

한시적 세포포집 구조물을 이용한 다세포 스페로이드 형성 및 추출칩

진혜진* · 김태윤* · 조영호*† · 구진모** · 김진국** · 오용수***

* 한국과학기술원 바이오및뇌공학과, ** 삼성서울병원 암연구센터, *** 삼성전기 중앙연구소

A Multicellular Spheroid Formation and Extraction Chip Using Removable Cell Trapping Barriers

Hye-Jin Jin*, Taeyoon Kim*, Young-Ho Cho*†, Jin-Mo Gu**, Jhngook Kim** and Yong-Soo Oh***

* Dept. of Bio and Brain Engineering, KAIST, ** Cancer Research Center, Samsung Medical Center,

*** Central R&D Institute, Samsung Electromechanics Co.

(Received April 7, 2010 ; Revised November 21, 2010 ; Accepted November 25, 2010)

Key Words : Multicellular Spheroid(다세포 스페로이드), Cell Trapping(세포포집), Spheroid Formation(스페로이드 형성), Spheroid Extraction(스페로이드 추출)

초록: 본 논문에서는 한시적 세포포집 구조물을 이용한 다세포 스페로이드의 형성 및 추출칩을 제안하였다. 종래의 웰 플레이트와 플라스크는 작은 스페로이드 형성이 어렵고, 기존 마이크로칩은 고정된 세포포집 구조물을 이용하여 스페로이드 추출이 어려운 단점이 있다. 반면, 제안된 칩은 한시적 세포포집 구조물을 이용하여 스페로이드의 형성과 추출이 모두 용이한 장점이 있다. 50kPa의 박막압력으로 형성된 세포포집 구조물에 145~155Pa의 세포입력압력으로 유입되는 세포를 포집한 후, 24시간 배양하여 스페로이드를 형성하였다. 또한, 박막압력 제거 후 5kPa의 세포입력압력으로 추출된 스페로이드의 지름과 활성도는 각각 $197 \pm 11.7 \mu\text{m}$, $80.3 \pm 7.7\%$ 로 측정되었다. 제안된 칩은 스페로이드의 균일한 형성과 안정적 추출이 용이하여 스페로이드의 후처리에 적용될 수 있다.

Abstract: We propose a spheroid chip that uses removable cell trapping barriers and that is capable of forming and extracting multicellular spheroids. By using a conventional well plate and flask, it is difficult to form small-sized spheroids, which resemble avascular 3D cell-cell interaction. It was difficult to extract spheroids using conventional microchips and fixed cell trapping barriers. The proposed chip, however, facilitates both formation and extraction of spheroids by using removable cell trapping barriers formed by membrane deflection. The cell trapping barriers, formed at the membrane pressure of 50 kPa, hold the cells in the trapping region at a cell inlet pressure of 145–155 Pa. After incubation for 24 h, the trapped cells form uniform spheroids. We successfully extract the spheroids at a cell inlet pressure of 5 kPa after removing the membrane pressure. The extracted spheroids have a diameter of $197.2 \pm 11.7 \mu\text{m}$ with a viability of $80.3 \pm 7.7\%$. Using the proposed chip, uniform spheroids can be formed and these spheroids can be safely extracted for carrying out the post-processing of spheroids.

1. 서론

삼차원 세포 배양은 생체와 유사한 조직을 대표하는 모델로서 많은 연구가 이루어져 왔다. 특히 다세포 스페로이드는 암세포의 삼차원 배양의 가장 전통적인 모델로서, 최근 암 연구에서는 다세포 암 스페로이드가 이차원 단층세포보다 실제 임상적 유전자 발현에 유사한 결과를 보이는 것으로

밝혀졌다.⁽¹⁾ 이에 다세포 스페로이드를 형성하는 다양한 방법이 개발되었는데, 기존의 웰 플레이트 및 플라스크를 이용한 스페로이드 형성방법^(2,3)은 무혈관(Avascular) 상태의 삼차원 세포-세포간 상호작용을 가장 잘 반영하는 작은 크기(지름 $200 \mu\text{m}$)의 스페로이드를 만들기 어려운 문제점이 있었다. 최근 개발된 마이크로 칩^(4,5)은 작은 크기(지름 $10\sim 300 \mu\text{m}$)의 스페로이드를 형성할 수 있는 장점이 있으나, 고정된 세포포집 구조물을 사용하기 때문에 형성된 스페로이드를 추출하는데 어려움이 있다.

