

약물 담지 다공성 중공 실리카 미세구 주위 세포의 주화성 이동

김해춘 · 강미선 · 이석우*

공주대학교 자연과학대학 화학과

Chemotactic Cell Migration around Hollow Silica Beads Containing Chemotactic Reagent

Haechun Kim, Mi-Seon Kang, and Seog Woo Rhee*

Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Kongju National University, Kongju 314-701, Korea

Abstract This paper demonstrates a microfluidic chip incorporating patterned hollow silica beads that can be effectively used for chemotaxis assay. The hollow silica bead has been exploited to develop a carrier for chemoattractant to induce cell migration. The microfluidic chip contains a patterned array of microfabricated docks which can hold only one bead per docking site. The hollow bead placed inside microfluidic chip releases chemotactic reagent (PDGF-BB) around its periphery in a controlled fashion which generates a signal for chemotactic migration of fibroblast cells. The number of cells migrated close to each bead has been assessed. On-chip cell migration assay showed a remarkable result proving the high efficiency and reliable accuracy in quantitative analysis. Therefore, the device could be extensively used in cell migration assay and other various studies related to cellular movements.

Keywords: hollow silica bead, chemotaxis, fibroblast, microfluidic chip

서 론

무기소재와 유기소재의 조합으로 이루어진 core-shell 형태 또는 내부가 비어있는 구조를 갖는 복합재료 나노물질의 제조 방법이 개발되면서 다양한 형태의 유기/무기 하이브리드 소재의 개발 및 활용에 대한 연구가 보고되었다. 나노 복합재료 물질은 다양한 물리·화학적 특성을 가지고 있어 촉매, 전자 재료, 자성 재료, 광학 재료 등에 사용되고 있으며, 최근에는 의료, 약학 및 생화학 분야 등으로 그 사용 범위가 확대되고 있다 [1-10].

유기 계면활성제나 양친족성 고분자는 친수성 부분과 소수성 부분으로 이루어져 있어 수용액 내에서 구형, 층상형, 막대형 등의 미셀 구조를 이룬다. 수용액 내에서 계면활성제 미셀의 바깥 부분에 위치한 친수성 부분에 실리카이트 등

무기물질이 상호작용함으로써 유기/무기 나노 복합재료가 형성된다. 특정한 구조에 대한 틀 (template)로 사용된 유기물은 소성 또는 용매 추출로 제거되며, 그 결과 속이 빈 중공 (hollow) 물질을 얻을 수 있다. Emulsion법, nozzle-reactor법, sacrificial core법 등으로 일반적인 다공성 중공 미세구를 합성한다 [11-16]. Emulsion법으로 합성된 미세구는 화학적으로 균일하며, 단일 조성 또는 복합 조성을 갖는 물질의 합성이 가능하다. Nozzle-reactor법은 유리질의 무정형 중공 미세구를 제작하는데 유용한 방법이다 [15]. 1050~1500°C의 고온에서 용융된 유리를 발포제와 함께 불어서 제조하거나, 젤화 (gelation), 분무건조 등에 의해 형성된 작은 방울이나 분말을 고온로에 통과시켜 내부에 빈 구멍을 만든다. Sacrificial core법은 구형 고분자인 핵 (core) 주위에 물질을 도포한 후, 핵을 용매를 이용하여 추출하거나 열에 의해 분해시켜 중공 미세구를 제작하는 방법이다 [16]. 이와 같은 다공성 중공 미세구는 약물전달체계 (drug delivery system, DDS), 화학약품 저장, 흡착, 촉매, 이온교환수지, 미세반응기, 캡슐화 (encapsulation) 등 다양한 분야에 활용되고 있다 [11-16].

*Corresponding author

Tel: +82-41-850-8491, Fax: +82-41-856-8613

e-mail: jisanrhee@kongju.ac.kr

주화성 (chemotaxis)은 세포가 특정 약물의 농도 구배 (concentration gradient)를 인식하여 약물의 높은 농도를 향하여 이동하는 현상을 일컫는다. 주화성은 생체 내에서 세포 이동의 주요한 기작으로 평가되고 있기 때문에 세포생물학, 미생물학, 면역학 등 많은 분야에서 폭 넓게 연구되어 왔다[17-20]. 일반적으로 세포의 주화성 실험을 위하여 세포 주변에 화학 약물의 농도 구배를 제어하기 위한 다양한 방법들이 사용되어 왔다. 대표적인 상업적 세포 주화성 시험 기구로는 Boyden chamber, Zigmond chamber, Dunn chamber, Under-agarose assay, Micropipette-based assay 등이 있다 [21-25]. 주화성 시험 기구를 사용하여 박테리아의 주화성 연구, 주화성을 이용한 암세포의 전이과정 억제 기작에 대한 연구, 상처 치유 과정에 대한 기작 연구, 호중구 (neutrophil)의 주화성 연구등이 활발하게 이루어지고 있다 [17-29].

