

액적의 균형공급에 의해 관류유량이 일정한 펌프 없는 세포배양 칩

김 태 윤* · 조 영 호*†

* KAIST 바이오및뇌공학과

Pumpless Cell Culture Chip with a Constant Perfusion Rate Maintained by Balanced Droplet Dispensing

Taeyoon Kim* and Young-Ho Cho*†

* Dept. of Bio and Brain Engineering, KAIST

(Received March 31, 2011 ; Revised August 14, 2011 ; Accepted September 7, 2011)

Key Words : Perfusion Cell Culture(세포 관류배양), Medium Perfusion-Rate(배양액 관류유량), Balanced Droplet Dispensing(액적 균형공급)

초록: 본 논문에서는 액적의 균형공급에 의해 관류유량이 일정하게 유지되는 펌프 없는 세포배양 칩을 제안하였다. 기존의 펌프 없는 세포배양 칩은 유체 수위차가 시간에 따라 점차 감소하여 일정한 관류유량 유지가 어려웠다. 반면, 제안된 칩은 액적의 균형공급으로 유체 수위차를 일정하게 유지하여 일정한 관류유량의 세포배양이 가능하다. 제작된 세포배양 칩의 성능분석 결과, 펌프 없이 최대 9.96%와 6.92%의 편차 및 오차 내에서 0.1~0.3 μ l/min의 관류유량, Q , 을 얻었다. H358 폐암 세포주 배양결과, $Q=0.2\mu$ l/min의 관류유량에서 최대 57.8 \pm 21.1%/일의 증식률을 보여, $Q=0\mu$ l/min의 정지배양보다 1.9 배 높은 값을 얻었으며 활성도 또한 정지배양보다 관류배양이 더 높은 값을 보였다. 제안된 펌프 없는 세포배양 칩은 높은 증식률과 활성도의 좋은 배양환경을 제공하여 세포기반 바이오 분석에 응용 가능하다.

Abstract: We report on a pumpless cell culture chip in which a constant medium perfusion rate is maintained by balanced droplet dispensing. Previous chips had a *decreasing* perfusion rate due to the *decreasing* hydraulic-head difference Δh between the inlet and drain. However, the present chip maintains a *constant* medium perfusion rate due to the *constant* Δh between the inlet and drain maintained by balanced droplet dispensing. The perfusion rate Q was measured to be 0.1–0.3 μ l/min with a maximum deviation and error of 9.96% and 6.92%, respectively. In the perfusion culture ($Q=0.1\text{--}0.3\ \mu$ l/min), the maximum growth-rate of H358 cells was measured to be 57.8% \pm 21.1% per day, which is 1.9 times higher than that of a static culture. The perfusion culture also resulted in higher cell viability than a static culture. The present chip offers a favorable environment with a high growth-rate and viability and thus has potential for use in the integrated cell culture system.

- 기호설명 -

Q : 관류유량
 Δh : 유체 수위차
 R_m : 중앙 배수유로 유체저항
 R_b : 가지 배수유로 유체저항
 ρ : 배양액 밀도
 μ : 배양액 점성
 g : 중력가속도
 w, h, l : 배수유로 폭, 높이, 길이

1. 서론

본 논문에서는 액적의 균형공급에 의해 관류유량이 일정한 펌프 없는 세포배양 칩을 제안하였다. 일정한 유량의 세포 관류배양은 원활한 양분 공급과 노폐물 제거에 있어 필수적이다.⁽¹⁾ 기존의 펌프를 이용한 세포배양 칩⁽²⁻⁴⁾은 외부의 유체펌프로 인해 구조가 복잡하고 값비싼 단점이 있다. 이를 해결하기 위해 펌프 없이 간단한 구조의 세포배양 칩^(5,6)이 개발되었으나, 시간에 따라 유체 수위차가 감소하여 관류유량이 일정하게 유지되지 않는 문제가 있었다. 이에, 본 연구에서는 액적의 균형공급을 이용하여 수위차가 일정하게 유지되어 관류

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

유량이 일정하면서도 펌프 없이 간단한 구조를 갖는 세포배양 칩을 제안하였다.