† Corresponding Author, nanosys@kaist.ac.kr
© 2011 The Korean Society of Mechanical Engineers

반면 본 연구에서 제안하는 다세포 스페로이드 형성 및 추출칩은 유연한 PDMS 박막변형을 통해 세포포집 구조물을 한시적으로 형성함으로써 다세포 스페로이드를 형성할 뿐만 아니라 추출까지 가능한 장점이 있다. 본 논문에서는 이러한 다세포 스페로이드 형성 및 추출칩을 설계, 제작하고 그 성능을 실험적으로 검증하였다.

2. 구조 및 원리

제안된 다세포 스페로이드 형성 및 추출칩(Fig. 1)은 세포포집 구조물 제어층, 박막, 및 유체층의 세 층으로 구성되며, 4 개의 웰과 세포 유입부, 스페로이드 유출부, 및 박막 압력 조절부가 설치되어 있다. 먼저 박막 압력 조절부를 통해 박막에 압력을 가하면 웰 내에 세포포집 구조물이 형성되고, 세포 유입부에 세포 유입 압력을 가하여 웰 내에 세포를 유입시키면 세포포집 구조물로 둘러싸인 세포포집 영역 안에 세포가 쌓이게 된다. 이후 배양을 통해 세포간 상호작용을 유도하면 Fig. 2(a)와 같이 다세포 스페로이드를 형성할 수 있다. 이후 박막 압력을 제거하면 변형된 박막이 원래대로 돌아와 세포포집 구조물이 제거되고 세포 입력부에 압력을 가하면 Fig. 2(b)와 같이 웰 내에 형성된 스페로이드를 추출할 수 있다.

세포포집 구조물은 Fig. 2(b)와 같이 설계되었다. 다세포 스페로이드의 지름은 기존의 약물 스크리닝에 주로 쓰이는 $200\mu\text{m}$ ⁽⁶⁾로 결정하였으며, 50kPa의 박막 압력에 대해 박막이 $100\mu\text{m}$ 의 웰 바닥까지 변형되도록 박막의 두께와 폭을 각각 $30\mu\text{m}$ 와 $300\mu\text{m}$ 로 설계하였다.