미세유체칩 (microfluidic chip)은 기기의 초소형화, 사용 약물의 최소화, 실험결과와 신뢰도 극대화 등을 바탕으로 분자생물학, 의학 등 분야에서 각광받고 있는 실험 기구이다 [26-36]. 이와 같은 미세유체칩은 분석에 필요한 여러 가지 장치들을 아주 작은 칩 위에 집적시킨 마이크로프로세서이며, 채널이 형성된 칩 내에 미량의 시료를 주입하여 분석하는 방법으로 나노리터 (nL) 이하의 극미량의 시료만으로 물질의 분리, 분석을 할 수 있는 장점을 가지고 있다. 미세유체 제어기술을 이용하여 칩 위에 2차원으로 실험장치들을 집적화시킬 수 있다. 이는 μ -TAS (micro total analysis systems)의 기본개념이며, 나노리터 또는 피코리터 (pL) 수준의 극소량의 유체를 다양한 장치를 이용하여 제어함으로써 칩에 제작된 수십만 개의 작은 구획 (compartment)에 각각 다르게 제어된 화학적 환경을 형성할 수 있다 [30-36]. 따라서 화학 분야는 물론 세포생물학을 위한 다양한 미세환경 변화 조건을 아주 쉽게 형성할 수 있어 고효율 측정, 분석 및 평가에 활용도가 매우 높은 기술이다.

Zigmond chamber, Dunn chamber의 경우에는 약물이 저장된 장소와 세포의 이동을 평가하는 장소 사이의 거리가 짧아야 확산이 잘 일어난다. 또한 아가로즈젤이나 콜라겐 젤을 사용하는 경우에는 약물의 이동 속도가 매우 느려 주화성 실험에 긴 시간이 요구된다. 미세유체 채널과 주사기 펌프 (syringe pump)를 사용한 주화성 기구는 매우 안정적인 농도 구배를 형성하고 실시간 모니터링이 가능한 반면, 사용하기 복잡한 주사기 펌프를 사용해야 한다는 것과 주사기 속에 주입된 배지가 외부환경으로부터 고립되어 시간에 따라 배양조건 (특히, 배지의 pH)이 달라질 수 있는 단점이 있다. 따라서 본 연구에서는 미세유체칩의 장점과 고전적인 주화성 기구들의 장점을 취해 간단하지만 효율적인 주화성 시험 기구를 개발하고자 하였다. 다공성 중공 실리카 미세구를 합성하여 미세유체칩의 채널 내의 특정위치에 고정시키고, 중공에 담지된 약물 (PDGF-BB)의 서방 (slow-release)으로 인하여 미세구 주변에 배양된 BALB/3T3 섬유아세포 (fibroblast)가 주화성 이동을 할 수 있도록 고안하였다. 이동하는 세포의 궤적 (trajectory)을 실시간으로 관찰하여 정성 및 정량적

인 주화성을 평가하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

본 실험에서 사용한 용매는 Sigma-Aldrich Co. (MO, USA), Junsei Chemicals (Japan)에서 시약급을 구입하여 정제없이 사용하였다. Octylamine (Aldrich), tetraethylorthosilicate (TEOS, Fluka, MO, USA) 등은 제조회사로부터 구입하여 정제없이 사용하였다.

중공 미세구의 합성

중공 실리카 미세구는 문헌에 보고된 방법을 응용하여 합성하였다 [37]. 11.25 mL의 octylamine (Aldrich)과 11.25 mL의 tetraethylorthosilicate (Fluka)를 250 mL 등근 바닥 플라스크에 넣은 후, 약 600 rpm의 속도로 3분간 자기 교반하여 균일한 용액을 만들었다. 이 용액에 101.25 mL의 0.20 M 염산 (Junsei Chemicals) 수용액을 빠르게 첨가한 후, 약 600 rpm의 속도로 5분간 추가적인 교반을 하였다. 원심분리기 (Hanil, MF 550)를 이용하여 반응 생성물을 모액 (mother liquor)으로부터 분리한 후, 침강물을 증류수로 5회 세척하였다. 공기 중에서 24시간 건조한 시료를 전기로 (고려 전기로 개발, KF-SP-1000)에서 일정한 승온 속도 (1, 2, 4, 8°C/min)로 온도를 증가시켜 600°C에서 6시간 동안 소성시켰다. 증류수에 분산시킨 실리카 미세구를 체로 걸러 70~100 μ m 크기 범위의 미세구만을 주화성 실험에 사용하였다.

중공 미세구의 특성 규명

합성과정에서 얻어진 실리카 미세구의 전구체 (precursor)인 유기물 핵을 포함하는 중간 생성물의 열무게 분석을 실시하여 (TGA, SETARAM) 온도에 따른 열분해 반응을 관찰하였다. 주사전자현미경 (FE-SEM, JSM-6335F, JEOL)으로 소성된 다공성 중공 실리카 미세구의 형상을 분석하였으며, EDS (Energy Dispersive Spectrometry, Oxford, JEOL)로 미세구 표면의 화학적 조성을 분석하였다. X-선 회절 분석기 (XRD-Powder, DMAX2000)로 합성된 미세구 내에 존재하는 실리카의 결정 구조를 분석하였다. 입도 분포는 레이저 산란 입도 분석기 (Laser Scattering Particle Size Analyzer, HELOS/RODOS & SUCCELL, Sympatec GmbH)를 이용하여 분석하였다. 기체흡착실험을 통하여 실리카 미세구의 비표면적과 세공크기 분포를 측정하였다 (Micromeritics, ASAP).

