

영상 타원법을 이용한 인간 줄기세포의 굴절률과 두께 분포 연구

최중규 · 심우영 · 이 광 · 김상열[†]

아주대학교 분자과학기술학과
④ 443-749 경기도 수원시 영통구 원천동 산 5번지

박상욱

엘립소테크놀러지
④ 443-270 경기도 수원시 영통구 이의동 906-10 나노소자특화팹센터 7층

제갈원 · 조현모 · 조용재

한국표준과학연구원 나노바이오 융합 연구단
④ 305-340 대전광역시 유성구 가정로 209 (도룡동)

(2008년 11월 10일 받음, 2009년 2월 10일 수정본 받음, 2009년 2월 11일 계재 확정)

타원법을 사용하여 인간 중간엽 줄기세포의 광학상수와 두께의 영상정보를 정량적으로 구하였다. 영상 타원계를 이용하여 *in vitro* 환경에서 세포의 핵(nucleus)과 세포체(cell body)의 타원상수 Δ , Ψ 를 2차원 영상정보 형태로 구한 다음 각 화소별로 타원상수들을 수치해석적 역방계산하여 굴절률과 두께의 영상정보를 얻었다. 세포의 핵 영역과 세포체 영역에서 줄기세포의 두께와 굴절률 값을 2차원 영상정보 형태로 제시하였다.

주제어: Ellipsometry, Imaging Ellipsometer, Stem Cells, MSCs, Cell Thickness, Refractive Index, Image

I. 서 론

타원법은 입사된 빛의 편광상태와 반사된 빛의 편광상태 분석을 통하여 물질의 광학물성과 구조상수 등을 구하고, 박막의 경우 박막의 밀도와 두께 등을 매우 정밀하게 결정할 수 있게 하므로 얇은 막 형태의 시료에 대해 특히 효과적인 방법이다.^[1-3] 더구나 타원법은 광학적인 방법이기 때문에 측정환경에 대한 제약이 없어서 액체나 고밀도 플라스마 환경에서도 시료를 측정할 수 있으며, 바이오 분야에서는 *in vivo* 또는 *in vitro* 환경에서 실시간으로 실험을 진행할 수 있다. 이에 따라 타원법을 이용하여 단백질이나 혈청, 타액 등의 얇은 막들을 조사, 분석하는 연구들이 활발하게 진행되고 있다.^[4-7] 일반적으로 바이오 분야에서는 광학현미경 등을 사용하여 얻은 영상들을 분석함으로써 세포의 형태나 크기에 관한 정량적인 정보를 얻을 수 있다. 그러나 이러한 현미경 영상을 통해서는 영상평면상에서는 충분한 해상도를 확보하며 형태 및 크기정보 들을 얻을 수 있지만 영상평면에 수직한 방향으로의 정보 즉 세포의 두께 또는 세포의 부피에 관한 정량적인 정보를 얻는 데는 한계가 있다.^[8] 특히 미분화 줄기세포와 같이 유연한 세포의 경우 세포가 위치하는 주위 환경에 따라 세포의 형태와 크기 등이 크게 달라지는데 이러한 미분화 세포의 두께 또는 부피에 관한 신뢰할 만한 정량적인 데이터는 아직 보고된 바 없다.^[9]

본 연구에서는 타원법을 이용하여 생체 물질을 *in vitro* 환

경에서 실시간으로 측정, 분석하는 기법을 확립하고, 인간의 성체 줄기세포 중 중간엽 줄기세포에 이 기법을 최초로 적용하였다. 중간엽 줄기세포를 유리기판 위에 배양하고 *in vitro* 환경에서 줄기세포의 핵 영역과 세포체 영역으로 구분하여 각각의 영역에서 두께와 광학적 물성을 결정하였다. 이미 언급한 바와 같이 기존의 광학현미경을 사용하여서는 이러한 중간엽 줄기세포의 두께정보를 얻을 수 없었고 이에 따라 부피에 대한 정량적인 평가를 내릴 수 없는 한계를 보여 왔기에 본 연구에서 제시하는 방법은 세포가 분화하거나 외부 자극을 받았을 때 나타나는 변화를 정량적으로 확인하는데 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