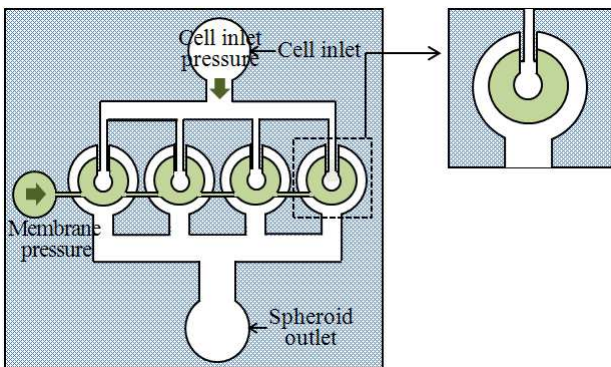


Fig. 1 4×1 spheroid chip array

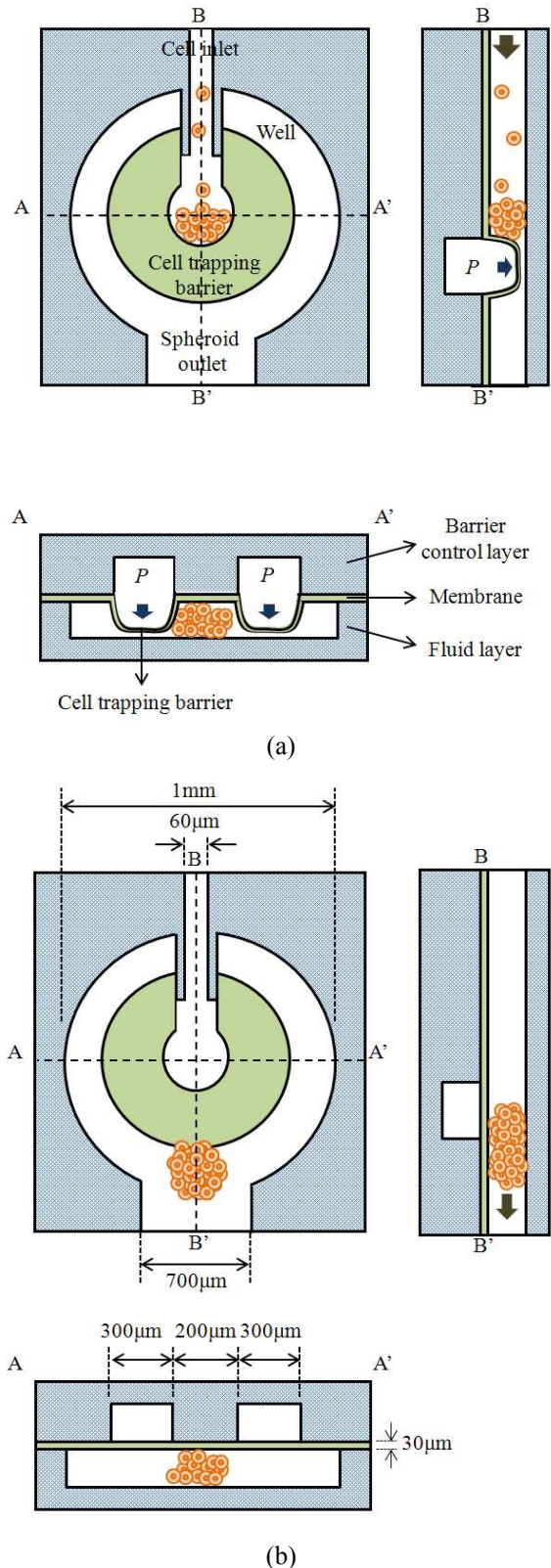


Fig. 2 The spheroid chip using a removable cell trapping barrier: (a) the inflated membrane forms cell trapping barrier for spheroid formation; (b) the deflated membrane removes cell trapping barrier for spheroid extraction.

3. 제작공정

제안된 다세포 스페로이드 형성 및 추출칩은 Fig. 3 과 같이, 두 개의 PDMS 층을 박막을 사이에 두고 접합하여 제작되었다. 먼저 100 μ m 두께의 SU-8 PR 로 제작된 몰드를 이용하여 세포포집 구조물 제어층과 유체층을 제작하였다. 30 μ m 두께의 PDMS 박막은 Silicon 웨이퍼 위에 PDMS Pre-polymer 를 Spinning 하여 제작하였다. 이후 제작된 박막 제어층과 유체층을 O₂ 플라즈마로 처리한 후 PDMS 박막을 사이에 두고 접합하여 Fig. 4 와 같이 소자를 제작하였다.

4. 실험결과 및 토의

Figure 5 는 제작된 스페로이드 형성 및 추출칩의 성능검증을 위한 실험 구성도이다. 공압 조절기를 통해 박막에 압력을 인가하여 세포포집 구조물을 제어하였고, 세포 유입부와 유출부에 유체 높이를 달리하여 압력 차에 의해 세포유동이 발생하도록 하였다. 세포는 H1650 비소세포폐암 (Non-small-cell lung cancer) 세포주를 이용하였다.

Figure 6 은 박막에 50kPa 의 압력을 가함으로써 형성되는 세포포집 구조물과 145~155Pa 의 세포 유입압력으로 인해 세포가 세포포집 영역 안에 모이는 결과를 나타낸다. 이후 37°C 의 온도와 5%의 CO₂ 농도에서 24 시간 동안 배양하면 세포간 상호작용이 발생하여 Fig. 7 과 같이 스페로이드가 형성된다. 또한, 형성된 스페로이드 를 Calcein AM 으로 처리한 결과 Fig. 8 과 같이 스페로이드를 구성하는 세포들이 모두 살아있음을 확인하였다.

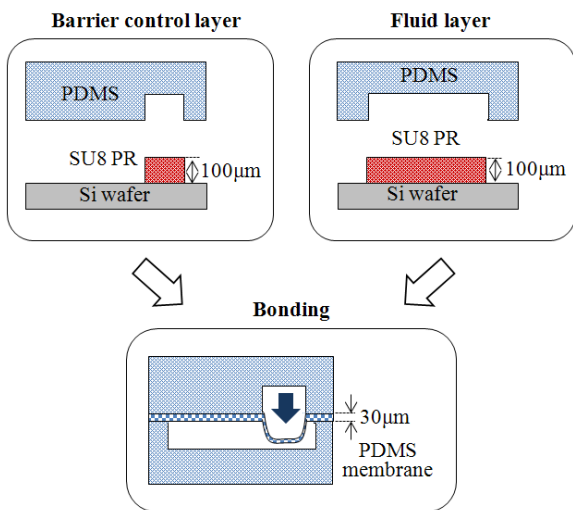


Fig. 3 Fabrication process of the spheroid chip at the cross section across B-B' in Fig. 2