미세유체칩 제작

Auto CAD (Autodesk, Auto CAD2006)를 이용하여 미세

유체칩을 도안하고 고해상도 (25,000 dpi) 레이저 플로터 (RG-8500)로 투과성 필름에 인쇄하여 필름마스크 ((주)나노시스)를 제작하였다. Fig. 1(a)에 나타낸 것과 같이 칩의 윗부분 (채널층)에 대한 거꾸집은 3인치 실리콘 웨이퍼 (p-type, Si (100)) 위에 SU-8 50 감광제 (Microchem, MA, USA)를 이용하여 200 μm 두께로 제작하였으며, 미세구를 고정시키기 위하여 일정한 거리에 단차를 둔 칩의 아래부분 (기관층)에 대한 거꾸집은 100 μm 두께로 제작하였다. 열경화성 고분자인 PDMS (poly(dimethylsiloxane), SYLGARD 184, Dow-Corning, USA)를 이용하여 고분자 주물 방법으로 미세유체칩을 제작하였다. [28,29] 10 : 1의 질량 비율로 전구체와 경화제를 완전히 혼합한 후, 거꾸집에 붓고 기포를 제거한 후, 70°C의 오븐에서 4시간 경화하였다. 경화된 PDMS 주물을 의료용 칼로 잘라 거꾸집에서 떼어낸 후, 용액 주입구 (inlet)와 배출구 (outlet)를 위한 구멍을 뚫어 PDMS 채널층을 제작하였다. 준비된 채널층을 미세구가 고정된 PDMS 기관층과 함께 플라즈마 세정기 (PDC-002, Harrick Plasma, NY, USA)에서 1분 동안 O_2 플라즈마로 표면처리 한 후 두 층을 비가역적으로 결합시켰다. 칩의 친수성을 유지하기 위하여 채널에 살균된 증류수를 채워 37°C, 5% CO_2 인큐베이터에 보관하였다. 칩을 사용하기 하루 전에 세포 배양 배지로 채널을 채워 인큐베이터에 보관하여 채널이 배지로 포화되도록 하였다.

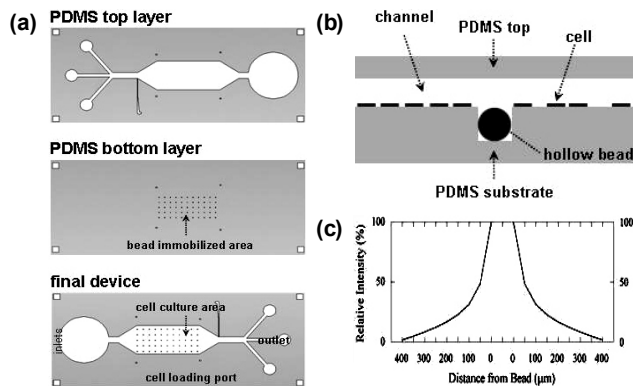


Fig. 1. Schematic illustration of a microfluidic PDMS chip for cell migration. (a) The PDMS top layer and bottom layer were combined each other to form PDMS cell migration chip. (b) Cross-sectional view of immobilized hollow silica bead in the docking well. (c) Theoretical concentration gradient formed around bead containing chemotactic reagent.

다공성 중공 실리카 미세구로부터 약물 유출의 정량화

다공성 중공 실리카 미세구를 특정 형광물질 수용액에 담가 미세구 중공에 수용액을 주입시킨 후, Fig. 1(b)와 같이 미세유체칩 채널의 지정된 위치 (단차)에 고정하였다. 짧은 시간에 충분히 세척하여 잔존하는 미세구와 형광 물질을 완전히 제거하고 완충용액으로 채널을 채운 후, 입구를 막아 용액의 증발과 채널 내에서의 흐름을 방지하였다. 시간에 따라 얻어지는 미세구 주변의 농도는 Fig. 1(c)에 나타낸 것

과 같이 이론적으로 점원으로부터의 확산에 의해 얻어진다. 이를 규명하기 위하여 미세구 주변의 형광 현미경 이미지의 형광 세기분포에 대한 분석 (μ -manager 프로그램, laboratory of Ron Vale at the University of California at San Francisco)을 통하여 미세구의 중공으로부터 유출되는 형광 물질의 농도를 분석하였다. 형광 세기 분석을 통해 얻은 상대적인 농도 분포를 시간과 거리의 함수로 도시하였다.

