

# 마이크로 미세유체칩을 이용한 줄기 세포 연구

이 글에서는 줄기세포 연구의 중요성과 마이크로 미세유체칩에서 줄기세포의 거동을 연구한 선행 연구 사례들을 소개하고자 한다.

**이 종 민** 한양대학교 바이오토포노학과, 석사과정  
**Gulfam Muhammad**(굴팜 무하메드) 한양대학교 바이오토포노학과, 석사과정  
**정 봉 근** 한양대학교 생명나노공학과, 조교수

e-mail : caboera85@naver.com  
e-mail : gulf1777@yahoo.com  
e-mail : bchung@hanyang.ac.kr

줄기세포는 개체를 구성하는 세포나 조직의 근간이 되며, 또한 다양한 화학적, 기계적, 물리적 요소에 인해서 증식(proliferation), 분화(differentiation), 이동(migration), 사멸(apoptosis) 할 수 있는 세포로, 자가 재생산을 할 수 있고, 환경에 따라 특정한 기능을 지닌 세포로 분화할 수 있는 잠재력을 지닌 세포이다 (Gardner RL 등, *C R Biol* 2007, 330: 465-473 논문에서 인용). 줄기세포의 자가 재생산 능력과 다 분화성은 사람의 발생과정의 연구를 위한 좋은 모델을 제공해줄 뿐만 아니라, 신약 개발에도 중요하게 활용될 수 있다. 줄기세포는 크게 성체 줄기세포(adult stem cell)와 배아 줄기세포(embryonic stem cell) 등 두 종류로 나눌 수 있다. 성체 줄기세포는 일반적으로 신체 조직에 어떤 손상이 발생하면 다른 장기에 있던 줄기세포가 손상된 조직으로 변하는 분화의 유연성을 가지고 있으며, 주입된 몸 안에서 자가 재생산을 할 수 있으며 면역성에 안전성을 가지고 있다. 하지만 얻을 수 있는 줄기세포의 수가 적다는 단점이 있다. 반면에, 인간의 배아를 이용한 배아 줄기세포는 인체를 이루는 모든 세포의 분화능력을 가지고 있다. 배아 줄기세포는 질병의 치료제, 신약의 독성검사 등 다양한 연구에 이용될 수 있지만, 배아 줄기세포 확보에 따른 윤리적 문제가 남아 있다(Tuch BE 등, *Aust Fam Physician* 2006, 35(9): 719-721 논문에서 인용). 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위하여 최근 유도 만능 줄기세포(induced

pluripotent stem cell)에 대한 연구도 활발하게 진행되고 있다. 2006년 일본 연구팀에 의해서 만들어진 유도 만능 줄기세포는 배아 줄기세포 특징과 많은 유사성을 가지고 있고, 피부조직과 같은 성체세포를 활용하므로 생명윤리 논란으로부터 문제가 되지 않는 등의 장점들을 지니고 있다(Brambrink T 등, *Cell Stem Cell* 2008, 2(2): 151-159 논문에서 인용). 또한, 면역 거부반응이 없는 자신의 세포로 줄기세포를 만들어 심장, 혈관, 신경세포 등으로 분화시켜 자가 세포치료를 가능하게 할 수 있는 잠재력을 가지고 있다. 하지만, 줄기세포의 뛰어난 세포치료 효능에도 불구하고 기존의 세포 배양 방법으로는 줄기세포의 성장과 분화조건을 최적화하는 데 많은 제약들이 있다.

이러한 문제점들을 극복하기 위해서 반도체 제조 공정의 미세가공 기술(microelectromechanical systems)을 이용하여 인체 내 조건과 유사한 새로운 형태의 세포 및 조직 배양 연구를 할 수 있다. 미세가공 기술을 이용한 랩온어칩 기술은 초소형 칩에서 여러 가지 실험조건들을 하나의 마이크로칩 안에서 실행하는 것으로 칩 위의 실험실을 말한다. 최근에 반도체 제조 기술인 포토리소그래피(photolithography)와 소프트 리소그래피(soft lithography) 기술을 이용하여 마이크로 미세유체칩을 만들어 줄기세포의 증식과 분화연구가 많이 진행되어 왔다. 이렇게 만든 마이크로 미세유체칩은 생체에 적합하며, 적은 양의 미디어와 세포를

