



THEME 05

세포간 상호작용 제어를 위한 세포 패터닝 기술

한 태 현 | 인하대학교 기계공학부, 박사과정

이 인 수 | 인하대학교 기계공학부, 학사과정

강 석 호 | 인하대학교 기계공학부, 학사과정

김 선 민 | 인하대학교 기계공학부, 교수 | e-mail : sunmk@inha.ac.kr

이 글에서는 체외에서 세포 공동배양을 통하여 세포간 상호작용을 제어할 수 있는 세포의 표면 패터닝 기술에 대하여 소개한다.

생물학적 시스템에서 세포간 상호작용(cell-cell interaction)은 생체 항상성 유지 기능뿐만 아니라, 조직 교체를 위한 외부 조직 생성과 체내의 재생 과정을 위해 매우 중요하다. 체내에서 다양한 세포간 다이나믹한 상호작용은 유전자 발현, 증식, 이동, 분화와 같은 세포의 행동을 조절한다. 따라서 이종 이상의 세포 공동배양은 생체내(in vivo) 미세환경의 복잡성과 장기를 보다 잘 모방하기 위해 사용된다.

기존에는 조직배양 기질(substrate)에 여러 종류의 세포를 무작위로 배양하여 생체외(in vitro) 세포간 상호작용을 연구하였으나, 이 방법은 homotypic(동종 세포간 접촉)과 heterotypic(이종 세포간 접촉)의 세포간 상호작용 정도를 제어하기 어렵다. 이러한 제한을 극복하기 위해 미세공학 및 재료공학에 기반한 다양한 패터닝 공동배양 기술이 발전되고 있다.

패터닝 공동배양 기술은 다양한 방법으로 연구되고 있으며, 이러한 기술들은 크게 네 가지 범주로 분류될 수 있다. 첫 번째 방법은 세포를 미세패터닝 기질이나 영역에 선택적으로 부착시키는 것이다. 두 번째 방법은 기질 위에 세포와 단백질을 정렬하기 위해 미세유체 채널 내의 유체흐름을 이용하는 것이다. 세 번째

방법은 세포를 기질의 특정 영역으로 제한시키기 위해 스텐실(stencil) 기반의 패터닝을 이용하는 것이다. 마지막 방법은 특정 자극(전위, 온도, 빛)에 의해 세포 발달성에서 부착성으로 바뀔 수 있는 미세패터닝된 표면을 이용하는 것이다.

이 글에서는 위에서 언급한 패터닝된 공동배양 방법을 자세히 살펴볼 것이다.

미세패터닝된 기질에 세포의 선택적 부착

이 방법에서는 미세패터닝된 세포배양 기질 표면의 전기화학적 특성, 친수성, 구조를 포함하는 다양한 표면 특성에 의해 특정 영역에 특정 세포를 선택적으로 부착시킨다. 서로 다른 종류의 세포들은 인테그린(integrin)과 카데린(cadherin)과 같은 다양한 부착 분자의 발현(expression) 정도에 따라 다양한 기질에서 다른 정도의 부착성을 가진다. 이러한 차이를 통해 여러 종류의 세포를 미세패터닝된 기질의 특정 영역으로 세포 부착을 제한하는 것이 가능하다. 예를 들면, 여러 종류의 세포를 특정 영역으로 제한시키는 2차원, 비등방성 표면의 생성을 위한 미세패터닝 기법이 구