BALB/3T3 섬유아세포의 배양

생쥐 (mouse) BALB/3T3 섬유아세포는 한국생명공학연구원 KCTC (Korean Collection for Type Cultures)에서 분양을 받아 계대배양 (subculture)을 통해 본 실험에 사용하였다. BALB/3T3 섬유아세포의 배지는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen, CA, USA) 기본배지에 10% FBS (fetal bovine serum, Invitrogen)와 1% penicillin/streptomycin 용액 (Sigma, MO, USA)을 첨가하여 제조하였다. 위에서 제조한 배지를 사용하여 조직배양 플라스크에 세포를 계대배양 하였다.

미세유체칩 내에서 세포의 배양

조직배양 플라스크에 배양된 세포를 원심분리하여 얻은 세포 현탁액 20 μL 를 마이크로 피펫을 이용하여 칩의 세포 주입구에 주입하고 37°C, 5% CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. 일정한 세포 밀도 (100 cell/ mm^2)로 세포가 성장할 수 있도록 12시간마다 새로운 배지로 교체하였다.

광학 현미경을 이용한 실시간 영상 기록 시스템

현미경 위에 자동화된 스테이지 (H107 ProScan, Prior Scientific Inc., MA, USA)를 장착하고 CO_2 (5%), 온도 (37°C), 습도 (포화)를 조절할 수 있는 미니인큐베이터를 제작하였다. 미세유체칩을 포함하는 one-well 세포배양 plate를 자동화된 스테이지에 장착하였으며, 현미경 외부에 아크릴로 제작된 가열상자를 만들고, 미세유체칩의 채널 위치에 온도센서를 부착하여 실험하는 동안 미세유체칩 주변의 온도를 $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 유지시켰다. 정제된 공기로 불려진 5.0% 의료용 CO_2 를 수분을 포화시켜 미세유체칩을 포함하는 one-well 세포배양 plate에 흘려주어 CO_2 농도와 습도를 일정하게 유지시켰다. 정해진 많은 위치에 대하여 일정 시간 간격으로 DIC (differential interface contrast) 이미지를 기록하였다.

세포의 주화성 분석

제공된 프로토콜에 따라 PDGF-BB (Platelet-Derived Growth Factor, 25 kDa, BALB/3T3 세포의 주화성 시약, Invitrogen) 용액 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 제조하였다. 합성된 다공성

중공 실리카 미세구를 PDGF-BB 용액에 담가 (4°C, 5일) 약물이 미세구 중공으로 충분히 주입되도록 하였다. 미세유체칩에 BALB/3T3 섬유아세포를 주입하여 무질서하게 자라도록 배양하였다. 실험에 적합한 밀도로 세포가 배양된 후 (100 cell/mm²), 무혈청 배지 (serum-free-media)로 배지를 바꾸어 약 6시간 동안 처리하였다. 미세유체칩의 용액 주입구를 통해 약물 (PDGF-BB)을 포함한 미세구를 고정하고 일정 시간 간격으로 세포의 광학 현미경 이미지를 촬영하였다. 촬영된 현미경 이미지를 Image J 프로그램 (미국 National Institutes of Health에서 제공하는 소프트웨어)으로 세포의 이동경로를 확인하였고, 일정한 구획에서 미세구를 향한 세포의 평균 이동거리를 분석하였다.

결과 및 고찰

다공성 중공 실리카 미세구의 형태 및 구조

Octylamine은 수용액 조건에서 에멀전을 형성하며 산처리로 인하여 표면은 암모늄 머리가 붙어 친수부분을 형성한다. 이 표면에 TEOS가 상호작용하고 산의 촉매작용으로 중공 실리카 전구체를 형성한다. 합성된 미세구 전구체에서 다공성 중공 미세구를 얻기 위해서는 전기로를 이용한 소성과정이 필요하다. 소성과정에서 틀을 형성했던 유기물질들은 고온에서 모두 열분해되어 제거된다. 분해 생성물이 미세구에서 이탈되면서 껍질에 미세 세공이 형성된다. 미세구 전구체의 TGA 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 열분해로 인하여 250°C까지 약 71%의 질량이 소실되고, 잔류 질량은 초기 질량의 29%로 이는 실리카 미세구로 인한 것이다.

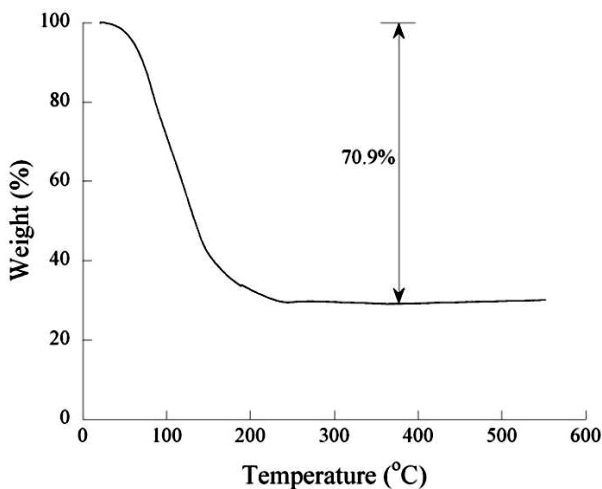


Fig. 2. TGA analysis of precursor of synthetic hollow silica bead.

