

나노기공 표면에서의 세포 행동양식에 관한 연구

정성희¹, 윤원중², 민준홍^{1,3*}

Investigation of Cell Behavior on Nanoporous Surface

Sung Hee Chung¹, Won Jung Yoon², and Junhong Min^{1,3*}

접수: 2012년 1월 3일 / 게재승인: 2012년 2월 9일

© 2012 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: In this paper, we investigated the effect of nanostructure on the cell behaviors such as adhesion and growth rate. Nanoporous structures with various diameters (30, 40, 45, 50, 60 nm) and 500 nm of the depth were fabricated using the anodizing method. The water contact angle of the surface consisting of nanopores with 30 nm diameter was 40 degree and those were 60~70 degree in cases of nanopores with over 40 nm diameter. Hela cells were cultivated on various nanoporous structure surface to investigate the cell behavior on nanostructure. As a result, Hela cells preferred 30 nm diameter nanoporous surface that has lower water contact angle. This result was confirmed by protein adsorption experiment and scanning electron microscope investigation.

Keywords: AAO (Anodic Aluminum Oxide), Nanostructure, cell behavior, SEM, protein adsorption

1. 서론

최근 약학/의학/환경과학분야에서 핵산, 단백질을 이용한 활성 측정법보다도 세포를 이용한 생리학적반응의 직접 측정법이 중요시 연구되고있으며, 세포를 다루기 위하여 다양한 마이크로 칩이 개발되고 있다 [1-6].

하지만, 현재 개발되는 마이크로세포칩은 조직이 아닌 세포를 이용하기 때문에, 생체내 존재하는실제 환경과 다를 수 있어, 마이크로칩환경에서 외부 자극에 의한 DNA 파괴 및 화학물질에 의한 세포사멸 등 세포를 이용한 생화학적 반응을 연구할 때, 세포의 본질적 반응인지, 환경변화에 의한 간접반응인지 구별하기 어려운 단점이 있다 [7].

그러므로, 생체 내 환경과 유사한 환경을 조성해 주는 마이크로칩의 개발은 매우 중요하다. 생체 내 환경과 비슷한 환경을 조성한 세포칩을 구성하고자 할 때, 고려해야 할 가장 중요한 공학적 요소는 세포간 상호작용, 세포-표면 간 상호작용 그리고 성장조절물질을 포함한 배양액조성이다. 특히, 세포와 표면간의 상호작용은 광범위하게 조사되고 있는데, 이는 체세포가 분화하고, 활성을 유지하기 위해서는 세포가 먼저 고체표면에 흡착하여야 하기 때문이다. 그러므로 세포-표면간 상호작용은 세포 흡착뿐만이 아니라, 세포 분화, 이주, 성장에 중요한 변수로 인식되었고, 다양한 표면 개질 방법과 표면 특성에 따른 세포특성변화에 관한 연구가 다양하게 개발되었다 [8-9]. 표면을 개질하여 표면의 특성을 변화시키기 위하여 생물학적/화학적 방법을 이용하기도 하고, 물리적으로 다양한 구조들을 도입하고 있다 [3,10,11]. 생물학적인 방법으로 일반적으로 사용하는 방법은 콜라겐, 젤라틴, 그리고 피프로넥틴과 같은 ECM (Extra Cellular Matrix) 단백질을 이용하는 것이다. ECM 단백질이 표면에 흡착되면 세포 표면에 있는 특정 인테그린 (integrin)들과 결합될 수 있다 [12,13]. 짧은 펩타이드인 Arg-Gly-Asp (RGD)

¹가천대학교 가천바이오나노 연구원

¹Gachon Bio-nano Research Institute, Gachon University, Gyeonggi-do 461-701, Korea

²가천대학교 화공생명공학과

²Department of Chemical Bioengineering, Gachon University, Gyeonggi-do 461-701, Korea

³가천대학교 바이오나노학과

³College of BioNano Technology, Gachon University, Gyeonggi-do 461-701, Korea

Tel: +82-31-750-8553, Fax: +82-31-750-8553

e-mail: jmin@kyungwon.ac.kr

가 포함한 표면 링커를 직접 표면에 형성하여 세포 흡착을 향상시키는 연구가 이미 진행되고 많은 연구에 응용이 되고 있다. 화학적인 방법으로는 표면을 친수화하는 방법이 사용 되는 데, 보통 양전하/음전하를 띌 수 있도록 APTS (3-(2-amino-ethylamino)propyltrimethoxy-silane) 그리고 poly-L-lysine과 같은 화학적 링커 들을 이용한다 [14].