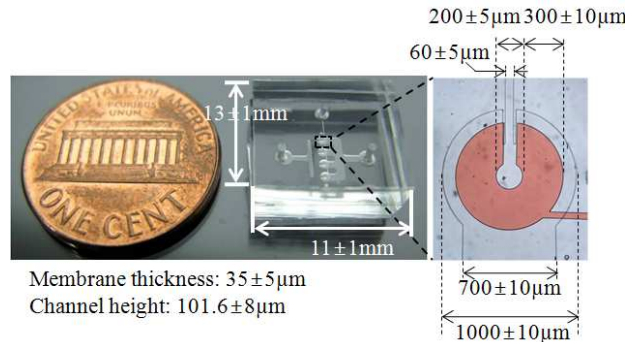


Fig. 4 Fabricated device and measured dimensions

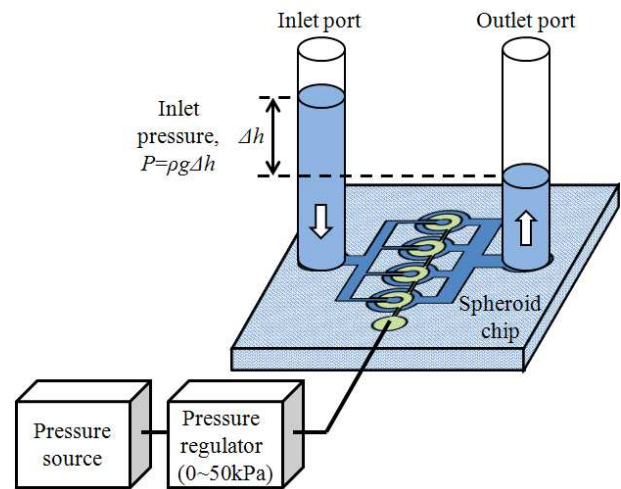


Fig. 5 Experimental apparatus

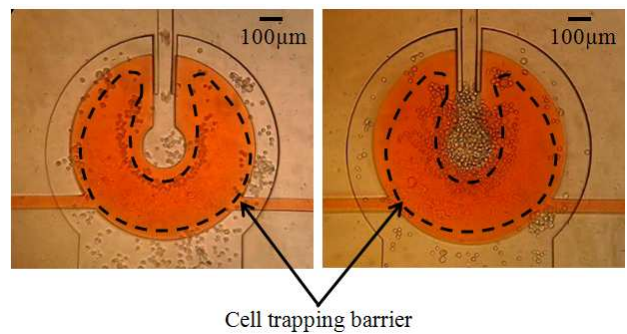


Fig. 6 Initial cell trapping and the final cell filling using the cell trapping barrier formed at the membrane pressure of 50kPa

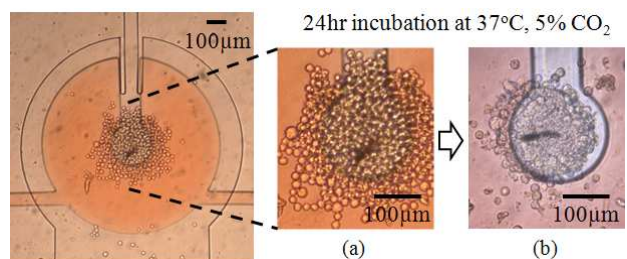


Fig. 7 Spheroid formation: (a) the cells trapped in the cell trapping region; (b) the spheroid obtained after 24 hour incubation

스페로이드를 형성한 뒤, 박막 압력을 제거한 후 5kPa의 압력을 세포 유입부에 가함으로써 스페로이드를 Fig. 9와 같이 추출하였다. 추출된 스페로이드의 크기는 $197.2 \pm 11.7 \mu\text{m}$ 로 측정되어 $200 \mu\text{m}$ 의 세포포집 영역 치수 대비 1.4%의 오차를 보였다. 아울러, 추출된 스페로이드를 Trypsin EDTA로 처리하여 단일세포를 얻은 후 Trypan Blue 염료로 처리한 결과 $80.3 \pm 7.7\%$ 의 세포 활성도를 확인하였다.

5. 결론

본 논문에서는 한시적 세포 포집 구조물을 이용한 삼차원 다세포 스페로이드의 형성 및 추출을 제안하였다. 기존의 Well-plate 및 Flask를 이용한 방법은 작은 크기(지름 $200 \mu\text{m}$)의 스페로이드를 형성하기 어려운 문제점이 있었다. 한편 작은 크기(지름 $10 \sim 300 \mu\text{m}$)의 스페로이드 형성이 가능한 마이크로 칩이 개발되었으나 고정된 세포포집 구조물을 사용하기 때문에 형성된 스페로이드를 추출하기 어려운 단점이 있었다. 반면 본 연구에서 제안하는 다세포 스페로이드 형성 및 추출칩은 박막변형을 통해 세포포집 구조물을 한시적으로 형성함으로써 다세포 스페로이드를 형성할 뿐만 아니라 추출까지 가능한