합성된 실리카 미세구는 결정성이 매우 낮아 XRD 패턴에서 약한 피크만을 나타내는데, SiO₂의 (111)면이 확인되어 실리카 기본구조를 하고 있음을 알 수 있다 (실험 결과는 나

타내지 않음). 합성된 실리카 미세구의 FE-SEM 이미지를 Fig. 3(a)~(c)에 나타내었다. 그림에 나타낸 것과 같이 미세구는 구형이며, 다양한 크기로 분포하는 것을 알 수 있다. 일부 깨어진 미세구의 이미지를 통해 내부가 비어 있는 중공 구조임을 확인할 수 있으며, 절단면 이미지 분석을 통하여 얻은 70~100 μm 크기의 실리카 미세구에 대한 껍질의 두께는 10~15 μm 정도이다. 껍질 부분을 고배율로 관찰한 사진 (Fig. 3(c))에서 미세구의 표면은 작은 실리카 결정 (grain)들이 뭉쳐져서 이루어진 것을 확인할 수 있다. 합성된 실리카 미세구의 입도 분포를 Fig. 3(d)에 나타내었다. 미세구는 10~150 μm 범위의 입도 분포를 가지며, 40% 이상의 입자들이 70~100 μm 크기를 갖는 것으로 확인되었다. 150 μm 크기는 기기의 측정범위를 벗어난다. 합성된 실리카 미세구의 EDS 결과를 Fig. 3(e)에 나타내었다. 예상한 바와 같이 미세구는 Si와 O 두 가지의 원소로만 구성되어 있으며, 얻어진 Si와 O의 몰비는 평균 1 : 2.3으로 SiO₂로 구성되어 있음을 알 수 있다. 합성된 실리카 미세구의 세공 분포를 Fig. 3(f)에 나타내었다. 미세구의 실리카는 소성 조건에 따라 다소 차이는 있지만 600~750 m²/g의 비표면적을 가지며, 3~6 nm 범위의 세공을 갖는다. 이 세공을 통하여 용매와 용질이 껍질 내외로 이동된다. [38]

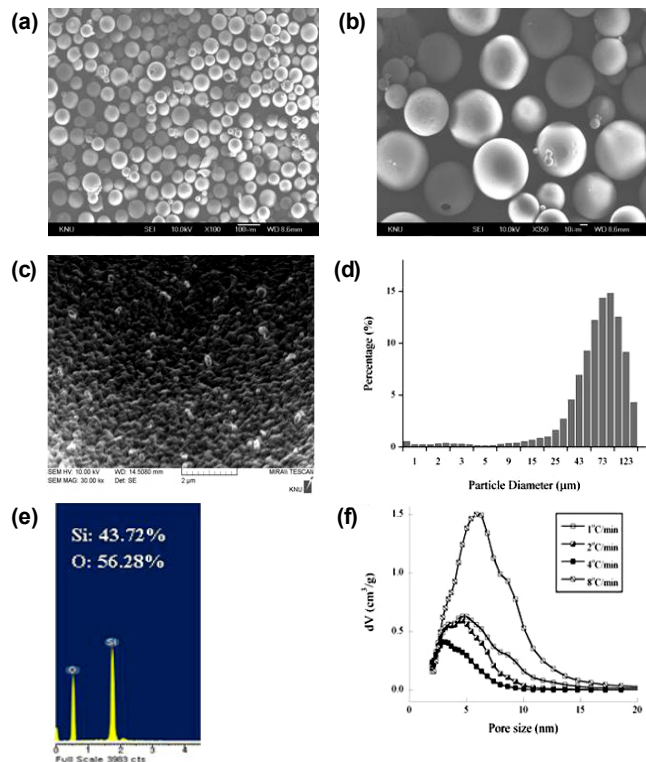


Fig. 3. (a)~(c) FE-SEM images of synthetic hollow silica beads. (d) Particle size distribution plot of synthetic hollow silica beads. (e) EDS analysis of synthetic hollow silica beads. (f) Pore size distribution curves of synthetic hollow silica beads obtained from heating of silica bead precursors with different heating rates.

다공성 중공 실리카 미세구의 채널 내 고정 및 약물 서방 모의 실험

미세유체칩 내의 특정위치에 미세구를 고정하고 이를 확인하기 위하여 현미경을 사용하여 투과이미지와 형광이미지를 분석하였다. 미세구의 고정을 위하여 단차 (~100 μm)가 있는 PDMS 기판을 사용하였으며, 지정된 위치에 미세구가 고정되어 있는 것을 확인할 수 있었다 (실험 결과는 나타나지 않음).