이러한 생물학적/화학적 방법을 사용하는 경우, 생체내와 유사한 미세환경을 조성하기 위한 장점이 있지만, 화학/생물 물질의 생체내 안정성 및 지속적인 사용이 어려워 장기간 사용이 어렵고, 생체내 삽입이 어렵다는 단점이 있다. 그렇기 때문에, 물리적인 방법, 즉, 표면에 미세구조체를 형성하여 표면 특성을 조절할 수 있는 방법이 세포배양기술에 응용되기 시작하였다 [1,8,15-17]. 세포-표면 상호작용을 조절하기 위하여 필요한 표면의 특성은 ① 소수성, ② 표면전하, ③ 생물학/화학 작용기 순이다. 그러므로, 나노/마이크로 구조체를 이용하여 표면의 소수성을 조절하게 되면 세포의 흡착 등 세포거동을 쉽게 조절할 수 있다 [1,8,15-17]. 또한 물리적인 방법과 생물학적 물질을 혼합하게 되면 세포흡착을 더욱 향상시킬 수 있다. 이러한 나노 구조표면은 다양한 나노 리소그래피 그리고 나노조합기술 즉, e-beam lithography, dip-pen technology, nanoimprinting과 같은 다양한 방법으로 제작될 수 있다 [7,9,15].

연구되는 나노 구조체는 정렬/비정렬 기둥모양, 기공모양, 선, 그리고 점 패턴과 같이 다양하며, 이러한 나노 구조 표면 상에서 세포거동양식은 거시적 또는 미시적으로 지속적으로 연구되고 있다. 본 연구팀 또한 선행연구를 통하여 다양한 나노 구조표면에서 세포의 행동양식을 관찰하여보고하였다. 기본적으로 비규칙적인 나노 표면에서 세포의 흡착이 평평한 표면보다 좀 더 증가된 것을 확인할 수 있었으며 [18], 또한 규칙적인 나노 구조체를 가지는 표면을 이용하여 세포의 행동양식을 분석해본 결과, 나노 구조체의 중형비율이 1 근처에서 세포흡착이 최대화 되는 것으로 확인되었다 [19]. 하지만, 나노 구조체 형태에 대한 세포거동영향은 과학적으로 아직 명확하게 밝혀지지 못하고 있는 실정이다.

그러므로 본 연구에서는 세포의 흡착과 성장에 나노구조 표면이 미치는 영향을 직관적으로 관찰하고자 한다. 이를 위하여 30~60 nm의 나노기공을 가진 다양한 다공성 산화 알루미늄나 표면을 양극산화법을 이용하여 제작하고, 구조를 주사전자현미경으로 확인하였다. 표면의 구조변화에 따른 소수성 변화를 물접촉각으로 측정하였고, 헬라세포를 제작된 표면에 직접 배양함으로써, 나노구조체가 세포 거동에 미치는 영향을 파악하였다. 이를 단백질 흡착실험 및 주사전자현미경을 통한 세포표피침정도 측정을 통하여 확인하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 양극산화된 알루미늄산화막

알루미늄나 나노 구조체 표면은 이미 발표된 논문의 방법을 이용하여 제작되었다 [20,21]. 간단히 설명하면, 30 × 150 × 0.5 mm의 알루미늄 판을 아세톤에 60분 동안 방치된 표면을

1차 세척 후, 이 알루미늄 판을 에탄올/과염소산 (혼합비율 1 : 5)의 혼합 용액을 이용하여 5°C, 15 V에서 전자연마한다. 0.3 M 옥살산 (DC Chemical, Japan) 용액에 10°C, 40 V 조건 에서 7시간 동안 첫 번째 양극산화반응을 수행한다. 이렇게 마쳐진 알루미늄산화막을 인산용액 (6 wt %) 그리고 크롬산용액 (1.5 wt %)의 60°C에서 녹인다. 결과물로 생성된 알루미늄판은 재 산화된다. 2차 산화시간의 조절에 의하여 나노기공의 깊이를 조절할 수 있다. 본 논문에서는 500 nm 깊이의 나노 구조체를 얻기 위하여 2차 산화시간을 100초로 한정하였다. 나노기공의 지름은 수분을 함유한 인산용액 (5 wt %)에 30°C에서 반응하는 것으로 조절할 수 있다. 본 논문에서는 0, 5, 15, 그리고 25분을 이용하여 지름이 다른 나노기공을 제작하였다.