장점이 있다. 제안된 스페로이드 형성 및 추출칩의 성능시험 결과, 50kPa의 박막 압력과 145~155Pa의 세포 유입 압력 조건에서 세포가 세포포집 구조물에 포집됨을 확인하였고, 37°C의 온도와 5%의 CO₂ 농도에서 24시간 동안 배양함으로써 스페로이드가 형성됨을 입증하였다. 또한, 박막 압력 제거 후 5kPa의 압력을 세포 유입부에 가하여 스페로이드를 추출하였다. 추출된 스페로이드의 크기는 $197.2 \pm 11.7 \mu\text{m}$ 로 측정되어 설계치수 대비 1.4%의 오차를 보였고, 스페로이드 구성 세포의 활성도는 $80.3 \pm 7.7\%$ 로 측정되었다. 본 논문에서 제안된 방법은 균일한 크기의 다세포 스페로이드를 형성하고 안정적으로 추출 가능하여 유전자 분석 및 동물실험 등 다양한 후처리에 응용할 수 있다.

후기

본 연구는 삼성전기-KAIST-삼성서울병원의 산학 공동연구소인 KAIST 세포벤치연구센터의 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

- (1) Hamer, D. W., Tilborg, V., Eijk, P., Sminia, P., Troost, D., Noorden, V., Ylstra, B. and Leenstra, S., 2008, "The Genomic Profile of Human Malignant Glioma is Altered Early in Primary Cell Culture and Preserved in Spheroids," *Oncogene*, Vol. 27, pp. 2091~2096.
- (2) Kelm, J. M., Timmins, N. E., Brown, C. J., Fussenegger, M. and Nielsen, L. K., 2003, "Method for Generation of Homogeneous Multicellular Tumor Spheroids Applicable to a Wide Variety of Cell Types," *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 83, pp. 174~180.
- (3) Enmon R. M. Jr., O'Connor, K. C., Lacks, D. J., Schwartz, D. K. and Dotson, R. S., 2001, "Dynamics of Spheroid Self-Assembly in Liquid-Overlay Culture of DU 145 Human Prostate Cancer Cells," *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 72, pp. 579~591.
- (4) Torisawa, Y. I., Takagi, A., Ashimoto, Y. N., Yasukawa, T., Shiku, H. and Matsue, T., 2007, "A Multicellular Spheroid Array to Realize Spheroid Formation, Culture, and Viability Assay on a Chip," *Biomaterials*, Vol. 28, pp. 559~566.
- (5) Wu, L., Carlo, D. and Lee, L., 2008, "Microfluidic Self-Assembly of Tumor Spheroids for Anticancer Drug Discovery," *Biomed. Microdevices*, Vol. 10, pp. 197~202.
- (6) Friedrich, J., Seidel, C., Ebner, R. and Kunz-Schughart, L. A., 2009, "Spheroid-Based Drug Screen: Considerations and Practical Approach," *Nat. Protoc.*, Vol. 4, pp. 309~324.

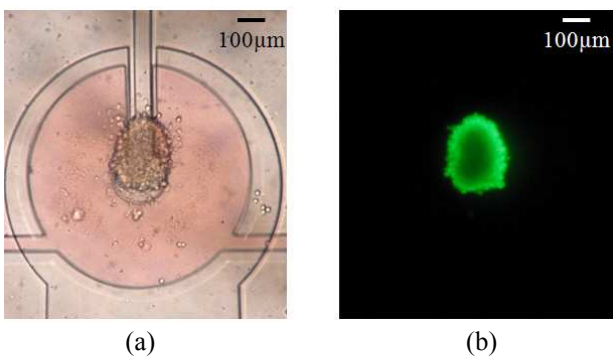


Fig. 8 Analysis of spheroid viability: (a) bright-field image of the spheroid; (b) fluorescence image of the spheroid tagged by Calcein-AM probe

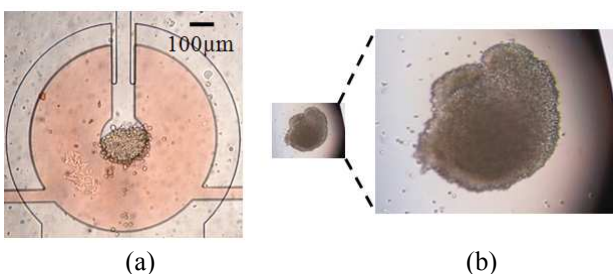


Fig. 9 Spheroid extraction: (a) the spheroid formed in the chip; (b) the spheroid extracted from the chip