II. 본 론

2.1. 시료준비 및 영상 타원상수 측정

인간 중간엽 줄기세포 시료는 다음과 같이 준비하였다. 아주대 병원 환자에게로부터 골수 유래 인간 중간엽 줄기세포를 기증받아 이를 10% 소혈청과 1% 페니실린, 스트렙토마이신을 포함하는 저혈당 세포배양 배지 디엠이엠에서 배양하였다. 배양기 온도는 37°C를 유지하였고 5%의 CO₂를 지속적으로 공급해 주었다. 배양 2일 후, 85% 정도의 세포 접적도를 보이면 0.25% 트립신과 0.1% 이디티에이를 37°C에서 3분간 처리하여 세포들을 떼어 낸 후 새로운 세포 배양 접시에 옮겨 계대 배양을 하였다. 본 연구에서는 6번의 계대 배양을 거친 인간 중간엽 줄기세포를 타원법 측정에 사용하였다.

[†]E-mail: sykim@ajou.ac.kr

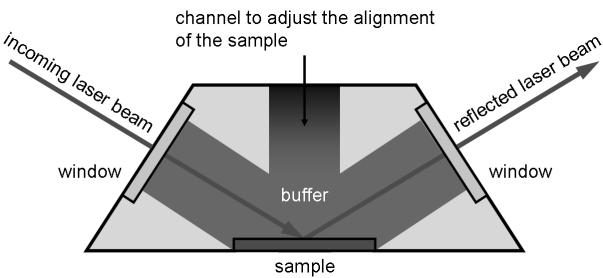


그림 1. 생체 완충용액(buffer)으로 채워진 챔버 속에 줄기세포가 코팅된 유리기판 시료가 놓여있는 모습. 입사광은 입사창을 수직으로 통과하여 시료면에서 반사되고 출사창을 수직으로 통과한다.

줄기세포는 기판 위에서 배양되면 얇은 막처럼 비교적 균일한 두께를 가진다. 본 연구에서는 일반적으로 culture plate에 세포를 배양하는 방법과 동일한 방법으로, 즉, 금속 박막이 코팅되어 있지 않은 유리기판 위에 바로 세포를 배양하였다. 이로써 세포가 배양되는 정도를 광학현미경으로 바로 확인할 수 있었으며 코팅 등 특별한 공정이 포함되지 않아 세포의 공급을 훨씬 더 용이하게 할 수 있었다. 한편 투명한 유리기판의 후면에서 반사된 빛에 의해 발생할 수 있는 부정적인 영향은 기층유리의 후면을 거칠게 연마하여 제거하였다.

영상타원 정보는 PSCA구조의 영상타원계인 나노필름(NANO-film)사의 EP³를 이용하여 얻었다. 이 영상타원계는 532 nm의 단색광을 광원으로 사용하여 배율이 10 배인 대물렌즈 또는 배율이 20 배인 고배율 대물렌즈를 사용함으로써 1.0 μm의 공간분해능을 확보하고 있다. 그림 1에서와 같은 시료챔버를 제작하고 그 내부는 생체완충용액(PBS)으로 가득 채워 *in vitro* 환경을 유지하였다. 시료챔버는 상판과 하판으로 나뉘어져 있으며, 시료를 안에 넣고 상판과 하판을 결합하도록 설계되어있다. 챔버의 용량은 3 ml이며, 액체를 채운 다음 용액이 세지 않도록 고무 패킹을 사용하여 밀폐시켰다. 입사하는 빛과 반사되는 빛은 측면 유리를 수직으로 통과하게 하였다. 사용된 유리의 재질은 무반사코팅이 된 BK7 유리이며, 유리를 수직으로 입사하는 빛이 시료면에 입사하는 각도는 60°이다. 챔버에는 온도 조절기를 부착하여 생체 물질 시료의 온도를 일정하게 유지시켰다.