2.2. 실험방법

2.2.1. 세포배양

본 연구에서는 자궁근종암 세포주 (Hela, ATCC No. CCL-2)를 사용하였다. 세포배양액 조성은 FBS 10% (GIBCO, NY, USA), Penicillin-streptomycin 1% (GIBCO, NY, USA)가 포함된 DMEM (GIBCO, NY, USA) 이었으며, 배양 조건은 온도 37°C, 이산화탄소 5 % 이다. 나노기공 표면 위에서의 세포배양은 양극산화된 알루미늄산화막이 형성된 표면 위 일정 크기 (0.5 cm × 0.5 cm)안에 세포를 각각 배양하였다.

2.2.2. 접촉각 측정

다른 지름의 나노기공을 가지고 있는 양극산화 된 알루미늄산화막 표면의 일차적 특성을 평가하기 위하여 물접촉각을 Pheonix (PHX300, Korea)기기를 이용하여 측정하였으며, 정확한 측정수치를 위하여 5번 반복하여 측정하였다.

2.2.3. 주사전자현미경을 이용한 표면검사

나노기공표면 위에 부착되어 있는 세포의 다양한 형태를 관찰하기 위하여 주사전자현미경 (JSM-7500F, JEOL, Japan)을 이용하였다. 모든 이미지는 15 kV의 전압에서 측정되었다. 주사형전자현미경의 이미지 촬영을 위한 세포고정 방법으로는 4% 포름알데하이드를 이용하여 기본적인 세포고정을 한 뒤, 50~100%의 알코올을 이용하여 6단계에 걸쳐 각각 30분 동안 처리하여 세포를 탈수 시킨 뒤, 수분을 제거하기 위하여 2시간 이상 진공탈수기를 이용하여 탈수 처리방법을 이용하였다.

2.2.4. 단백질흡착

나노구조표면-생물물질과 상호작용을 측정하기 위하여, 가장 기본적인 방법은 단백질 흡착량을 비교하는 것이다. 단백질 흡착은 세포의 흡착과 높은 상관관계를 가지고 있다고 알려져 있기 때문이다 [22,23].

본 연구에서는 BSA-FITC conjugated (Sigma, USA)을 이용하여, 흡착된 단백질을 형광을 이용하여 측정하였다. 1%의 BSA-FITC를 상온에서 각각의 표면 위에 10분 동안 흡착시킨 뒤, 인산염버퍼를 이용하여 흡착되지 않은 단백질을 제거한 후, 형광측정기기 (Eclipse 80i, Nikon, Japan)를 이용하여

형광 값 (488 nm)을 확인하였다.

2.2.5. 세포성장속도 측정계산법

세포의 성장 속도는 세포계수법을 이용하여 측정되었다. 각각의 넓이가 다른 나노기공표면을 가진 산화알루미늄의 일정 넓이에 세포를 배양하였다. 6시간 동안 세포를 배양 한 뒤, 부착된 세포만을 직접 계수하여 표면에 존재하는 세포량을 측정하였다. 2일 후, 위와 같은 방법으로 증가된 세포의 양을 측정하였다. 세포 성장 속도는 (세포양 (2일후) - 세포양 (6시간후))/세포양 (6시간후)으로 계산되었다 [24,25].

3. 결과 및 고찰

3.1. 넓이가 다른 나노기공 표면의 제작 및 특성분석

알루미늄산화막은 양극산화처리 시간을 이용하여 나노기공의 크기를 정확하게 제어할 수 있기 때문에 규칙적인 나노구조체를 표면에 형성할 수 있는 좋은 공학적 재료이다. 본 연구에서는 산화처리시간을 0, 5, 15, 그리고 25분으로 조절하여, 다양한 나노기공 (지름 30, 40, 45, 50nm)을 알루미늄산화막표면에 제작하였다 (Fig.1(b)~(e)). 제작된 나노기공표면은 제작전의 알루미늄 산화막 (Fig. 1(a))과 비교되었다.