다공성 중공 미세구에 주입된 Calcein-AM은 시간에 따라 미세구로부터 미세 세공을 통하여 유출되어 [38] 미세구 주변으로 확산에 의해 분배된다. 살아있는 세포를 염색하는 Calcein-AM의 특징을 이용하여 미세유체칩 내 미세구 주변에 무질서하게 배양시킨 세포에 대해 시간에 따른 세포의 염색 정도 (형광 세기)를 분석하였다 (Fig. 4). 시간이 지남에 따라 미세구 주변의 세포부터 염색되기 시작하여 (0.5 h), 점차 미세구로부터 멀리 떨어진 세포가 염색되며 (1 h), 충분한 시간이 지나면 모든 세포가 염색되는 것 (2 h)을 관찰하였다. 이는 미세구로부터 유출된 Calcein-AM의 확산이 시간과 거리의 함수로 나타내어지기 때문에 거리에 따른 염색 시간이 달리 나타난 결과이다.

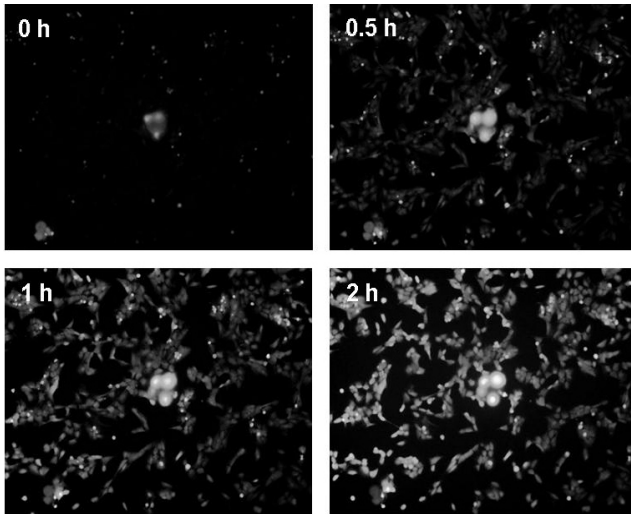


Fig. 4. Fluorescent microscopic images of cells captured in a regular interval after loading of silica beads. BALB/3T3 fibroblast cells, which were cultured in the microfluidic channel, were stained by Calcein AM released from synthetic hollow silica beads.

세포의 주화성 관찰

세포의 주화성을 분석하기 위하여 BALB/3T3 섬유아세포의 성장인자인 PDGF-BB를 사용하였다. PDGF-BB의 분자량은 약 25,000 g/mol로 FITC-Dx (Sigma, MW: 40,000 g/mol)를 사용하여 유출실험을 수행하였으며, 그를 바탕으로 모사한 농도 구배 곡선을 얻었다 (실험 결과는 나타나지 않음). 실험의 대조군으로서 미세유체칩 내에서 일정한 밀도로 배양

된 세포에 6시간 동안 무혈청 배지를 처리하여 준 후, 무혈청 배지 조건에서 세포의 이동을 광학 현미경을 통하여 분석하였다. 대조군에 대하여 얻어진 이미지로부터 세포가 실제로 미세구 쪽으로 움직인 직선거리를 평가하기 위하여 미세구를 중심으로 400 μm 까지 존재하는 세포에 대하여 실제 움직인 궤적으로부터 직선거리를 측정하였다. 아래 Fig. 5에 미세구를 중심으로 100 μm 간격으로 구획을 나누어 세포의 직선 이동거리를 분석하여 도시하였다. 각각의 세포가 움직인 거리에 대한 평균을 구하여 도시한 결과 세포는 무질서하게 움직여 실제 미세구를 향해 움직인 거리는 매우 짧은 것 (0.25~2.5 μm)을 확인할 수 있다.

세포가 무질서하게 자라고 있는 미세유체칩 내 단차에 PDGF-BB 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 포함한 미세구를 고정시킨 후, 6시간 동안 세포의 이동을 관찰한 결과 세포는 PDGF-BB가 유출되는 미세구 쪽 (높은 농도)으로 이동하였다. 세포가 실제로 미세구 쪽으로 움직인 직선거리를 측정한 결과 0~100 μm 구간에서는 평균적으로 36 μm 이동하였으며, 100~200 μm 구간에서는 24 μm , 200~300 μm 구간에서는 6.5 μm , 300~400 μm 구간에서는 5 μm 이동하였다. 이는 세포가 성장인자로부터 전달되는 신호를 인식하여 신호의 세기가 더 큰 쪽으로 이동하기 때문이다. 더욱이 미세구와 더 가까운 곳에 위치한 세포가 더 많은 거리를 이동한 것을 알 수 있다. 이는 미세구에 가까울수록 세포가 인식하는 성장인자의 농도차가 더 커서 더 강한 신호를 인식하기 때문으로 판단된다.

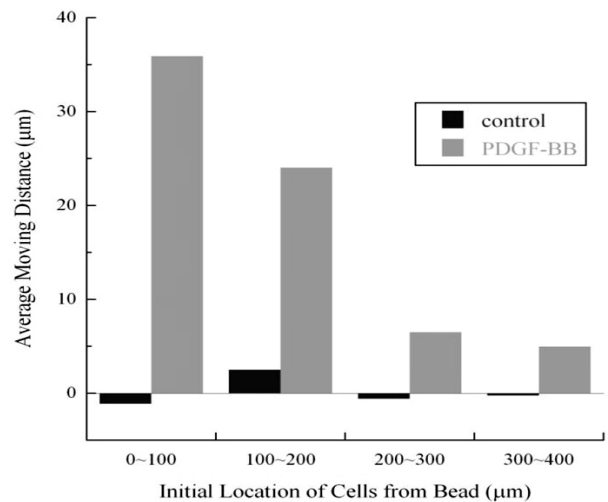


Fig. 5. Quantitative analysis of cell migration of BALB/3T3 fibroblast cells cultured around synthetic hollow silica beads containing 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of PDGF-BB.