표 1 마이크로 기술을 이용한 줄기세포 연구 동향

기술	연구동향	참고문헌
유체제어 마이크로 미세유체칩	조혈 줄기세포의 분류, 격리를 위한 마이크로 미세유체 칩 개발	Wu HW 등, <i>Biomicrofluidics</i> 2010, 4, 024112
	밸브 시스템을 이용하여 3차원 환경에서 배아 줄기세포 연구	Lii J 등, <i>Anal Chem</i> 2008, 80(10):3640-3647
	대수범위로 유체를 조절하여 가용성 환경에서 유체의 흐름, 시약농도, 세포밀도에 따른 배아 줄기세포 연구	Kim L 등, <i>Lab Chip</i> 2006 6(3):394-406
	간엽 줄기세포 연구를 위한 자동화된 미세유체 배양 시스템 개발	Gomez-Sjoberg R 등, <i>Anal Chem</i> 2007, 79(22):8557-8563
	미세유체 디바이스에서 인간 배아 줄기세포 콜로니(colony)를 배양하는 기술 개발	Villa-Diaz LG 등, <i>Lab Chip</i> 2009, 9(12): 1749-1755
	마이크로 미세유체 트랩 시스템을 이용하여 배아 줄기세포를 어그리게이트(aggre-gated)된 상태로 배양하는 기술 개발	Khoury M 등, <i>Biomed Microdevices</i> 2010, DOI: 10.1007/s10544-010-9454-x
	배아체의 분화를 조절하기 위한 플랫폼 개발	Fung WT 등, <i>Lab Chip</i> 2009, 9(17):2591-2595
	미세유체칩 안에서 패터닝된 간엽 줄기세포가 지방세포와 골형성 세포로 분화하는 시스템 개발	Tenstad E 등, <i>Lab Chip</i> 2010, 10, 1401-1409
	유전영동 시스템을 이용하여 줄기세포의 분류를 연구	Flanagan LA 등, <i>Stem Cells</i> 2008, 26(3):656-665
	균일하지 않은 크기의 배아체를 분류할 수 있는 마이크로 미세유체칩 개발	Lillehoj PB 등, <i>Lab Chip</i> 2010, 10(13): 1678-1682
농도구배 마이크로 미세유체칩	배아 줄기세포 연구를 위한 미세유체칩안에서 전기 구동에 의해서 작동되는 하이드로젤 시스템 개발	Kwon GH 등, <i>Lab Chip</i> 2010, 10(12): 1604-1610
	뇌 줄기세포 성장과 분화연구	Chung BG 등, <i>Lab Chip</i> 2005, 5(4):401-406
	진공채널을 이용한 마이크로칩안에서 뇌 줄기세포의 성장과 사멸연구	Chung BG 등, <i>BMC Biotechnol</i> 2007, 7:60
마이크로 어레이칩	배아 줄기세포에서 심장세포와 혈관 내피세포로의 분화 연구	Hwang YS 등, <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> , 2009, 106(40):16978-16983
	오목한 마이크로웰 어레이를 이용하여 배아 줄기세포에서 심장세포와 뇌세포로의 분화연구	Choi YY 등, <i>Biomaterials</i> 2010, 31(15):4296-4303

사용하여 시간과 비용 면에서 효율적이며 또한 안정하면서도 다양한 형태의 농도구배(concentration gradient)를 생성할 수 있고, 실시간으로 세포를 관찰할 수 있는 등의 많은 장점들을 가지고 있기 때문에 줄기세포의 성장과 분화를 관찰하기에 적합한 특징을 가지고 있다. 이에 마이크로 기술을 이용하여 줄기세포의 거동을 조사한 선행 연구들을 소개하고자 한다.(표 1)