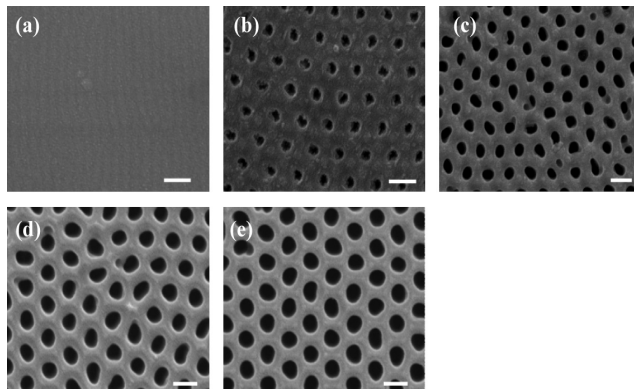


Fig. 1. SEM images of nanoporous alumina surfaces with various diameters of (a) flat (0 nm), (b) 30nm, (c) 40 nm, (d) 45 nm, (e) 50 nm, scale bar indicates 100 nm.

이와 같이 제작된 각기 다른 크기 나노기공 표면의 특성을 분석하기 위하여 물접촉각을 확인하여 보았다. 물접촉각은 나노구조체의 크기, 양, 배열에 따라 넓은 범위 안에서 변화 될 수 있다는 결과는 많은 논문을 통하여 확인할 수 있다. 또한 물접촉각의 변화는 세포의 흡착에 큰 영향을 미친다는 것 또한 많이 발표되어 있다. 따라서 우리가 제작한 각기 다른 넓이의 나노기공 표면에서의 물접촉각의 확인은 세포 흡착에 중요한 요소로서 작용된다. 나노기공이 존재하지 않은 평평한 알루미늄산화막은 평균 80°의 물접촉각을 갖는 것으로 측정되었다 (Fig. 2). 이는 세포 흡착율이 좋은 물접촉각 범위인 40~70°을 벗어나있다. 이렇듯 기본 80°의 물접촉각을 가진 표면 위에 나노기공이 생성되면서, 표면의 소수성이 변화하는 것을 알 수 있는데, 나노기공의 크기가

작은 경우, 표면은 매우 친수화 되는 반면에, 나노기공이 커지면서 다시 소수화되는 경향을 보인다. 또한, 나노기공의 크기가 증가하면 점점 증가되는 것이 아니라 40~50 nm에서는 거의 비슷한 물접촉각을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 표면 특성분석을 통하여 나노기공의 넓이가 30 nm와 40 nm의 이상의 깊이에서 다른 특성을 나타내는 것으로 확인할 수 있었다.

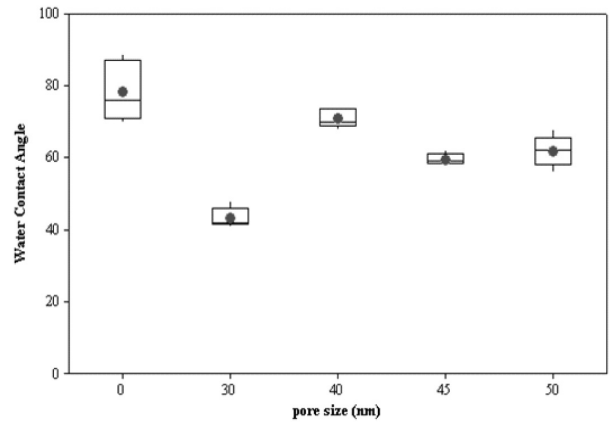


Fig. 2. The effect of the diameter of nanoporous surface on the hydrophobicity of the solid surface.