2. 구조 및 원리

2.1 펌프 없는 세포배양 칩

제안된 세포배양 칩[Fig. 1(a)]은 85mm×56mm의 PDMS 웰 층과 액적 공급 층으로 구성되며, 웰 층에는 4×8 웰 배열이 배치되고 각 행의 8개 웰은 배수유로에 의해 하나의 공통 배수구로 연결되어 있다. 액적 공급 층은 웰 층의 상단에 부착하여 배양액 관류에 따라 새로운 배양액 액적을 웰에 공급하도록 설계하였다.[Fig. 1(b)] Inlet 과 drain 간 수위차, Δh , 에 따른 유량, Q , 에 의해 노폐물 액적이 Drain 에서 제거되면 웰 내 공기 층이 팽창되어 압력이 감소하기 때문에, 앞서 제거된 노폐물 액적의 부피에 해당하는 배양액 액적이 액적 공급 층에서 웰 층으로 공급된다. 결국, 이러한 과정을 통해 수위차, Δh , 가 일정하게 유지되어 펌프 없이도 일정한 관류유량의 세포배양이 가능하다. 제안된 세포배양 칩의 웰 지름과 간격은 기존 96 웰 플레이트 규격에 맞춰 각각 6mm 와 9mm 로 설계하였다.

2.2 배수유로

제안된 칩의 배수유로를 등가전기회로로 변환, Kirchhoff 법칙을 적용하여, 공통 배수유로로 연결된 8개 웰의 관류유량 식을 다음과 같이 얻었다.

$$\begin{pmatrix} Q_1 \\ Q_2 \\ Q_3 \\ Q_4 \\ \dots \\ Q_8 \end{pmatrix} = \frac{\rho g \Delta h}{R_b} \left\{ \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ \dots \\ 1 \end{pmatrix} - R_m A^{-1} \begin{pmatrix} 8 \\ 7 \\ 6 \\ 5 \\ \dots \\ 1 \end{pmatrix} \right\} \quad (1)$$

이때, ρ 와 g 는 각각 배양액 밀도와 중력가속도, Δh 는 Inlet 과 Drain 간 유체 수위차, R_m 과 R_b 는 각각 중앙 배수유로와 가지 배수유로의 유체저항을 뜻한다. 식 (1)의 행렬 A 는 아래와 같다.

$$A = \frac{1}{8} \begin{pmatrix} R_m + 8R_b & R_m & R_m & R_m & \dots & R_m \\ -8R_b & R_m + 8R_b & R_m & R_m & \dots & R_m \\ 0 & -8R_b & R_m + 8R_b & R_m & \dots & R_m \\ 0 & 0 & -8R_b & R_m + 8R_b & \dots & R_m \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \dots & R_m + 8R_b \end{pmatrix} \quad (2)$$

여기서 유체저항 R_m 과 R_b 는 배수유로의 폭, w , 높이, h , 및 길이, l ,에 의해 다음과 같이 결정된다.⁽⁷⁾

$$R_b, R_m = \frac{12\mu l}{wh^3} \left[1 - \frac{h}{w} \left\{ \frac{192}{\pi^5} \sum_{i=1,3,5,\dots}^{\infty} \frac{1}{i^5} \tanh\left(\frac{\pi w i}{2h}\right) \right\} \right]^{-1} \quad (3)$$