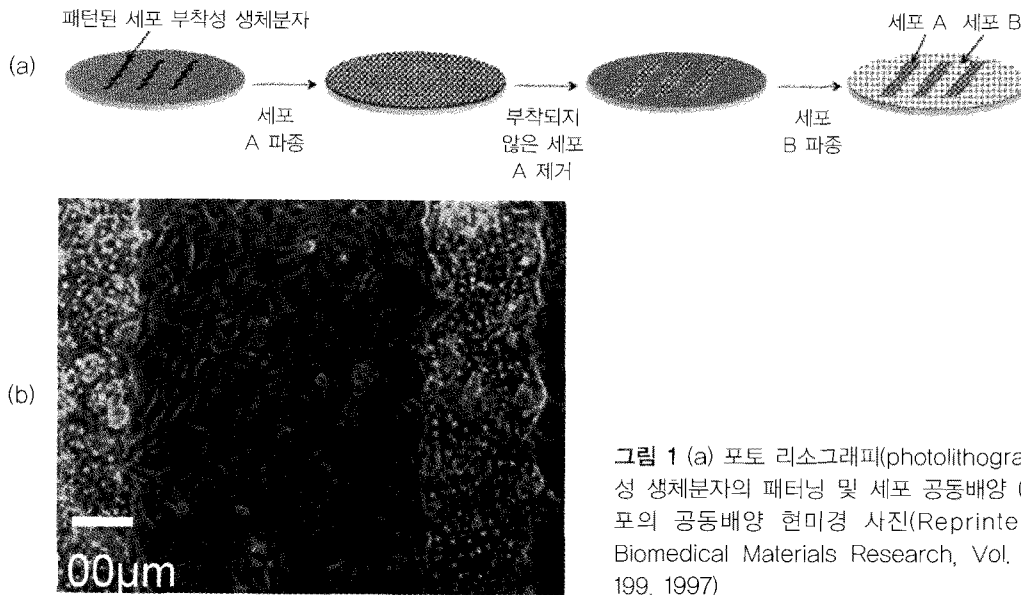


그림 1 (a) 포토 리소그래피(photolithography)에 의한 세포 부착성 생체분자의 패터닝 및 세포 공동배양 (b) 간세포와 섬유아 세포의 공동배양 현미경 사진(Reprinted from Journal of Biomedical Materials Research, Vol. 34, No. 2, pp. 189-199, 1997)

현되었다. 그림 1(a)는 미세패턴된 공동배양을 제작하는 과정의 개략도이다. 이러한 방법에서 미세패턴된 부착성 생체분자(e.g. 콜라겐)는 첫 번째 세포의 부착력에 영향을 준다. 예를 들어, 콜라겐이 미세패턴된 영역에 간세포가 선택적으로 부착되게 되고, 이후 두 번째 세포(섬유아세포: fibroblast)는 첫 번째 세포가 부착하지 않은 영역에 부착된다. 이러한 기술을 이용하여, 간 기능을 유지하는 쥐의 간세포와 섬유아세포의 세포간 상호작용은 세포간 접촉에서 중요한 생물학적 이해를 주는 것으로 조사되었다.(그림 1(a))

이 방법은 포토 리소그래피(photolithography), 소프트 리소그래피(soft lithography), 미세접촉 인쇄(microcontact printing)와 같은 기술로 쉽게 구현할 수 있다. 그렇지만 본 기술은 세포 종류에 따라 세포간 그리고 세포-기질간 상대적인 부착력에 큰 영향을 받는다. 예를 들어 처음으로 파종된 세포는 기질 물질로 미처리된 영역에 약하게 부착되지만 패터닝된 지역에 강하게 부착되어야 하며, 두 번째 세포는 기질의 미처리된 영역에 잘 부착되어야 한다. 따라서 이러한 배양

방법은 패터닝 재료의 선택뿐만 아니라 세포를 파종하는 순서에 제약을 받게 된다.

미세유체시스템을 이용한 세포의 공동배양

미세채널 내에서의 유체흐름을 이용하여 세포와 기질물질을 배양표면에 선택적으로 패터닝할 수 있다. 미세유체 채널에서 유체흐름은 낮은 레이놀즈 수이기 때문에 두 개 이상의 층류가 평행하게 형성된다. 이러한 층류는 미세채널 내에서 세포와 미세환경의 공간 패터닝을 가능하게 한다. 그림 2는 PDMS(poly dimethylsiloxane)로 제작된 미세채널에서 유체흐름을 이용하여 두 종류의 세포를 패터닝하는 기술을 보여준다. 첫 번째 세포인 적혈구(erythrocyte)가 입구 1과 3에 흐르게 하고, 입구 2에 완충액(buffer)을 흐르게 하면, 유체흐름은 채널의 바깥쪽에 세포 패턴을 형성하게 한다. 다음으로 공동배양 패터닝을 위해 채널에 두 번째 세포인 대장균(E. coli)이 입구 2에 흐르게 하고, 입구 1과 3에 완충액을 흐르게 한다. 이를 통해 이미