3.2. 단백질 흡착

세포를 배양 시 사용되는 배지 속에는 다양한 단백질이 존재한다. 이러한 단백질들은 세포가 표면에 부착되는 시기에 많은 도움을 주게 된다. 따라서 표면 위에 단백질 흡착 정도의 차이는 세포 성장에 차이를 대변해 줄 수 있는 지표로서 작용하게 된다. 따라서 우리는 BSA에 형광이 부착되어있는 BSA-FITC conjugated 물질을 이용하여 나노기공 표면 위에 일정 시간 동안 흡착시킨 뒤, 부착된 단백질 양을 측정함으로써, 세포흡착전 표면의 특성을 미리 파악하고자 하였다. 각각의 나노기공 표면 위에 흡착된 단백질 양을 FITC 형광물질의 형광량으로 확인 할 수 있었다 (Fig. 3(a)). 평평한 표면의 산화알루미늄에서는 단백질의 흡착이 거의 보이지 않았으며, 30 nm의 표면 위에서 가장 좋은 흡착율을 보였고, 40 nm부터 나노기공이 넓어질수록 단백질 흡착율이 감소하였다. 이러한 결과는 앞서 확인된 물접촉각의 특성확인과는 좀 다른 양상을 보여 정확한 현상확인을 위하여 본 연구에서는 주사전자현미경을 이용하여 나노기공에 흡착된 단백질을 확인하여 보았다 (Fig. 3(b)~(c)). 정확한 확인을 위하여 상부면뿐만 아니라 단면을 통하여도 확인하였다. 평평한 표면 위에서의 단백질은 일정하게 부착은 되어 있으나 많은 양의 단백질이 아닌 단층으로 고르게 흡착되어 있어 가장 낮은 흡착을 보였던 것으로 판단이 되며, 30 nm의 표면 위에서는 단백질이 두껍게 흡착이 되어있는 것을 확인 할 수 있었다. 40 nm 크기의 나노기공 표면부터는 나노기공이 커지면서 단백질이 나노기공을 채우지 못하는 것을 볼 수 있었다. 물접촉각 결과와 단백질 결과를 해석해볼 때, 30 nm 크기의 나노기공은 나노기공이 있지만, 나노기공이 매우 작아, 표면의 면적이 넓어지는 효과를 보이지만 (물접촉각이 감소하고,

단백질 흡착량이 증가), 나노기공 크기가 40 nm 이상이 되면서, 물과 단백질이 접촉하는 면적이 감소하는 효과 (물접촉각이 증가하고, 단백질 흡착량이 감소)가 나타나는 것은 물분자와 단백질분자가 30 nm 이하의 크기의 나노기공의 존재 하에서는 나노기공의 깊이를 인지하지 못하는 것으로 판단할 수 있다. 그럼으로, 30 nm 크기의 나노기공을 가진 표면에서는 나노 구조에 의해 물분자가 흡착할 수 있는 면적이 증가하고, 또한 단백질이 흡착할 수 있는 면적이 증가하는 것으로 판단된다. 하지만, 나노기공이 없는 표면의 경우, 단백질 흡착량이 매우 낮은 것으로 보아, 단백질의 흡착량에 영향을 주는 인자는 표면의 소수성이 제일 큰 영향을 미치며, 그 후, 단백질이 흡착할 수 있는 면적의 양, 그리고, 단백질이 흡착하는 표면의 거칠기 (구조)로 판단된다.

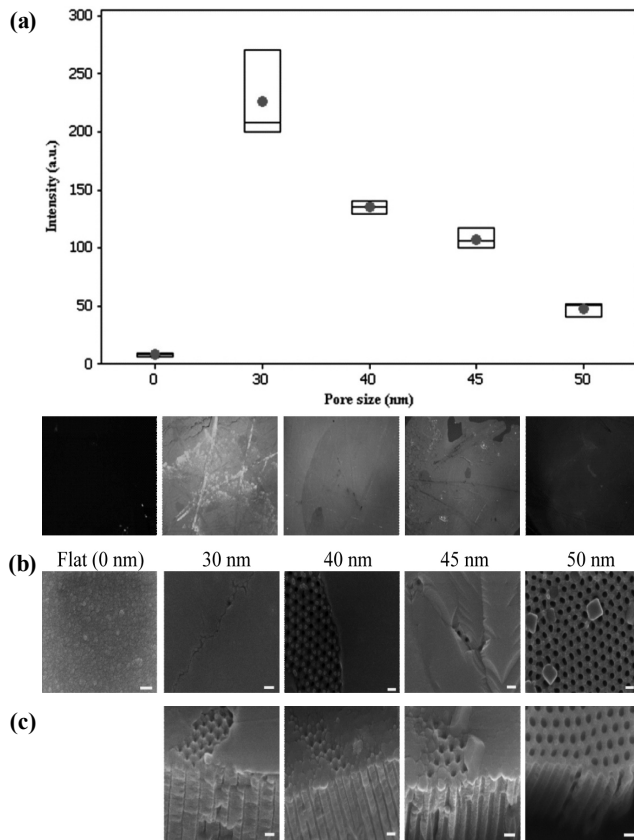


Fig. 3. The adsorption of FITC tagged BSA on various nanoporous structure; (a) fluorescent intensities and SEM images (b) top view, (c) side view, scale bar indicates 100 nm.