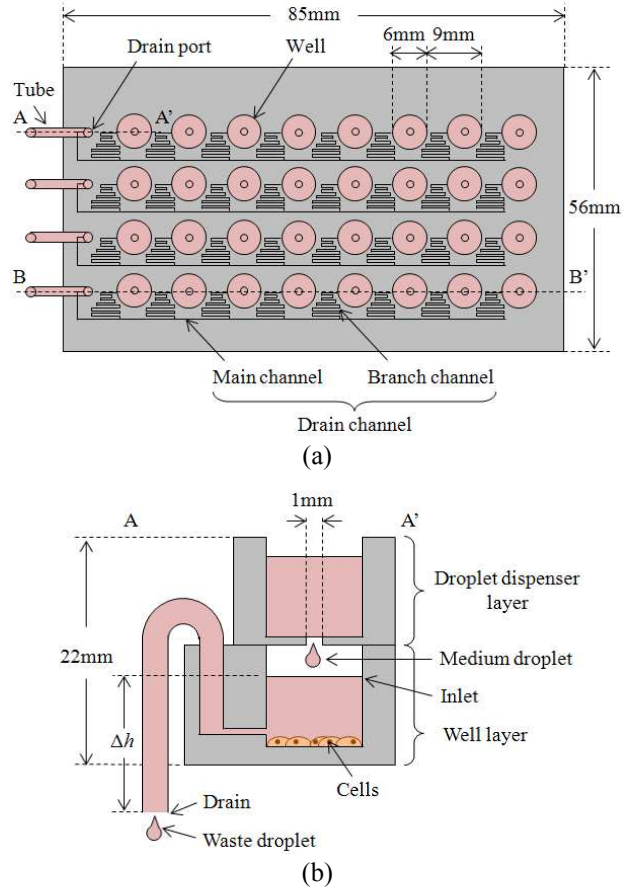


Fig. 1 Schematic view of the present chip: (a) top view; (b) cross-sectional view along A-A' in (a)

이때 μ 는 배양액의 점성 ($\sim 1\text{mPa}\cdot\text{s}$)을 의미한다.

8개 웰에서 균일한 관류유량을 얻기 위해서는 가지 배수유로의 유체저항, R_b , 이 중앙 배수유로의 유체저항, R_m , 보다 충분히 커야 한다. 본 논문에서는 Table 1 과 같이 $R_b: R_m = 600: 1$ 로 설계하였다. 이처럼 R_m 이 R_b 에 비해 무시할 정도로 작다고 가정하면 식 (1)은 다음과 같이 단순화 된다.

$$Q_{1-8} \approx \frac{\rho g \Delta h}{R_b} \quad (4)$$

여기서, 수위차, Δh , 는 0~100mm 의 범위에서 조절하여 관류유량, Q_{1-8} , 이 일반적인 세포 배양에 쓰이는 범위인 0~0.3 $\mu\text{l}/\text{min}$ ⁽⁴⁾으로 발생하도록 하였다.

3. 제작공정

제안된 세포배양 칩은 Fig. 2 와 같이 PDMS 물당을 이용하여 제작되었다. PDMS 혼합제(경화제: PDMS 질량=1: 10)를 아크릴 틀에 부어 85°C 에서

Table 1 Dimensions and fluidic resistances of the drain channels in Fig. 1(a)

Drain channels	Characteristics	Designed	Fabricated
Main channel	Width, w_m [μm]	400	398 \pm 2.7
	Height, h_m [μm]	220	219.7 \pm 27.2
	Total length, l_m [mm]	72	72 \pm 0.8
	Fluidic resistance, R_m [$\text{Pa}\cdot\text{s}/\text{m}^3$]	3.09×10^{11}	3.13×10^{11}
Branch channel	Width, w_b [μm]	60	58 \pm 1.4
	Height, h_b [μm]	60	56.7 \pm 2.3
	Total length, l_b [mm]	85	85 \pm 0.3
	Fluidic resistance, R_b [$\text{Pa}\cdot\text{s}/\text{m}^3$]	1.87×10^{14}	2.24×10^{14}

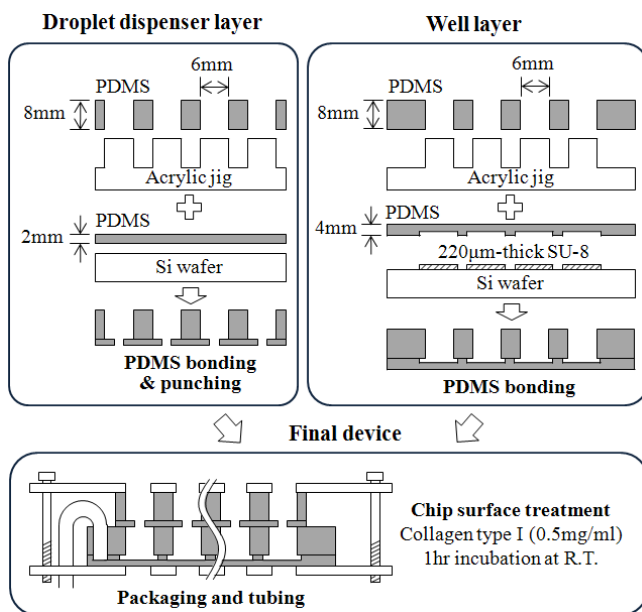


Fig. 2 Fabrication process for the present chip showing the cross-sectional view along B-B' in Fig. 1(a)