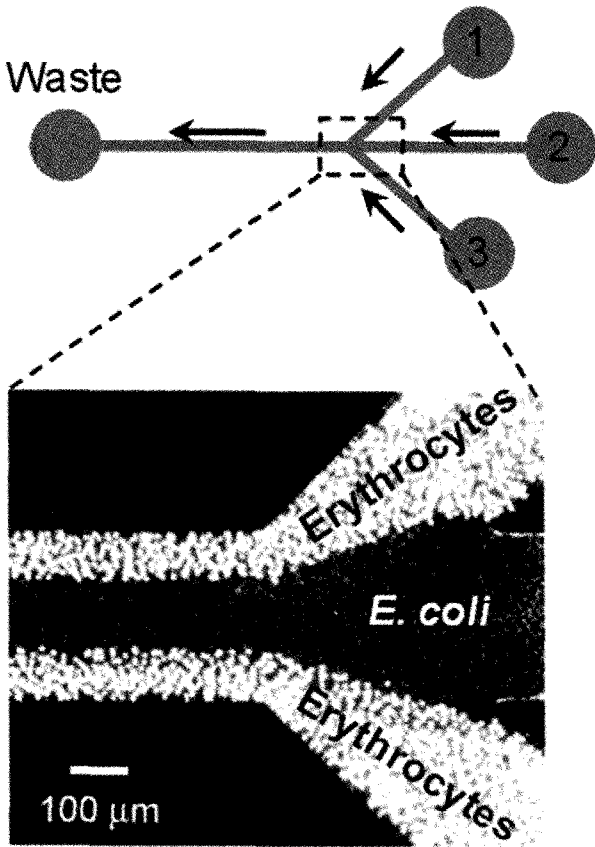


그림 2 미세유체 채널을 이용한 미세패턴 공동배양. (Reprinted from Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 96, No. 10, pp. 5545-5548, 1999)

패터닝된 적혈구 사이에 대장균을 패터닝한다. 이 과정에서 각 세포 패턴의 폭은 세포와 완충액의 상대적인 체적유량을 조정하여 쉽게 제어할 수 있다. 그렇지만 이 방법은 다양한 형상을 얻을 수 없고, 평행한 선 형태의 패턴만을 얻을 수 있는 단점이 있다.

스텐실 기법을 이용한 패터닝

공동배양을 패터닝하기 위한 세 번째는 가역접합이 가능한 스텐실을 이용한 방법이다. 이 방법은 특정 부분에 세포를 파종하기 위해 폴리머 스텐실이 사용된

다. 폴리머 스텐실은 세포 및 생체분자들이 기질에 직접적으로 부착할 수 있는 미세구조로 제작된다. 폴리머 스텐실의 대표적인 예는 감광제(photoresist)로 만들어진 마이크로 포스트가 존재하는 실리콘 웨이퍼(Si wafer)에 PDMS 고분자를 스핀코팅(spin coating)하여 PDMS 멤브레인을 제작한다. 이후 경화된 PDMS를 웨이퍼에서 제거하면, PDMS 멤브레인은 마이크로 포스트에 의해 패터닝된 홀(hole)을 가지게 되고, 이러한 PDMS 멤브레인이 스텐실로 사용된다. 그림 3(a)는 PDMS 스텐실을 이용한 패터닝 기법을 보여준다. 세포 패턴을 만들기 위해, 세포 부착 기질물질인 fibronectin이나 젤라틴(gelatin)을 스텐실의 패터닝된 홀에 부착시킨 후, 첫 번째 세포를 파종한다. 이후 스텐실을 제거(lift-off)하여 패터닝된 세포영역을 생성시킨다. 이후 두 번째 세포를 나머지 부분에 파종하여 이중세포의 공동배양을 형성할 수 있다. 이와 같이 스텐실을 반복적으로 사용하여 여러 종류의 세포부착 기질물질과 세포를 패터닝할 수 있다.

PDMS 스텐실은 고가의 미세제작 설비없이 쉽게 제작할 수 있으며, 간단한 복제 과정을 통해 같은 형상으로 다수의 PDMS 막을 얻을 수 있다. 또한 다층의 PDMS 스텐실을 이용하여 3차원 구조의 세포배양 환경을 구축할 수 있다. 그러나 얇은 PDMS 막의 낮은 내구성 때문에 대면적의 패터닝에 활용하기 어려운 점이 있다. 따라서 기계적으로 안정적인 물성치를 가지는 스텐실 재료의 개선이 필요하다. 이를 위해 최근에는 세포, 단백질, 항체를 미세패터닝하기 위해 Parylene 고분자 멤브레인이 이용되고 있다(그림 3(b)). Parylene 멤브레인은 PDMS 멤브레인보다 기계적인 강도가 높기 때문에 파손 없이 표면으로의 탈/부착이 용이하며 소수성 표면에 대해 반복적인 결합이 가능하다. 그러나 Parylene 멤브레인의 제작 공정은 PDMS 멤브레인 공정보다 더 많은 공정단계 및 전문 장비가 필요한 단점이 있다.