결론

미세유체칩 채널에서 칩 내부에 PDGF-BB를 담지한 다공성 중공 실리카 미세구를 특정위치에 고정하고, 미세구로부터 약물의 유출을 통해 미세구 주변의 섬유아세포의 주화성

거동을 확인함으로써 약물이 유출되는 양 및 시간에 따른 세포의 거동을 실시간으로 관찰할 수 있었다. 더욱이 미세구 주변의 세포 위치와 이동방향, 이동거리를 분석함으로써 세포의 주화성 이동에 대한 정량적인 분석을 시도하였다. 채널에 고정된 미세구를 통해 약물을 유출함으로써 주사기 펌프 등 다른 부가 장치 없이 극미량의 시료를 사용하여 실험을 수행할 수 있었다. 또한 채널 안에 고정된 미세구는 50개 (5×10)로 각 칩마다 한 번의 실험 수행으로 50개의 병행 실험이 가능하므로 매우 많은 자료수집이 가능하였다. 따라서 기존의 연구방법으로 실험을 수행하였을 때와 비교하여 매우 경제적이고 효율적인 실험을 수행할 수 있었다. 이와 같은 일련의 실험을 통하여 세포의 주화성에 활용할 수 있는 새로운 세포칩의 가능성을 제시하였다.

감 사

이 논문은 2009년 정부 (교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구이며 (2009-0087005), 이에 감사드립니다.

접수 : 2010년 6월 7일, 게재승인 : 2010년 8월 17일

REFERENCES

- Caruso, F., R. A. Caruso, and H. Möhwald (1998) Nanoengineering of inorganic and hybrid hollow spheres by colloidal templating. *Science* 282: 1111-1114.
- Caruso, F. (2001) Nanoengineering of particle surfaces. *Adv. Mater.* 13: 11-22.
- Sun, Y. and Y. Xia (2002) Increased sensitivity of surface plasmon resonance of gold nanoshells compared to that of gold solid colloids in response to environmental changes. *Anal. Chem.* 74: 5297-5305.
- Sun, Q., P. C. M. M. Magusin, B. Mezari, P. Panine, R. A. van Santen, and N. A. J. M. Sommerdijk (2005) The formation of gigantic hollow silica spheres from an EO_{76} - PO_{29} - EO_{76} /butanol/ethanol/ H_2O quaternary system. *J. Mater. Chem.* 15: 256-259.
- Chen, J., F. Saeki, B. J. Wiley, H. Cang, M. J. Cobb, Z.-Y. Li, L. Au, H. Zhang, M. B. Kimmey, X. Li, and Y. Xia (2005) Gold nanocages: Bioconjugation and their potential use as optical imaging contrast agents. *Nano Lett.* 5: 473-477.
- Wang, Z. L. and J. Song (2006) Piezoelectric nanogenerators based on zinc oxide nanowire arrays. *Science* 312: 242-246.
- Yu, J. G., H. Guo, S. A. Davis, and S. Mann (2006) Fabrication of hollow inorganic microspheres by chemically induced self-transformation. *Adv. Funct. Mater.* 16: 2035-2041.
- Wan, Y. and D. Zhao (2007) On the controllable soft-templating approach to mesoporous silicates. *Chem. Rev.* 107: 2821-2860.
- Fei, J. B., Y. Cui, X. H. Yan, W. Qi, Y. Yang, K. W. Kang, Q. He, and J. B. Li (2008) Controlled preparation of MnO_2 hierarchical hollow nanostructures and their application in water treatment. *Adv. Mater.* 20: 452-456.
- Pu, H., X. Zhang, J. Yuan, and Z. Yang (2009) A facile method for the fabrication of vinyl functionalized hollow silica spheres. *J. Colloid Interf. Sci.* 331: 389-393.
- Schacht, S., Q. Huo, I. G. Voigt-Martin, G. D. Stucky, and F. Schüth (1996) Oil-water interface templating of mesoporous macroscale structures. *Science* 273: 768-771.
- Li, Y., J. Shi, Z. Hua, H. Chen, M. Ruan, and D. Yan (2003) Hollow spheres of mesoporous aluminosilicate with a three-dimensional pore network and extraordinarily high Hydrothermal stability. *Nano Lett.* 3: 609-612.
- Zhu, Y., J. Shi, W. Shen, X. Dong, J. Feng, M. Ruan, and Y. Li (2005) Stimuli-responsive controlled drug release from a hollow mesoporous silica sphere/polyelectrolyte multilayer core-shell structure. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44: 5083-5087.
- Zhang, H., J. Wu, L. Zhou, D. Zhang, and L. Qi (2007) Facile synthesis of monodisperse microspheres and gigantic hollow shells of mesoporous silica in mixed water-ethanol solvents. *Langmuir* 23: 1107-1113.
- Lu, Y., H. Fan, A. Stump, T. L. Ward, T. Rieker, and C. J. Brinker (1999) Aerosol-assisted self-assembly of mesostructured spherical nanoparticles. *Nature* 398: 223-226.
- Caruso F., R. A. Caruso, and H. Möhwals (1999) Production of hollow microspheres from nanostructured composite particles. *Chem. Mater.* 11: 3309-3314.
- Yang, X.-D., J. R. F. Corvalan, P. Wang, C. M.-N. Roy, and C. G. Davis (1999) Fully human anti-interleukin-8 monoclonal antibodies: potential therapeutics for the treatment of inflammatory diseases stages. *J. Leukoc. Biol.* 66: 401-410.
- Maheshwari, G., A. Wells, L. G. Griffith, and D. A. Lauffenburger (1999) Biophysical integration of effects of epidermal growth factor and fibronectin on fibroblast migration. *Biophys. J.* 76: 2814-2823.
- Condeelis, J. S., J. B. Wyckoff, M. Bailly, R. Pestell, D. Lawrence, J. Backer, and J. E. Segall (2001) Lamellipodia in invasion. *Semin. Cancer Biol.* 11: 119-128.
- Wells, A., J. Kassis, J. Solava, T. Turner, and D. A. Lauffenburger (2002) Growth factor-induced cell motility in tumor invasion. *Acta Oncol.* 41: 124-130.
- Boyden S. (1962) The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.* 115: 453-466.