### 마이크로 미세유체칩을 이용한 줄기세포 선행 연구들

**유체의 흐름 제어를 이용한 마이크로 미세유체칩**  
미세유체 시스템은 원하는 방향, 속도로 유체를 조절할 수 있기 때문에 유체 흐름의 제어를 통해 다양한 줄기세포의 미세환경을 연구할 수 있다. 마이크로 미세유체 시스템 중에서도 마이크로 밸브는 유체의 흐름을 조절하는 데 많이 사용되고 있다. 이러한 미세유체 밸브 시스템은 줄기세포 연구에도 사용되었다. 칩 위에서 조혈 줄기세포(hematopoietic stem cell)의 세포 분류와 격리를 위한 미세유체칩 시스템이 개발되었다(Wu HW 등, *Biomicrofluidics* 2010, 4, 024112 논문에서 인용). 전자기적 마이크로 밸브 원리를 활용

하여 칩 위에서 세 가지 기능을 갖는 모듈을 만들었다. 세포 격리 모듈은 로딩/믹싱 챔버와 네 개의 멤브레인 타입의 마이크로 믹서, 세척 완충제 로딩 챔버 공간으로 구성되어 있으며 조혈 줄기세포의 격리는 각각의 모듈 안에서 밸브에 의해 진행되었으며, 기존의 시스템보다 훨씬 더 빠른 속도로 짧은 시간 안에 세포의 분류와 격리를 진행할 수 있었다. 또한, 3차원 환경에서 배아 줄기세포 연구를 위한 마이크로 미세유체칩이 개발되었다 (Lii J 등, *Anal Chem* 2008, 80(10): 3640-3647 논문에서 인용). 밸브는 3차원 환경의 챔버에 시약의 흐름을 선택적으로 조절할 수 있을 뿐만 아니라 인접한 챔버 사이의 확산 경로도 조절할 수 있기 때문에, 3차원 환경에서 공압의 마이크로 밸브를 이용하여 세포의 거동 연구를 할 수 있다. 세포외기질(extracellular matrix)로 세포를 밀폐(encapsulation)하여 로딩한 뒤에, 유체가 흐르는 층으로 시약의 확산을 가능하게 해주고, 유체를 조절하는 층으로 챔버와 챔버 간의 연결을 조절하여 배양하였다. 이러한 연구는 고속탐색(highthroughput screening), 단일세포 분석 등 3차원 환경에서 세포의

환경을 연구하는 데 사용될 수 있다. 3차원 구조는 기존의 방법보다 인체 내 *in vivo* 환경을 모사할 수 있으며 이러한 연구는 체내에 실제적으로 일어나는 생리학적 분석을 위하여 사용될 수 있다. 또한 줄기세포의 특별한 유전체 특성(dielectric property)에 따라서 분화된 세포 (differentiated progeny)를 분류하는 연구가 진행되었다(Flanagan LA 등, *Stem Cells* 2008, 26(3): 656-665 논문에서 인용). 줄기세포 분류에 많이 사용되고 있는 형광 활성화세포분류기 (fluorescence-activated cell sorting)는 세포 표면 단백질에 의존한다는 단점들이 있다. 이러한 단점을 보완하기 위해, 특정한 마커의 식별에 덜 의존할 수 있는 유전영동(dielectrophoresis) 시스템이 개발되었다. 또한, 실험을 통해 뇌 줄기세포(neural stem cell)의 숫자와 분화된 신경세포와 성상세포가 유전영동에 의해 다른 유전 특성을 드러냈다는 것을 보여 주었다. 이러한 연구를 통해 유전영동 시스템이 줄기세포의 분류와 특성을 연구하기 위한 도구로 사용될 수 있음을 증명하였다.