2.2. 타원상수의 수치해석적 역방계산

영상타원계를 사용하여 구한 타원상수 Δ , Ψ 의 영상정보는 수치해석적 역방계산 방법을 사용하여 구성물질의 광학상수 즉 줄기세포의 굴절률과 두께의 영상정보로 변환시켰다. 본 실험에서 사용된 시료들은 유리기층 위에 성체 줄기세포가 있는 시료들로써 매질/바막/기층으로 구성되는 3상계 광학모형으로 근사될 수 있다. 굴절률이 n_0 인 매질(0)과 굴절률이 n_1 인 박막(1) 그리고 기층(2)의 굴절률(n_2)을 모두 알고 있는 3상계 시료의 경우 미지상수인 박막의 두께 d 는 $\rho = \tan\Psi \cdot e^{i\Delta}$ 으로 정의되는 타원상수 ρ 를 사용하여 다음과 같이 수치해석적인 방법으로 구한다.^[1,10]

$$d = \frac{i}{4\pi} \frac{\log X}{\sqrt{n_1^2 - n_0^2 \sin^2 \theta_0}} \lambda \quad (1)$$

$$X = \frac{-(B - \rho E) \pm [(B - \rho E)^2 - 4(C - \rho F)(A - \rho D)]^{1/2}}{2(C - \rho F)} \quad (2)$$

$$\rho = \frac{A + BX + CX^2}{D + EX + FX^2} \quad (3)$$

여기서 θ_0 는 입사각이며 A, B, C, D, E, F 는 각각 $A = r_{01p}$, $B = r_{12p} + r_{01p}r_{01s}r_{12s}$, $C = r_{12p}r_{01s}r_{12s}$, $D = r_{01s}$, $E = r_{12s}$ + $r_{01p}r_{12p}r_{01s}$, 그리고 $F = r_{01p}r_{12p}r_{12s}$ 로 정의된 상수들이며 r_{ijp}, r_{ijs} 는 각각 p파와 s파의 i, j(i = 0, j = 1 또는 i = 1, j = 2) 계면에서의 Fresnel 반사계수를 가리킨다. 3상계 시료에서 박막의 굴절률 n_1 과 두께 d가 모두 미지상수로 취급될 때에는 식 (1)의 d가 실수가 되도록 하는 굴절률 n_1 을 회귀분석법을 통해 d 값과 함께 결정한다. 본 연구에서 사용된 수치해석적 역방계산과 관련한 구체적인 방법과 수식은 참고문헌을 참조하기 바란다.^[1,2,10]

시료의 광학구조는 3상계로 근사하였는데 매질인 생체 완충용액(PBS)의 굴절률은 1.3337으로 하였고 유리기판인 기층의 굴절률은 1.5261으로 하였다. 완충용액의 온도는 일정하게 유지시켰기 때문에 굴절률의 온도의존성은 고려하지 않았다.

2.3. 결과 및 검토

줄기세포를 배양할 때 culture plate 상에서 자라나는 세포들이 일정한 두께를 가지지는 않지만 많은 반복 실험을 통해 세포의 두께가 평균적인 수치값에서 일정 범위내의 분포를 가지는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 세포는 유연하고 주위 환경에 적응하여 모양의 변형이 가능한 lipid의 membrane을 가지고 있기에 물리적으로 접히거나 하지 않지만 반사 현미경을 통해 세포의 변형여부를 판별하고 morphology상 이상이 없는 세포들을 대상으로 영상타원상수를 구하였다.

인간 중간엽 줄기세포를 영상타원계에 장착되어 있는 CCD 카메라로 본 이미지는 그림 2와 같다. 이 이미지는 일반 CCD가 적용된 반사형 현미경으로 관찰할 때의 이미지와 비슷하지만, 영상타원계는 빛의 세기정보와 위상정보를 함께 포함하고 있기 때문에 세포핵이나 세포체 등 광학적으로 특징적인 영역에서는 일반 현미경과 다른 특징을 보여준다.

