44, pp. 209~212.

(10) Allen, T., 1990, *Particles Size Measurements*, Chapman and Hall.

(11) Stanley-Wood, N. G. and Lines, R. W., 1992, *Particle Size Analysis*, The Royal Society of Chemistry.

(12) Zou, J. and Wong, P.Y., 2004, "Thermal Effects in Plasma Treatment of Patterned PDMS for Bonding Stacked Channels," *Materials Research Society Symposium Proceedings*, pp. 125~130.

(13) Schwarts, R.S., Madsen, J.W., Rybicki, A.C. and Nagel, R.L., 1991, "Oxidation of Spectrin and Deformability Defects in Diabetic Erythrocytes," *Diabetes*, Vol. 30, pp. 701~708.