22. Zigmond, S. H. (1977) Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. *J. Cell Biol.* 75: 606-616.
23. Zicha, D., G. A. Dunn, and A. F. Brown (1991) A new direct-viewing chemotaxis chamber. *J. Cell Sci.* 99: 769-775.
24. Nelson, R. D., P. G. Quie, and R. L. Simmons (1975) Chemotaxis under agarose: a new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J. Immunol.* 115: 1650-1656.
25. Gerisch, G. and H. U. Keller (1981) Chemotactic reorientation of granulocytes stimulated with micropipettes containing fMet-Leu-Phe. *J. Cell Sci.* 52: 1-10.
26. Jeon, N. L., H. Baskaran, S. K. W. Dertinger, G. M. Whitesides, L. Van De Water, and M. Toner (2002) Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device. *Nat. Biotechnol.* 20: 826-830.
27. Walker, G. M., J. Sai, A. Richmond, M. Stremler, C. Y. Chung, and J. P. Wikswo (2005) Effects of flow and diffusion on chemotaxis studies in a microfabricated gradient generator. *Lab. Chip* 5: 611-618.
28. Lin, F., W. Saadi, S. W. Rhee, S. J. Wang, S. Mittal, and N. L. Jeon (2004) Generation of dynamic temporal and spatial concentration gradients using microfluidic devices. *Lab. Chip* 4: 164-167.
29. Saadi, W., S. W. Rhee, F. Lin, B. G. Chung, and N. L. Jeon (2007) Generation of stable concentration gradients in 2D and 3D environments using a microfluidic diffusion chamber. *Biomed. Microdevices* 9: 627-635.
30. Keenan, T. M. and A. Folch (2008) Biomolecular gradients in cell culture systems. *Lab. Chip* 8: 34-57.
31. Fenniri, H. and R. Alvarez-Puebla (2007) High-throughput screening flows along. *Nat. Chem. Biol.* 3: 247-249.
32. El-Ali, J., P. K. Sorger, and K. F. Jensen (2006) Cells on chips. *Nature* 442: 403-411.
33. Yager, P., T. Edwards, E. Fu, K. Helton, K. Nelson, M. R. Tam, and B. H. Weigl (2006) Microfluidic diagnostic technologies for global public health. *Nature* 442: 412-418.
34. Huh, D., K. L. Mills, X. Zhu, M. A. Burns, M. D. Thouless, and S. Takayama (2007) Tuneable elastomeric nanochannels for nanofluidic manipulation. *Nat. Mater.* 6: 424-428.
35. Dittrich, P. S. and A. Manz (2006) Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery. *Nat. Rev.* 5: 210-218.
36. Lee, P. J., P. J. Hung, V. M. Rao, and L. P. Lee (2006) Nanoliter scale microbioreactor array for quantitative cell biology. *Biotechnol. Bioeng.* 94: 5-14.
37. Liu, S., J. Rao, X. Sui, P. Cool, E. F. Vansant, G. Van Tendeloo, and X. Cheng (2008) Preparation of hollow silica spheres with different mesostructures. *J. Non-Crystalline Solids* 354: 826-830.
38. Wen, L.-X., Z.-Z. Li, H.-K. Zou, A.-Q. Liu, and J.-F. Chen (2005) Controlled release of avermectin from porous hollow silica nanoparticles. *Pest Manag. Sci.* 61: 583-590.