인간 중간엽 줄기세포를 세포핵과 세포체의 두 영역으로 나눌 수 있다. 그림 2에서 인간 중간엽 줄기세포의 핵(그림 2-a-①)과 세포체(그림 2-b-②)의 영역을 선별하여 *in vitro* 환경을 유지하면서 각각 선별된 부분의 타원상수를 측정하고 분석하였다. 핵 영역에서 측정한 타원상수의 맵 데이터(그림 3-a, b)를 수치해석적 역방계산하여 구한 굴절률 분포도와 두께분포도(그림 3-c, d) 그리고 세포체 영역에서 측정한 타원상수의 맵 데이터(그림 4-a, b)와 이를 역방계산하여 구한 굴절률 분포도와 두께분포도(그림 4-c, d)는 다음과 같다.

그림 3에서 약간 동그랗게 보이는 중심 영역이 세포핵이 있는 곳이며 세포핵이 있는 영역의 굴절률은 1.48~1.50, 두

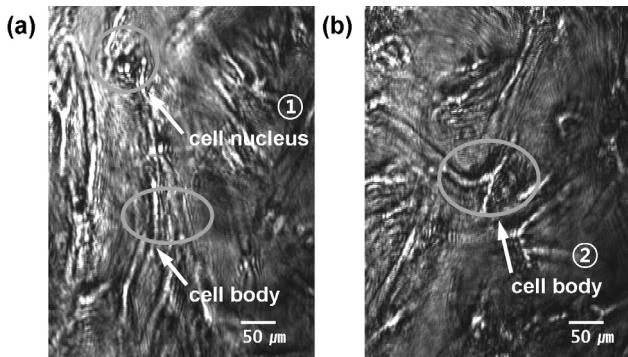


그림 2. 영상 타원계를 이용하여 인간 중간엽 줄기세포를 관찰한 이미지. (a)에서는 핵과 세포체를 (b)에서는 세포체를 뚜렷하게 관찰할 수 있다.

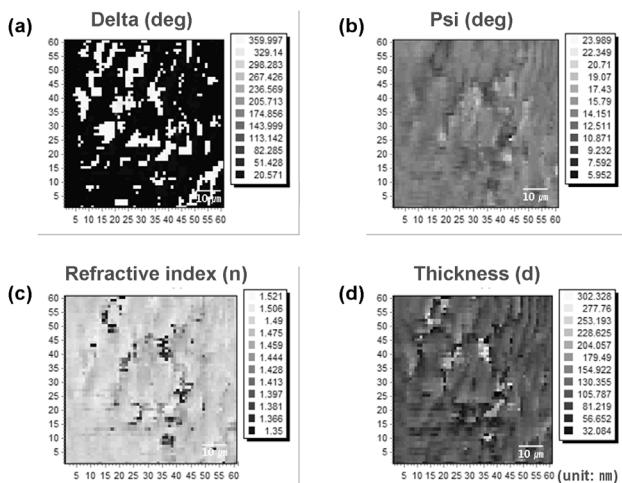


그림 3. 영상 타원계를 이용하여 얻은 인간 중간엽 줄기세포 중 핵부분(그림 2-(a)-①)의 타원상수 Δ (a), Ψ (b) 맵과 이 타원상수를 수치해석적 역방계산을 통해 결정한 굴절률(c)과 두께(d) 맵.

께는 80~130 nm의 분포를 보였다. 이에 비해 그림 4에서 좌측 위 부분이 세포체가 위치하고 있는 곳이며 세포체가 있는 이 영역의 굴절률은 1.33~1.51 정도로 세포핵이 있는 영역에 비해 약간 넓은 분포를 보이고 있으며, 두께도 대략 100~150 nm 정도로 세포핵에 비해 약간 큰 값을 보이고 있다. 세포체가 있는 곳의 두께는 위치에 따라 크게는 200 nm 이상으로 두꺼운 곳도 있으며, 작게는 50 nm 이하로 매우 얕은 곳도 있다. 이런 결과는 줄기세포가 나뭇가지모양으로 뻗어나가면서 성장하는 영역과 그렇지 않은 영역의 차이에서 비롯되는 것으로 판단된다. 즉 성장하는 영역의 두께와 굴절률은 큰 값을 보이는 데 비해 세포가 거의 성장하지 않은 영역은 작은 굴절률과 작은 두께값을 보이는 것으로 설명된다. 대체적으로 굴절률의 분포가 1.44~1.51으로 고르게 분포하지만 일부 영역에서는 굴절률값이 1.33 부근까지 작아지는 것이 이를 반영한다고 하겠다. 특히 1.33의 굴절률 값은 매질인 인산완충용액의 굴절률을 나타내는 것으로 이 영역은 줄기세포가 없는 빈 영역이라 할 수 있다. 전체적으로 세포체는 세