두 시간 경화시켜 웰 층과 액적 공급 층의 상판을 제작하고 각 층의 하판은 각각 SU-8 배수유로 몰드가 형성된 Si 웨이퍼와 Bare Si 웨이퍼 위에 16g의 PDMS pre-polymer 를 경화시켜 제작하였다. 제작된 웰 층과 액적 공급 층의 상, 하판을 O₂ 플라즈마 접합하고 액적 공급 층 하판에 1mm 지름의 4×8 어레이의 구멍을 뚫었다. 웰 바닥은 세포가 잘 부착되도록 5mg/ml 의 Collagen 으로 코팅하였다. 제작된 웰 층과 액적 공급 층은 서로 접합하

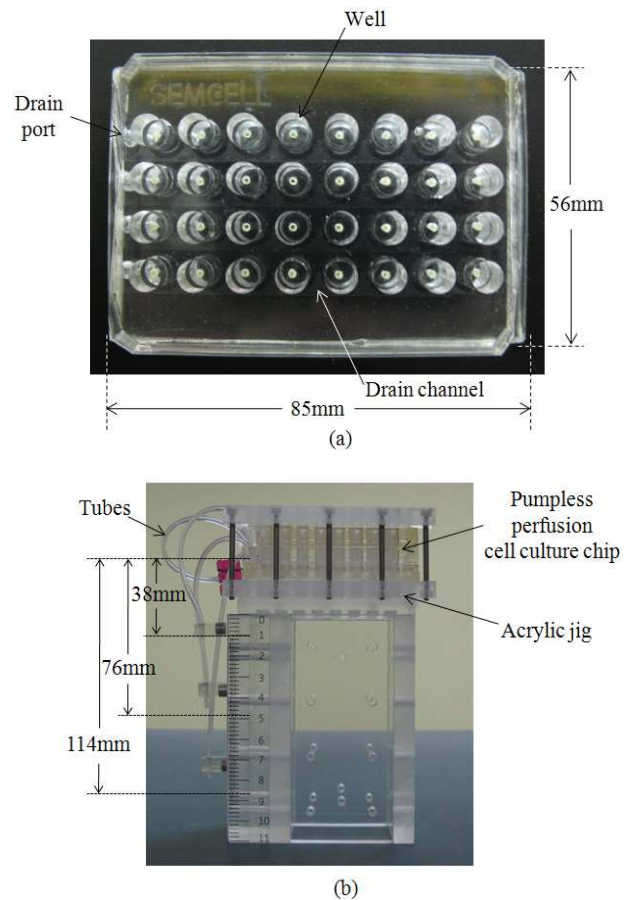


Fig. 3 Fabricated device: (a) fabricated pumpless perfusion cell culture chip; (b) packaged device

지 않고 아크릴 틀로 체결함으로써(Fig. 3), 세포 배양 후 아크릴 틀을 해체, 액적 공급 층을 떼어 웰 내의 세포를 용이하게 채취할 수 있도록 하였다.

4. 실험결과 및 토의

4.1 관류유량

탈 이온수를 이용하여 3 가지 수위차, $\Delta h=38, 76, 114\text{mm}$ 에 의한 관류유량을 Fig. 4 와 같이 측정하였다. 그 결과, 배수유로로 연결된 8 개 웰 내 관류유량 최대편차는 9.96%, 이론 값 대비 최대오차는 6.92%로 측정되었다. 관류유량의 편차와 오차는 PR lithography 공정에서 약 12%의 배수유로 높이 편차가 발생한 데에서 기인한 것으로 생각된다.