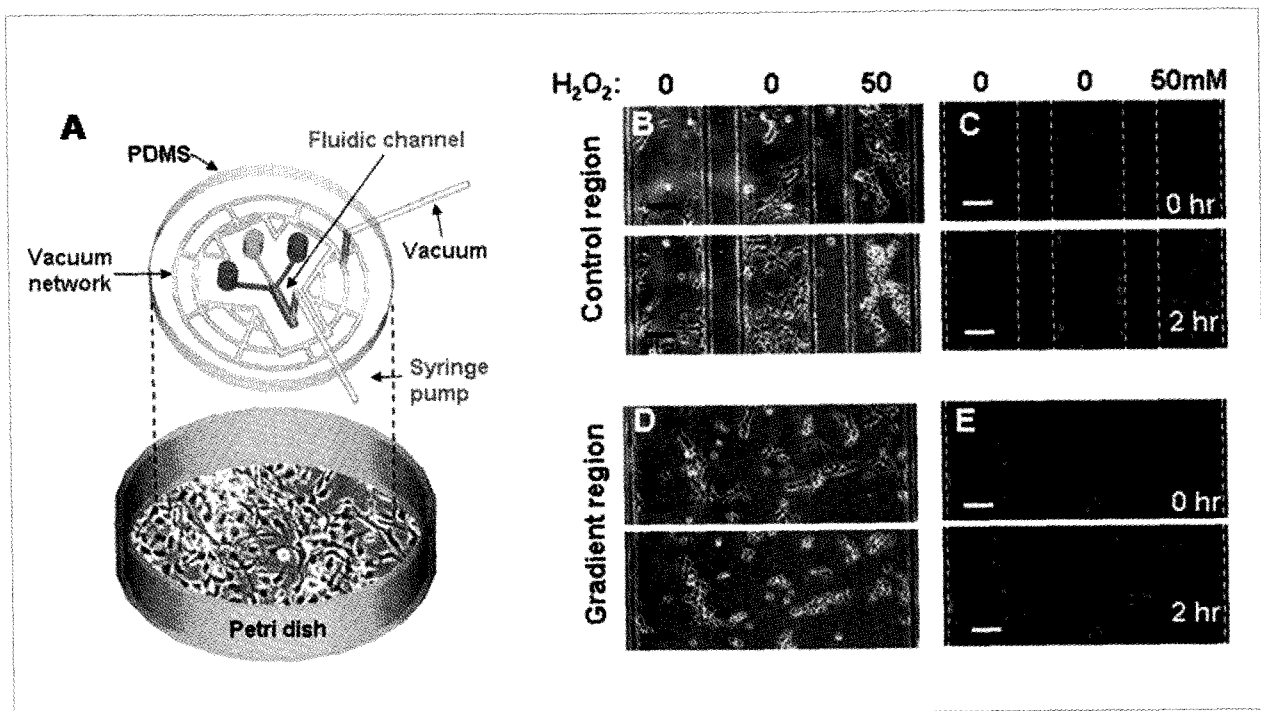


그림 1 진공채널(vacuum network channel)을 이용한 미세유체칩 안에서 뇌 줄기세포 성장과 사멸 연구. (A) 진공채널을 가지는 미세유체칩의 디자인. (Fluidic channel: 미세유체채널, vacuum network: 진공채널, syringe pump: 펌프, PDMS: poly(dimethylsiloxane) 생체친화형 폴리머, Petri dish: 세포배양용 접시). (B-C) 컨트롤 채널 안에서 뇌 줄기세포의 성장과 사멸 사진. (D-E) 과산화수소( $H_2O_2$ ) 농도구배에 따른 뇌 줄기세포의 사멸 사진(과산화수소에 의해서 사멸한 줄기세포는 빨간색으로 염색되었음). (Control region: 컨트롤 채널영역, gradient region: 농도구배 채널영역). (Chung BG 등, *BMC Biotechnol* 2007, 7:60 논문에서 인용함).