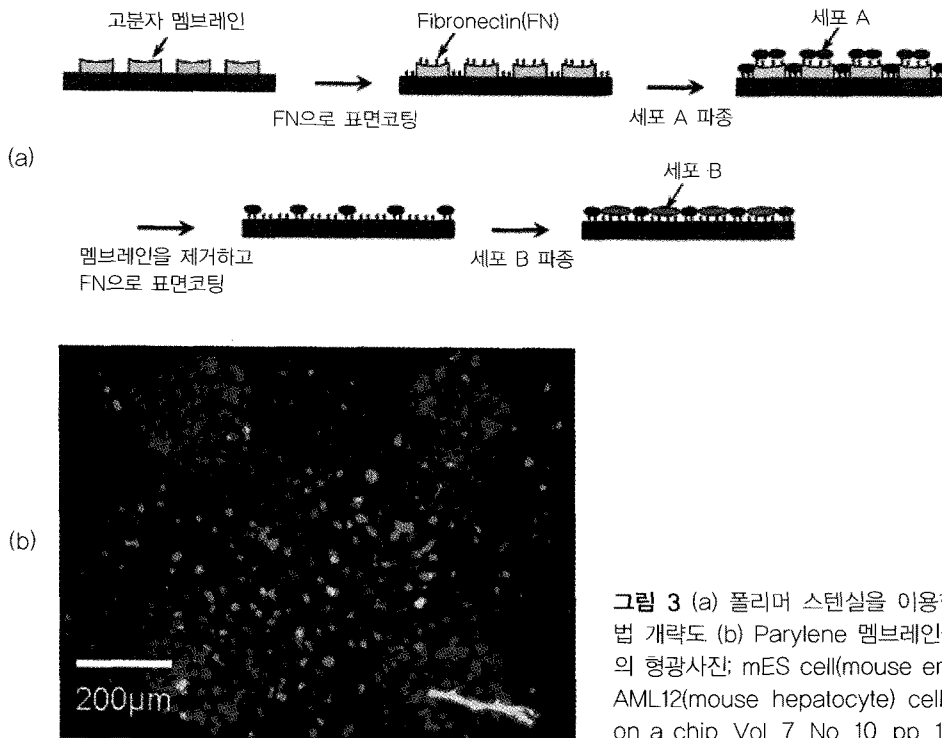


그림 3 (a) 폴리머 스텐실을 이용한 미세패턴된 세포 공동배양방법 개략도 (b) Parylene 멤브레인을 이용하여 공동배양된 세포들의 형광사진; mES cell(mouse embryonic stem cell)은 붉은색, AML12(mouse hepatocyte) cell은 녹색.(Reprinted from Lab on a chip, Vol. 7, No. 10, pp. 1272-1279, 2007)

세포 부착성/반발성을 제어할 수 있는 표면을 이용한 미세패터닝

이러한 방법은 전위, 온도 및 빛과 같이 특정한 자극에 의해 세포 반발성/부착성이 제어될 수 있는 다양한 고분자 물질로 처리된 세포배양 표면을 이용한다.

그림 4(a)는 이러한 방법의 개략도로써 우선 세포배양표면에 세포부착 기질물질과 부착성 제어가 가능한 고분자 물질(비활성상태: 세포 부착에 반발)을 미세접촉 인쇄 등의 방법으로 패터닝한다. 이후 첫 번째 세포를 파종한 후 다양한 자극을 통해 고분자 물질을 활성상태(세포부착)로 변환시키고, 두 번째 세포를 파종하여 패터닝된 세포 공동배양을 얻을 수 있다.

전기적으로 활성화(electroactive)될 수 있는 금 표면에 미세접촉 인쇄법으로 패터닝된 PEG(polyethylene glycol)를 이용하는 세포패터닝 기술, 온도

변화에 따라 세포 반발성에서 부착성으로 물성치를 변화할 수 있는 열반응성(thermo-responsive) 고분자 PIPAAm(poly(N-isopropylacrylamide))을 사용하는 패터닝 기술이 제시되었다. 이 기법들의 장점은 기질의 물성치를 변화시킬 수 있기 때문에, 세포 종류에 상관없이 파종 순서에 독립적인 공동배양 패턴을 만들 수 있다.