3.3. 세포 행동양식 분석

앞에서 분석된 다양한 크기의 나노기공을 보유한 표면 위에 Hela 세포를 배양함으로써, 세포거동에 나노기공 구조가 어떠한 영향을 주는지 확인하였다. Hela 세포는 세포집 연구에 많이 이용되는 안정된 암세포로서, 기본적으로 빠른 증식 속도를 보이는 세포이다. 그럼에도 불구하고, 2일 동안 세포를 부착시켜 세포 증식 정도를 확인해본 결과 나노기공이 존재하지 않는 알루미늄 표면에서는 세포가 거의 자라지 못한 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4). 이는 앞서 분석된 바와

같이 표면의 물접촉각과 단백질의 흡착 정도가 낮아 세포 또한 잘 자라지 못한 것으로 판단된다. 나노기공이 존재하는 표면에서의 세포 증식은 30 nm의 넓이에서 가장 세포 증식 속도가 높은 것으로 나타났으며, 나노기공의 넓이가 넓어지면서 세포 증식속도는 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 물접촉각의 변화량과는 조금 다르고, 단백질 흡착 분석과는 유사한 결과를 확인할 수 있었다. 나노기공의 지름이 50 nm인 나노기공 표면에 배양된 세포량과 나노기공이 존재하지 않는 표면의 세포량을 비교하면, 단백질 흡착과는 달리, 50 nm 나노기공 표면의 세포증식속도가 낮은 것을 알 수 있다. 이는 단백질이 어느 정도 흡착을 하여도, 세포가 흡착할 수 있는 표면적이 감소하고, 흡착의 어려움이 있는 세포는 증식에 문제가 있는 것으로 판단된다. 이에 대한 원인을 좀더 자세히 확인하기 위하여 SEM을 이용하여 나노기공 표면 위에서의 세포의 흡착상태를 전체의 세포, 세포의 세포질, 세포질 옆면 이렇게 세 부분으로 자세히 확인을 하였다. 각 나노기공 표면에서의 전체의 세포의 형태는 세포 성장 속도가 큰 30 nm에서 세포가 넓게 부착되어 있는 것을 확인할 수 있었으며, 반면에 성장 속도라 작은 50 nm 표면 위에서는 세포질이 표면 위에 뻗지 못하고 있는 모습을 확인할 수 있었다 (Fig. 5(a)). 따라서 나노기공 표면에 형성된 세포질의 상태는 30 nm 표면에서는 세포질이 나노기공을 덮으면서 펼쳐져 있는 것을 확인할 수 있었고, 40과 45 nm의 표면에서 또한 정량적으로 판별할 수는 없었지만 나노기공을 덮으며 흡착되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 50 nm의 표면에서는 세포질이 나노기공을 넓게 덮지 못하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 5(b)). 이는 앞서 단백질 흡착분석에서 단백질이 50 nm에서는 거의 흡착되지 않아 세포질이 뻗을 수 있는 공간형성을 제대로 하지 못하고 있음을 확인할 수 있었다. 이는 옆면의 이미지를 통하여 자세히 관찰할 수 있으며, 평평한 표면에서의 세포단면은 온전한 단면이 아닌 세포가 표면에 부착된 옆면을 확인할 수 있는 이미지이다 (Fig. 5(c)). 평평한 표면 위에서의 세포질 이미지를 보면 세포질 옆으로 단백질이 부착되어 있는 것 확인할 수 있으며, 세포질이 뻗어나가는데 단백질 흡착이 영향을 주는 것을 재확인할 수 있었다. 다만, 나노기공이 있는 표면 위에서는 BSA-FITC conjugated 단백질과는 다르게 기공이 보이는 것으로 실제로 배지 안의 단백질들은 좀 더 작으므로 부착되는 것을 확인할 수 있었다.

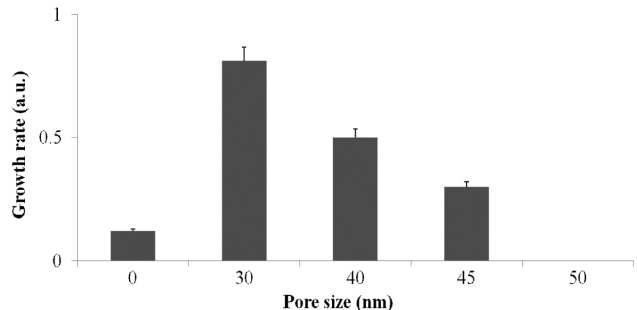


Fig. 4. Growth rate of cells 2 day-cultivated on various nanoporous surface.

