

아가로스 겔에 포함된 세포의 농도가 확산 계수에 미치는 영향 측정

이병룡* · 진송완†

Measurement of Diffusion Coefficient in Cell-Laden Agarose Gel with Different Cell Concentrations

Byung Ryong Lee and Songwan Jin

Abstract. In this study, diffusion coefficients of 20 kDa FITC-dextran in 2% agarose gel with different cell concentrations were measured using fiberoptic-based fluorescence recovery after photobleaching technique. As increasing cell concentration suspended in agarose gel, the diffusion coefficients were decreased. The diffusion coefficient of agarose gel which contains 10×10^6 cells/ml was decreased to 11% that of in agarose gel without cells. The distribution of fluorescence dye in 3D scaffold was also simulated. The simulation result shows that the diffusion coefficient is more significant factor than the scaffold structure.

Key Words: Diffusion Coefficient(확산계수), Fiberoptic-base FRAP(광섬유 기반 형광광표백기법), Cell-laden Agarose Gel(세포 혼합 아가로스 겔), Scaffold(인공지지체)

1. 서 론

조직공학은 생명과학과 다양한 분야의 공학이 융합된 학문 분야로써 신체 조직이나 장기의 기능을 복원 및 재생시키는 것을 목적으로 한다. 조직공학에서 흔히 사용되는 인공지지체는 손상된 조직 및 기관의 기능을 재생 및 복원하기 위한 조직공학의 핵심요소로써, 조직이 3차원 구조로 성장하는데 있어 세포의 부착, 분화, 성장 및 이동에 필요한 물리적 환경을 제공한다. 이러한 인공지지체 내부로의 물질 전달은 대부분 확산을 통하여 이루어지며⁽¹⁾, 이를 통하여 세포 성장에 필요한 산소와 영양분을 공급하게 된다. 현재까지 개발된 많은 인공지지체에서는 세포가 인공지지체에서 증식됨에 따라 인공지지체 내부의 세포가 괴사되는 문제점이 관찰되고 있는데, 이는 산소 및 영양분이 인공지지체 내부에까지 확산되지 못하여 발생하는 것으로 생산가능한 조직의 크기를 키우고 생산효율을 높이기 위해서는

반드시 해결되어야 하는 문제이다. 지금까지 이러한 문제의 해결방안을 찾고자 많은 연구자들이 인공지지체 내부의 확산 현상과 관련된 많은 연구를 진행하고 있다^(2,3). 하지만, 현재까지 진행된 많은 확산현상 시뮬레이션 연구에서는 조직 내의 세포개체수의 변화에 따른 확산계수 변화에 대한 정보의 부재로 인하여 대부분 물질의 확산계수는 세포의 개체수 변화에도 불구하고 일정하다고 가정하여서, 정확한 예측결과를 얻어내기 힘든 문제가 있었다. 그러므로 본 연구에서는 조직이 재생됨에 따라 늘어나는 세포 개체수가 조직내의 확산현상에 미치는 영향을 알아보고자 아가로스 겔 내의 세포 개체 수의 변화에 따른 20 kDa FITC-dextran 염료의 확산계수 변화를 광섬유 기반 형광 광표백 기법(Fiberoptic-Based Fluorescence Recovery After Photobleaching: Fiberoptic-based FRAP)을 이용하여 측정하였다. 이러한 연구를 통하여 조직내의 세포 개체수 변화에 따른 확산계수의 변화를 실험적으로 관찰할 수 있었다. 또한 이 실험 결과를 통하여 인공지지체 내부의 확산과 물질전달을 이해하는데 도움이 될 것으로 예상된다.

†한국산업기술대학교 기계공학과

E-mail : songwan@kpu.ac.kr

*한국산업기술대학교 대학원 기계공학과

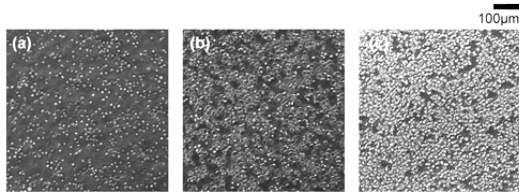


Fig. 1. Cell-laden agarose gel matrix: (a) 2.0×10^6 cells/ml, (b) 5.0×10^6 cells/ml, (c) 10×10^6 cells/ml.

2. 실험 장치 및 방법

2.1 세포혼합 아가로스 겔 제작

실험에 사용될 세포혼합 아가로스 겔은 세포 배양액 1 ml에 아가로스(Promega, Agarose, Low Melting Point, Analytical Grade) 0.02 g을 첨가하여 녹인 후 HeLa 세포를 각각 2.0×10^6 , 5.0×10^6 , 7.0×10^6 , 9.0×10^6 , 9.5×10^6 , 10×10^6 cells/ml 첨가하여 제작되었다(Fig. 1). 이 때 전체 부피 중 세포가 차지하는 부피는 각각 0.005%, 0.013%, 0.018%, 0.023%, 0.024%, 0.026%이다. 일반적으로 세포 지지체를 이용하여 조직재생을 하는 경우 파종세포의 개수는 연구에 따라 차이가 있지만 1.0×10^6 에서 4.0×10^6 가(4,5) 가장 많이 쓰이므로 본 연구에서는 최저 농도 샘플의 세포 농도를 2.0×10^6 로 설정하였으며, 최고 농도 샘플의 세포 농도는 사람 연골세포의 평균 세포농도인 10×10^6 로 설정하였다(6,7). 이렇게 만들어진 아가로스 겔을 20 kDa FITC-Dextran (Sigma Aldrich)과 혼합한 후 36.5°C로 유지되고 있는 항온수조에서 보관, 실험하였다. 특히 형광염료가 시편 내에서의 확산현상에 미치는 영향을 최소화하기 위하여 형광염료의 농도를 0.1 mM로 맞추었으며 많은 실험에서 본 연구에서 사용된 농도와 유사한 농도로 실험을 수행한 바 있다(8,9,10). 또한 세포가 첨가된 샘플과 별도로 세포를 첨가하지 않은 2% 아가로스 겔과 물에서의 확산계수를 별도로 측정하였다.