맺음말

세포 사이의 상호작용을 이해하고 조절하는 기술은 조직공학, 신약 개발, 진단과 같은 다양한 생체의학 분야에서 중요하다. 생체 외에서 인체조직을 모방하기 위하여 여러 가지 세포를 공동배양하는 생체 내 환경 모사는 매우 중요하며, 이를 위한 다양한 접근법을 제시하였다. 세포 공동배양을 위한 미세패터닝 방법은

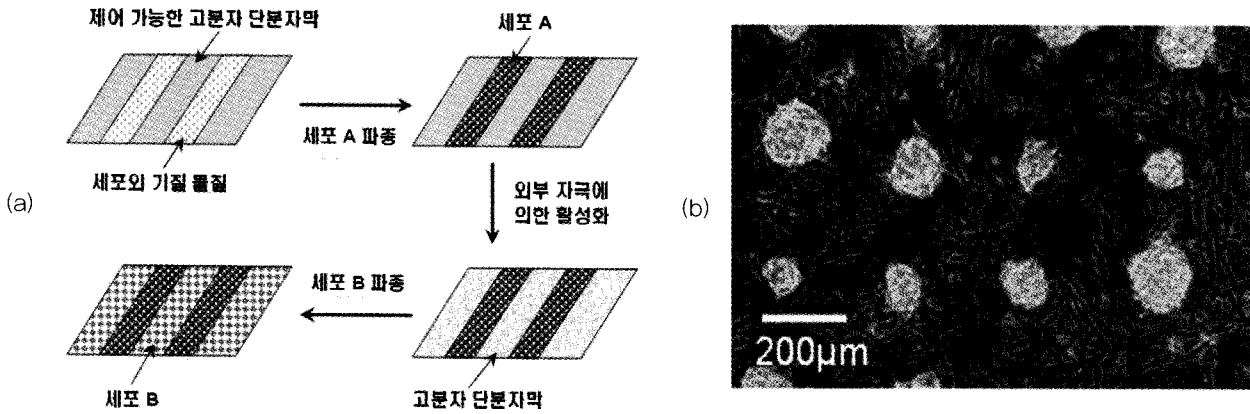


그림 4 (a) 외부 자극에 의해 세포부착성을 제어할 수 있는 고분자 물질을 이용한 세포 공동배양 방법의 개략도 (b) 섬유아 세포 (어두운 영역)와 ES cell(밝은 영역)을 공동배양한 현미경 사진(Reprinted from Biomaterials, Vol. 25, No. 17, pp. 3583-3592, 2004)

패터닝 재료, 패터닝 기질의 표면 화학, 미세제작 방법에 의해 결정된다. 일반적으로 미세패터닝 방법은 정적이며 2차원 기질을 제공하지만, 실제 조직과 장기의 세포는 동적이며 3차원 환경에 있다. 최근에는 다양한 미세제작 및 패터닝 기법을 이용하여 동적 공동배양 시스템과 하이드로젤(hydrogel)을 이용한 3차원 공동

배양 구조물 제작 방법이 개발되고 있다. 그러나 이러한 시스템은 생체재료(biomaterial)와 패터닝 기술 분야에서 아직 초기 단계에 있으며, 새로운 생체재료의 개발과 미세공정의 신기술은 세포, 조직, 장기 모사 등에 필수적인 요소이므로 지속적인 연구개발이 요구된다.



기계 용어해설

공행정(Non-cutting Stroke)

슬로터나 평삭기 등의 공작기계에서 절삭행정에 대하여 귀환행정에서는 절삭을 하지 않는 것.

무복수기기관(無復水器機關: Non-condensing Engine)

사용이 끝난 증기를 공장이나 대기 속에 내보내는 등 복수기를 갖추지 않은 증기기관 또는 증기 터빈.

무복수기기관(無復水器機關: Non-condensing Engine)

사용이 끝난 증기를 공장이나 대기 속에 내보내는 등 복수기를 갖추지 않은 증기기관 또는 증기 터빈.

진동조형기(Jolt Molding Machine)

주형의 기계조형에서 주형틀에 주물사를 채우고 상하로

졸트 작용을 주어, 주물사를 압축시켜 성형하는 것.

진공 브레이커(Vacuum Braker)

복수기에서 배수 펌프의 고장으로 수위의 급상승하여 복수가 증기기관에 역류하는 것을 막는 부차 설비장치.

진공건조기(Vacuum Desiccator)

밀폐된 용기 속에 건조하려는 물체를 넣고, 펌프로 감압하여 저온에서 건조시키는 장치.

Nitriding(질화: 窒化)

공작물을 정밀하게 다듬질하여 암모니아 속에서 500℃ 정도로 18~19시간 가열한 후 냉각시키는 표면경화법의 일종.