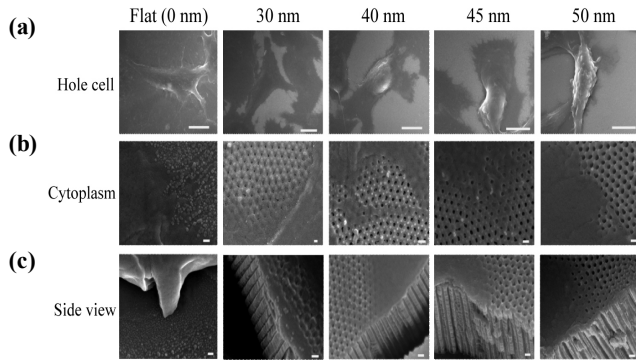


Fig. 5. SEM images of cell adhered on various nanoporous surface; (a) Hole cell, (b) cell cytoplasm, (c) side view, scale bars are 10 μm in (a) and 100 nm in (b) and (c).

4. 결론

본 연구에서는 나노구조표면이 세포의 행동양식에 미치는 영향을 파악하기 위하여 다양한 미세기공을 표면에 형성하고 헬라세포의 흡착/성장속도를 조사하였다. 헬라세포는 평평한 알루미늄 산화막표면보다, 30 nm 지름의 구조표면에서 성장속도가 4배 증가한 것으로 보아, 세포주변의 물리적 환경 변화는 세포의 행동양식에 영향을 미칠 수 있다고 판단된다. 이와 같은 물리/기계적 세포환경 연구는 향후, 세포막내 존재하는 단백질 및 세포내 핵산 분석 등 미시적 연구와 결합된다면, 세포의 성장/전이/사멸 등 세포의 일생을 물리적인 환경변화로 조절할 수 있을 것으로 판단되고, 많은 의학/약학 분야에 응용이 가능하리라 판단된다.

감사

이 논문은 2011년도 경원대학교 교내연구비지원 및 정부 (교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 원천기술개발사업 (No.2011-0027787) 및 기초연구사업 (No.2011-0022060) 지원 및 지식경제부의 산업원천기술개발사업으로 지원된 연구임 (No.10037397).

References

1. Karuri, N. W., S. Liliensiek, A. I. Teixeira, G. Abrams, S. Campbell, P. F. Nealey, and C. J. Murphy (2004) Biological length scale topography enhances cell-substratum adhesion of human corneal epithelial cells. *J. Cell Sci.* 117: 3153-3164.
2. Cai, K., J. Bossert, and K. D. Jandt (2006) Does the nanometrescale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation? *Coll. and Surf. B: Biointer.* 49: 136-144.
3. Teixeira, A. I., G. A. McKie, J. D. Foley, P. J. Bertics, P. F. Nealey, and C. J. Murphy (2006) The effect of environmental factors on the response of human corneal epithelial cells to nanoscale substrate topography. *Biomaterials* 27: 3945-3954.
4. Shin H. (2007) Fabrication methods of an engineered