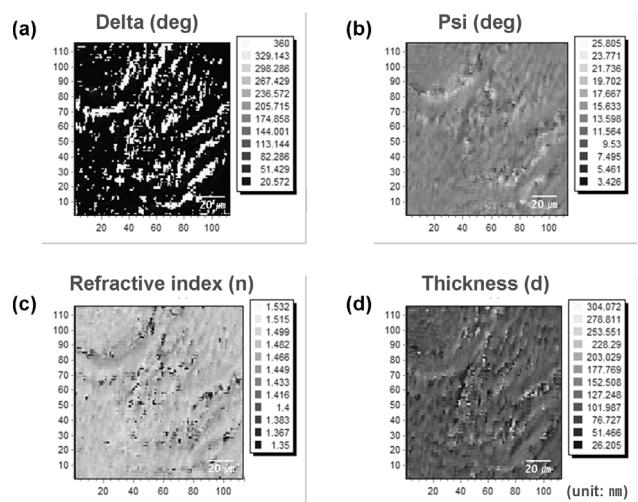


그림 4. 영상 타원계를 이용하여 얻은 인간 중간엽 줄기세포 중 세포체부분(그림 2-(b)-②)의 타원상수 Δ (a), Ψ (b) 맵과 이 타원상수를 수치해석적 역방계산을 통해 결정한 굴절률(c)과 두께(d) 맵.

표 1. 인간 중간엽 세포의 핵과 세포체의 굴절률과 두께 비교

	세포핵	세포체
타원상수 Δ	0~15°, 352~360°	0~12°, 340~360°
타원상수 Ψ	12~17°	10~24°
굴절률(n)	1.48~1.50	1.33~1.51
두께(d)	80~130 nm	50~250 nm

포핵에 비해 타원상수, 굴절률 그리고 두께의 변화폭이 커졌다. 이러한 결과는 표 1에 요약하여 정리하였다.

세포 또는 생체조직과 관련한 타원법 연구는 단백질이나 혈청, 타액의 얇은 막 등을 대상으로 다양하게 시도되고 있다.^[4-7] 하지만, 줄기세포 자체 또는 줄기세포의 두께 그리고 이들의 영상정보와 관련한 타원법 연구결과는 아직 발표된 바가 없다. 한편 줄기세포의 두께에 관한 정량적인 연구결과는 희귀하며 광학적인 방법은 아니지만 줄기세포의 두께와 pluripotent의 관계를 AFM을 사용하여 조사한 한 연구에서는 세포의 두께가 수 mm로 제시되어 두께와 부피의 수치값을 신뢰하기 어렵다.^[9] 부피가 pluripotent에 미치는 영향을 무시할 수는 없고 줄기세포가 분화(differentiation)할 때 세포의 모양과 크기가 바뀌게 됨을 감안하면 세포의 두께 또는 부피에 관한 정보는 분화 과정에서 줄기세포가 보이는 변화와 성질을 이해하는데 크게 기여할 것으로 판단된다.

III. 결 론

영상타원법을 이용하여 인간 중간엽 줄기세포의 두께와 광학적 물성을 세계 최초로 구하였다. 영상 타원계를 이용하여 생체 완충용액의 미분화된 인간 중간엽 줄기세포를 대상으로 *in vitro* 환경에서 실시간으로 타원상수 Δ , Ψ 의 2차원 데이터를 얻었다. 핵과 세포체의 영역을 각각 선택하여 수치화

석적 역방계산을 통해 줄기세포의 굴절률과 두께를 결정하였다. 세포핵의 굴절률은 1.48~1.50, 두께는 80~130 nm, 그리고 세포체의 굴절률은 1.33~1.51, 두께는 50~250 nm의 범위를 가져 세포핵과 세포체가 서로 상당한 차이를 보임을 확인하였다.