4.2 세포 증식률

Hemocytometer 를 이용하여 RPMI 배양액에 $5\times 10^5/\text{ml}$ 농도로 섞인 GFP (Green fluorescent protein) H358 폐암 세포주 용액을 준비한 후, 각 웰에 100 μl 씩 주입하여 37°C 5% CO₂ 의 인큐베이터에서

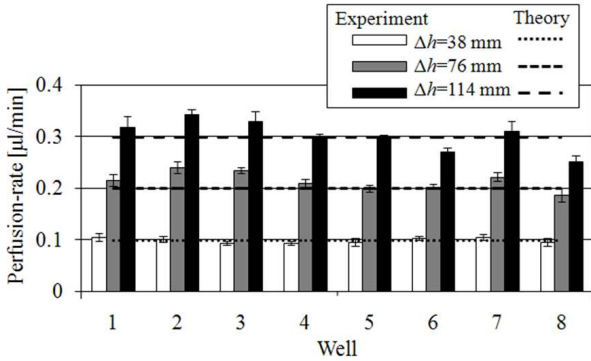


Fig. 4 Experimental and theoretical perfusion-rates at the 8 wells in the fabricated chip for the three different hydraulic head differences, Δh ($n=3$)

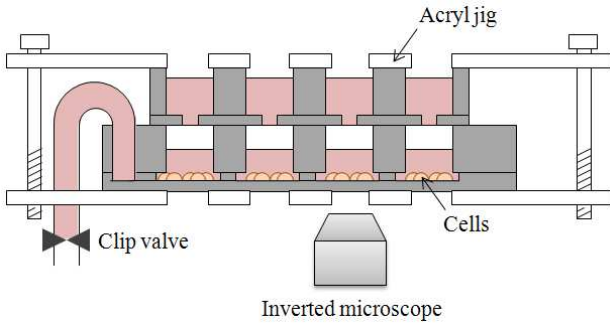


Fig. 5 Experimental apparatus for the cell image capture

배양하였다. 이때, 수위차 Δh 를 0, 38, 76, 114mm 로 조절하여 0, 0.1, 0.2, 0.3 μ l/min 의 관류유량으로 세포를 배양하면서 Fig. 5 와 같이 현미경으로 세포를 관찰하였다. 그 결과, 정지배양($Q=0\mu$ l/min)의 경우, 세포가 더디게 증식함에 비해, 관류배양($Q=0.1\sim 0.3\mu$ l/min)의 경우, 세포가 시간에 따라 Colony 를 이루어 증식하는 것을 확인하였다(Fig. 6). GFP H358 세포는 본래 활발히 증식할 경우 서로 뭉쳐져 Colony 형태로 배양되는 특성이 있다.

세포 이미지 분석을 통해 세포 Colony 성장곡선을 Fig. 7 과 같이 얻고 총 6 일 배양된 세포를 Trypsin 처리, 바닥에서 떼어내어 Pipette 으로 채취, 계수한 후 아래와 같은 식을 통해 Fig. 8 과 같이 세포 증식률을 도출하였다.

$$\text{세포 증식률} = \left(\frac{n_f - n_i}{n_i} \right) \times 100(\%) / \Delta t \quad (5)$$

여기서 n_i 와 n_f 는 초기 및 배양 후 세포개수를, Δt 는 총 세포배양 기간인 6 일을 뜻한다.

그 결과, $Q=0.2\mu$ l/min 의 일정한 관류유량에서 최대 $57.8 \pm 21.1\%$ /일의 H358 폐암세포 증식률을 보여, 정지배양 ($Q=0\mu$ l/min)의 $30.2 \pm 10.3\%$ /일보다

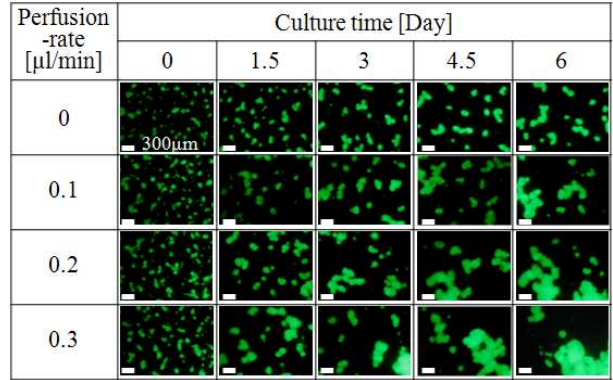


Fig. 6 Microscopic fluorescence cell images captured in the fabricated chip at intervals of 1.5 days over the course of 6 days of cell culture