- microenvironment for analysis of cell-biomaterial interactions. *Biomaterials* 28: 126-133.
5. Polte, T. R., M. Shen, J. Jaravitis, M. Montoya, J. Pendse, S. Xia, E. Mazur, and D. E. Ingber (2007) Nanostructured magnetizable materials that switch cells between life and death. *Biomaterials* 28: 2783-2790.
6. Vetrone, F., F. Variola, P. T. Oliveira, S. F. Zalzal, J. H. Yi, J. Sam, K. F. Prado, A. Sarkissian, D. F. Perepichka, J. D. Wuest, F. Rosei, and A. Nanci (2009) Nanoscale oxidative patterning of metallic surfaces to modulate cell activity and fate. *Nano Lett.* 9: 659-665.
7. Richert, L., F. Vetrone, J. H. Yi, S. F. Zalzal, J. D. Wuest, F. Rosei, and A. Nanci (2008) Surface nanopatterning to control cell growth. *Adv. Mater.* 20: 1488-1492.
8. Flemming, R. G., C. J. Murphy, G. A. Abrams, S. L. Goodman and, P. F. Nealey (1999) Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. *Biomaterials* 20: 573-588.
9. Pan, H. A., Y. C. Han, C. W. Su, S. M. Tai, C. H. Chen, F. H. Ko, and G. S. Huang (2009) A Nanodot Array Modulates Cell Adhesion and Induces an Apoptosis-Like Abnormality in NIH-3T3 Cells. *Nanoscale Res. Lett.* 4: 903-912.
10. Kim, P., D. H. Kim, B. Kim, S. K. Choi, S. H. Lee, A. Khademhosseini, R. Langer, and K. Y. Suh (2005) Fabrication of nanostructures of polyethylene glycol for applications to protein adsorption and cell adhesion. *Nanotechnology* 16: 1-10.
11. Martinez, E., E. Engle, J. A. Planell, and J. Samitier (2009) Effects of artificial micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. *Ann. Anat.* 191: 126-135.
12. Wang, D. A., J. Ji, Y. H. Sun, J. C. Shen, L. X. Feng, and J. H. Elisseeff (2002) In situ immobilization of proteins and RGD peptide on polyurethane surfaces via poly (ethylene oxide) coupling-olymers for human endothelial cell growth. *Biomacromolecules* 3: 1286-1295.
13. Swan, E. E. L., K. C. Papat, and T. A. Desai (2005) Peptide-immobilized nanoporous alumina membranes for enhanced osteoblast adhesion. *Biomaterials* 26: 1969-1976.
14. Khademhosseini, A., K. Y. Suh, J. M. Yang, G. Eng, J. Yeh, S. Levenberg, and R. Langer (2004) Layer-by-layer deposition of hyaluronic acid and poly-L-lysine for patterned cell co-cultures. *Biomaterials* 25: 3583-3592.
15. Khang, D., S. Y. Kim, P. L. Snyder, G. T. R. Palmore, S. M. Durbin, and T. J. Webster (2007) Enhanced fibronectin adsorption on carbon nanotube/poly(carbonate) urethane: independent role of surface nano-roughness and associated surface energy. *Biomaterials* 28: 4756-4768.
16. Choi, C. H., S. H. Hagvall, B. M. Wu, J. C. Y. Dunn, R. E. Beygui, and C. J. Kim (2007) Cell interaction with three-dimensional sharp-tip nanotopography. *Biomaterials* 28: 1672-1679.
17. Crouch, A. S., D. Miller, K. J. Luebke, and W. Hu (2009) Correlation of anisotropic cell behaviors with topographic aspect ratio. *Biomaterials* 30: 1560-1567.
18. Chung, S. H. and J. Min (2008) A microscopic investigation on the effect of hydrophobic properties on cell adhesion on a PDMS surface. *Biochip J.* 2: 141-147.
19. Chung, S. H., S. J. Son, and J. Min (2010) The nanostructure effect on the adhesion and growth rates of epithelial cells with well-defined nanoporous alumina substrates. *Nanotechnology* 21: 125104.
20. Masuda H. and K. Fukuda (1995) Ordered metal nanohole

- arrays made by a two-Step replication of honeycomb structures of anodic alumina. *Science* 269: 1466-1468.
21. Li, A. P., F. Muller, A. Birner, K. Nielsch, and U. J. Goesele (1998) Polycrystalline nanopore arrays with hexagonal ordering on aluminum. *J. Appl. Phys.* 84: 1428-1431.
 22. Suh, K. Y., A. Khademhosseini, J. M. Yang, G. Eng, R. Langer (2004) Soft lithographic patterning of hyaluronic acid on hydrophilic substrates using molding and orinting. *Adv. Mater.* 16: 584-588.
 23. Sweetman, M. J., F. J. Harding, S. D. Graney, and N. H. Voelcker (2011) Effect of oligoethylene glycol moieties in porous silicon surface functionalisation on protein adsorption and cell attachment. *App. Sur. Sci.* 15: 6768-6774.
 24. Prudhomme, W., G. Q. Daley, P. Zandstra, and D. A. Lauffenburger (2004) Multivariate proteomic analysis of murine embryonic stem cell self-renewal versus differentiation signaling. *PNAS* 2: 2900-2905.
 25. Anazawa, Y., H. Nakagawa, M. Furihara, S. Ashida, K. Tamura, H. Yoshioka, T. Shuin, T. Fujioka, T. Katagiri, and Y. Nakamura (2005) PCOTH, a novel gene overexpressed in prostate cancers, promotes prostate cancer cell growth through phosphorylation of oncoprotein TAF-Ibeta/SET. *Cancer Res.* 65:4578-4586.