영상타원법은 세포 두께의 영상정보를 수 nm의 정밀도로 구할 수 있게 하며 동시에 굴절률 결정을 통하여 세포 밀도의 영상정보도 동시에 구할 수 있게 하므로 바이오 연구에 기여할 수 있는 새로운 도구가 될 것으로 기대한다.

참고문헌

- [1] 김상열, *타원법*(아주대학교 출판부, 경기, 2000), pp. 115-120.
- [2] 안일신, *엘립소미트리*(한양대학교 출판부, 서울, 2000), pp. 177-181.
- [3] H. G. Tompkins and E. A. Irene, *Handbook of Ellipsometry* (William Andrew, INC., USA, 2005), pp. 821-825.
- [4] G. Jin, Z. H. Wang, Y. H. Meng, and Z. Y. Zhao, "Imaging Ellipsometry for the Visualization of Bio-molecular Layers," *Engineering in Medicine and Biology Society Proceedings of the 20th Annual International Conference of the IEEE*, vol. 20, no. 2, pp. 581-584, 1998.
- [5] R. Seitz, R. Brings, and R. Geiger, "Protein adsorption on solid-liquid interfaces monitored by laser-ellipsometry," *Applied Surface Science*, vol. 252, no. 1, pp. 154-157, 2005.
- [6] M. Poksinski and H. Arwin, "Protein monolayers monitored by internal reflection ellipsometry," *The 3rd International Conference on Spectroscopic Ellipsometry*, vol. 455-456, pp. 716-721, 2004.
- [7] A. Joiner, D. Muller, Ulla M. Elofsson, and T. Arnebrant, "Ellipsometry analysis of the *in vitro* adsorption of tea polyphenols onto salivary pellicles," *European Journal of Oral Sciences*, vol. 112, no. 6, pp. 510-515, 2004.
- [8] G. Cox, *Optical Imaging Techniques in Cell Biology* (CRC Press, 2007) pp. 233-238.
- [9] Y. Katsume, M. Hirose, C. Nakamura, and H. Ohgushi, "Correlation between proliferative activity and cellular thickness of human mesenchymal stem cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 368, no. 2, pp. 256-260, 2008.
- [10] F. L. McCrackin, E. Passaglia, R. R. Stromberg, and H. L. Steinberg, "Measurement of the Thickness and Refractive Index of Very Thin Films and the Optical Properties of Surfaces by Ellipsometry," *J. Res. Nat. Bur. Standards - A. physics and Chemistry*, vol. 67A, no. 4, pp. 363-377, 1963.

Study on Refractive Index and Thickness of Human Stem Cells by Using Imaging Ellipsometry

Joong Kyu Choi, Woo Young Shim, Gwang Lee, and Sang Youl Kim[†]

Ellipsometry Lab. & Brain Disease Research Center, Department of Molecular Science & Technology, Ajou University, Suwon 443-749, Korea

[†]E-mail: sykim@ajou.ac.kr

Sang Uk Park

Department of Research and Development, Ellipso Technology Co., Ltd., Suwon 443-270, Korea

Won Chegal, Yong Jai Cho, and Hyun Mo Cho

Nanobio Fusion Research Center, Korea Research Institute of Standards and Science, Daejeon 305-600, Korea

(Received November 10, 2008; Revised manuscript February 10, 2009; Accepted February 11, 2009)

We applied an ellipsometric technique to get quantitative information about the thickness and refractive index of human Mesenchymal Stem Cells (hMSCs). The images of ellipsometric constants Δ , Ψ for the nucleus region and for the cell body region of hMSCs were obtained by using an Imaging Ellipsometer (IE) for their *in vitro* state. A numerical inversion method was applied to deduce the refractive index and the thickness of hMSCs from the measured Δ , Ψ . Thus the images of the refractive index and those of the thickness of hMSCs for the nucleus region and for the cell body region are reported.

OCIS codes: (160.4760) Optical properties; (170.1530) Cell analysis; (240.0240) Optics at surfaces; (260.2130) Ellipsometry and polarimetry