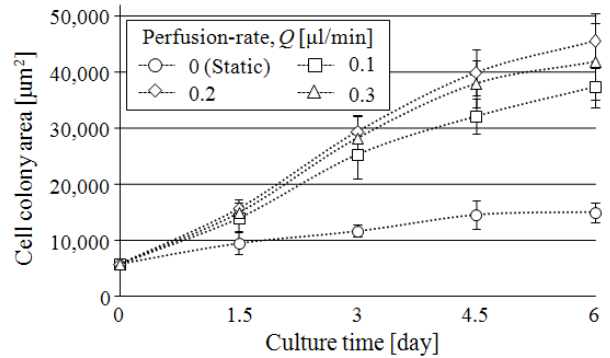


Fig. 7 Measured cell colony area as a function of cell culture time. The error bars indicate the standard deviation of cell colony area measured from 8 wells at each perfusion-rate

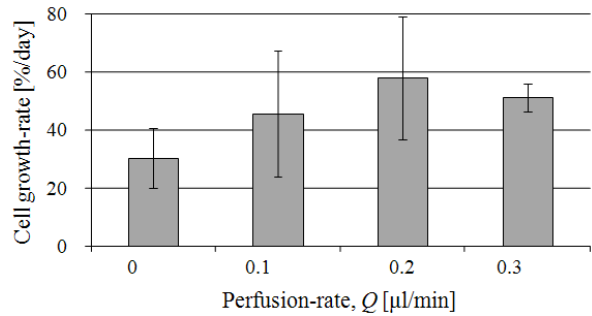


Fig. 8 Measured cell growth-rates at varying perfusion-rates. The error bars indicate the standard deviation from four measurements of the cell growth-rate at each perfusion-rate

1.9 배 높은 값을 얻었다. 이는 일정한 유량의 관류배양이 원활한 양분 공급과 노폐물 제거가 가능하여 정지배양보다 세포배양에 적합한 환경을 제공하기 때문으로 판단된다.

4.3 세포 활성화도

총 6 일 동안 배양한 후 Trypsin 처리를 통해

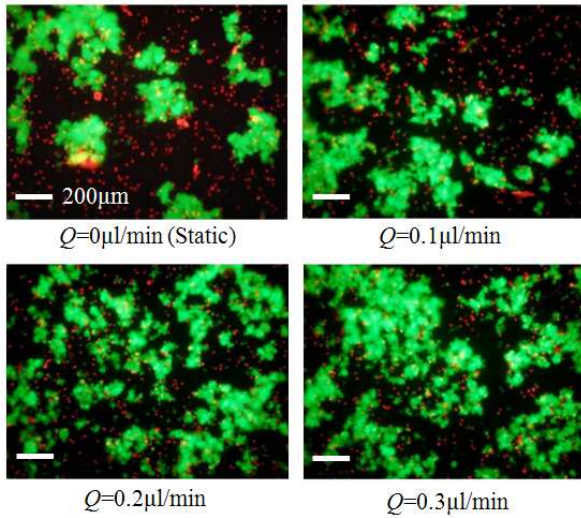


Fig. 9 Microscopic fluorescent images of the cells treated with EthD-1 solution after 6 days of culture in the fabricated chip

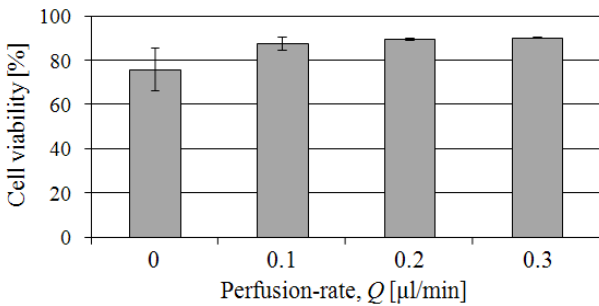


Fig. 10 Measured cell viability at varying perfusion-rates. The error bars indicate the standard deviation from three measurements of the cell viability at each perfusion-rate