농도 구배를 이용한 마이크로 미세유체칩

마이크로 미세유체칩은 낮은 레이놀즈 수 (Reynolds number)를 가지므로, 일반적으로 칩 안에서 층류(laminar flow) 형태의 유체흐름을 가지며, 연속흐름을 통해 농도구배와 같은 마이크로 환경을 조성해 줄 수 있다. 최근에 이러한 마이크로 미세유체 농도구배기술을 이용한 줄기세포의 성장, 분화, 그리고 사멸에 관한 연구가 많이 진행되었다. 예를 들면, 미세유체칩을 사용하여 신경 줄기세포를 일주일 동안 배양하면서 세포의 성장과 분화를 확인해 보았다(Chung BG 등, *Lab Chip* 2005, 5(4): 401-406 논문에서 인용). 신경 줄기세포는 뇌 중추 신경계에서 신경세포(neuron), 성상세포(astrocyte), 희소돌기아교세포(oligodendrocyte)로 분화하는데, 줄기세포의 성장과 성상세포로의 분화를 최적화하기 위하여 세 가지 성장인자(epidermal growth factor, fibroblast growth factor 2, platelet-derived growth factor)들의 농도구배를 미세유체칩 안에서 생성했으며, 실시간 현미경으로 줄기세포 성장과 면역세포화학(immunocytochemistry) 방법에 의하여 성상세포로의 분화를 확인해 보았다. 세포 성장과 분화의 정량분석 결과에 의하면 신경 줄기세포는 성장 인자의 농도 증가에 비례해서 성장했지만, 성상세포로의 분화는 농도 증가에 반비례해서 증가하였다. 이러한 결과를 바탕으로 추후 분화과정과 관련한 생리, 생화학적인 줄기세포의 연구에 활용 가능성을 확인하였다. 또한, 진공(vacuum) 채널을 이용하여 배양되고 있는 뇌 줄기세포에 직접 미세유체칩을 얹어서 농도구배에 따른 뇌 줄기세포의 거동을 연구하였다(Chung BG 등, *BMC Biotechnol* 2007, 7:60 논문에서 인용)(그림 1). 미세유체 채널과 진공채널이 혼합된 디바이스를 디자인하였으며, 이렇게 만든 디바이스는 세포에 기반한 실험에서 장치 설정이 비교적 간단하고 줄기세포처럼 민감한 세포를 배양하는 데 상당히 유리하다. 또한, 과산화수소( $H_2O_2$ ) 농도 구배에 따른 뇌 줄기세포의 성장과 사멸을 실시간으로 모니터링하였다. 세포사멸을 일으키는 빠른 유도물질인 과산화수소 농도구배를 확인한 결과 농도구배가 세포의 사

멸에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 실험을 통해, 뇌 줄기세포 성장과 사멸 연구 등을 위한 농도구배 형성 디바이스를 개발하였다.

마이크로 어레이칩을 이용한 줄기세포 선행 연구들

마이크로 미세유체칩 기술뿐만 아니라 마이크로 어레이칩을 이용하여 줄기세포를 연구할 수 있다. 마이크로 어레이칩은 마이크로 미세유체칩과 비교했을 때 줄기세포의 크기를 균일하게 조절할 수 있고, 수확(harvest)도 가능하다는 장점을 가지고 있다. 예를 들면, 생체에 적합한 하이드로젤(poly(ethylene glycol))을 이용하여 마이크로 웰어레이를 만들어 배아 줄기세포의 분화 과정에 대한 연구를 진행하였다(Hwang YS 등, *Proc Natl Acad Sci* 2009, 106(40): 16978-16983 논문에서 인용). 배아 줄기세포의 분화 과정 중에 분화를 유도할 때는 배아체(embryoid body)를 형성함으로써 특정세포로 분화를 유도하는데 일반적으로 배아체의 배양기간에 따라 배아 줄기세포에서 특정 세포계열로의 분화를 조절할 수 있다. 그래서 소프트 리소그래피 공정으로 하이드로젤을 이용하여 마이크로웰 어레이를 만들고 배아체의 크기를 각각 150 $\mu$ m, 300 $\mu$ m, 450 $\mu$ m 사이즈로 각각 만듦으로써 배아체의 크기에 따라 배아 줄기세포가 어떻게 분화하는지를 관찰해 보았다. 그 결과 배아체의 크기가 작으면 내피세포(endothelial cell lineage)로 분화되었고, 배아체의 크기가 크면 심장세포(cardiac lineage)로 분화가 유도되었다. 또한 배아체 크기에 따라 세포의 분화에 영향을 미치는 특정 단백질의 발현이 상대적으로 조절되는 것을 확인하여 결과적으로 배아 줄기세포의 분화가 조절된다는 것을 확인하였다.

결론적으로, 이 글에서는 줄기세포의 성장과 분화연구를 위한 다양한 마이크로 기술들을 살펴보았다(표 1). 지금까지는 마이크로 기술들이 줄기세포 연구에 많이 사용되었지만, 앞으로는 줄기 세포의 분화 조건들을 정밀하게 최적화하고 세포 치료에 활용하기 위해서는 나노 기술들을 미세 유체칩 안에서 활용해야 할 것으로 기대된다.