채취한 세포를 Floating 상태에서 $2\mu\text{M}$ 의 Ethidium homodimer (EthD-1)로 37°C 에서 45분 동안 염색하여 활성도를 분석하였다. 그 결과, Fig. 9와 같이 죽은 세포는 붉은색으로 염색되고 정상 세포는 녹색으로 남게 된다. 형광 이미지 분석을 통해 세포 활성도는 다음과 같이 측정하였다.

$$\text{세포 활성도} = \left(1 - \frac{\text{죽은 세포 면적}}{\text{전체 세포 면적}}\right) \times 100(\%) \quad (6)$$

그 결과, Fig. 10과 같이 $Q=0.1\sim 0.3\mu\text{l}/\text{min}$ 의 관류배양이 평균 89.2%의 세포 활성도를 보여, $Q=0\mu\text{l}/\text{min}$ 의 정지배양의 평균 활성도인 75.9%보다 높은 수치를 보였다. 이는 세포 증식을 측정결과와 마찬가지로 일정한 유량의 관류배양이 원활한 양분 공급과 노폐물 제거로 세포배양에 적합한 환경을 제공하기 때문으로 판단된다.

5. 결론

본 논문에서는 액적의 균형공급에 의해 관류유량이 일정한 펌프 없는 세포배양 칩을 제안하고 그 성능을 실험적으로 검증하였다. 그 결과, 제안된 세포배양 칩이 펌프 없이 간단한 구조로 일정한 관류유량의 세포배양이 가능함을 확인하였다. 아울러, 제안된 세포배양 칩이 일정한 유량의 세포 관류배양을 통해 정지배양보다 높은 세포 증식률과 활성도의 좋은 배양환경을 제공함을 검증하였다. 제안된 펌프 없는 세포배양 칩은 향후 세포 기반 바이오 분석에 응용될 수 있다.

후기

본 연구는 KAIST 세포벤치연구센터에서 교육과학기술부/한국과학재단 중견연구자지원사업(도약과제)인 “생체모사 인간감응시스템” (과제번호 2010-0018083)의 지원으로 수행하였습니다.

참고문헌

- (1) Kim, L., Toh, Y.-C., Voldman, J. and Yu, H., 2007, "A Practical Guide to Microfluidic Perfusion Culture of Adherent Mammalian Cells," *Lab Chip*, Vol. 7, pp. 681~694.
- (2) Korin, N., Bransky, A., Dinnar, U. and Levenberg, S., 2009, "Periodic "Flow-Stop" Perfusion Microchannel Bioreactors for Mammalian and Human Embryonic Stem Cell Long-Term Culture," *Biomed. Microdevices*, Vol. 11, pp. 87~94.
- (3) Lii, J., Hsu, W.-J., Parsa, H., Das, A., Rouse, R. and Sia, S.K., 2008, "Real-Time Microfluidic System for Studying Mammalian Cells in 3D Microenvironments," *Anal. Chem.*, Vol. 80, pp. 3640~3647.
- (4) Kim, L., Vahey, M. D., Lee, H.-Y. and Voldman, J., 2006, "Microfluidic Arrays for Logarithmically Perfused Embryonic Stem Cell Culture," *Lab Chip*, Vol. 6, pp. 394~406.
- (5) Lee, P. J., Ghorashian, N., Gaige, T. A. and Hung, P. J., 2007, "Microfluidic System for Automated Cell-Based Assays," *JALA Charlottesville Va.*, Vol. 12, pp. 363~367.
- (6) Tourovskaia, A., F.-Masot, X. and Folch, A., 2005, "Differentiation-on-a-Chip: A Microfluidic Platform for Long-Term Cell Culture Studies," *Lab Chip*, Vol. 5, pp. 14~19.
- (7) White, F. M., 1991, *Viscous Fluid Flow*, McGraw-Hill, New York, pp. 114.