2.2 광섬유 기반 형광 광표백 장치

형광 광표백(FRAP) 기법은 형광물질로 염색된 매질에 강한 세기의 레이저 빛을 조사하여 광표백시킨 후 광표백된 영역으로 형광물질이 확산되면서 형광신호가 회복되는 과정을 분석하여 확산계수를 측정하는 방법이다(11). 이러한 형광 광표백 기법 중 광섬유 기반 형광 광표백기법은 수백 µm 지름을 갖는 광섬유를 3차

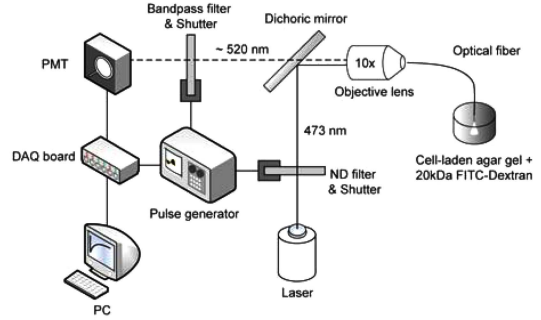


Fig. 2. Schematic of fiberoptic-based FRAP experiment.

원 구조에 삽입하여 기존 방법으로는 측정이 불가능했던 3차원 구조의 깊은 지역에서 발생하는 확산 현상을 직접적으로 관찰하고 및 확산계수의 변화를 측정할 수 있는 방법으로 본 실험에서 사용되는 아가로스 겔과 같은 하이드로젤 인공지지체(12)나 실제 조직(13,14)과 같은 실험체 내의 확산현상을 관찰하는데 적합한 방법이라 할 수 있다.

본 연구에 사용된 광섬유 기반 형광 광표백기법 실험장치의 모식도를 Fig. 2에 나타내었다. 본 실험장치에서는 형광 염료를 광표백하고 광표백 이후 확산되는 염료를 관찰하기 위하여 473 nm 파장의 100 mW DPSS Blue Laser를 사용하였다. 레이저의 빛은 색분리 거울(Dichroic mirror)에 반사된 후 10배 대물렌즈(Edmond Din10X)를 이용하여 주분 제작된 광섬유(AinnoTech, Multimode optical fiber 200 µm diameter core)의 시작부분에 초점을 맞추어 빛이 광섬유를 통하여 실험 샘플로 이동될 수 있도록 하였다. 광섬유 끝부분은 약 2.0 mm 길이로 샘플내부에 삽입되었으며 삽입된 광섬유 끝에서 공급되는 레이저 빛(약 30 mW)을 이용하여 500 ms 동안 샘플을 광표백 시켰다. 주변 염료의 확산에 의해 회복되는 빛을 추가적인 광표백을 최소화한 상태로 관찰하기 위하여 색분리 거울 앞의 기계적 셔터에 장착 되어있는 ND(Neutral density) 필터로 레이저 빛을 약 0.5 mW로 감소 시켰다. 광표백된 영역 내로 확산되는 염료의 빛은 광섬유 끝에서 공급되는 약해진 레이저 빛을 통하여 여기되고 광섬유를 통하여 다시 대물렌즈로 전해지게 된다. 대물렌즈를 통과하는 빛을 색분리 거울과 대역통과필터(Band pass filter)를 통과시킨 후 PMT(Photomultiplier tube, H9306-04, Hamamatsu)를 사용하여 측정하였다. PMT에서 나

오는 신호는 A/D converter(Ni UBS 6221, National instrument)를 이용하여 수집 되었으며, 정확한 셔터의 움직임과 데이터 획득 시간 등을 조절하기 위하여 신호 생성기(9500 Digital Delay Pulse Generator, Quantum)를 사용하였다.

준비된 샘플을 이용하여 표면으로부터 약 2 mm 깊이의 아가로스 겔 내부에서의 확산현상을 앞서 기술한 광섬유 기반 형광 광표백 장치를 이용하여 관찰하였다. 인큐베이터 외부에서 HeLa 세포가 생존할 수 있는 시간이 상온에서 매우 짧으므로 샘플 제작 후 2시간 이내에 실험 완료하였으며 확산 현상에 영향을 미칠 수 있는 세포와 겔 간의 표면장력의 온도에 따른 변화를 최소화하고 생체장기와 유사한 환경적 조건을 만들어주기 위하여 샘플의 온도를 항온수조 내에서 36.5°C로 유지시키며 실험하였다. 데이터의 정확성을 높이기 위하여 각 샘플 당 다른 위치에서 10번 이상 측정하였으며 동일한 조건의 샘플을 3개 이상 사용하여 실험하였다.

2.3 실험 결과 분석

광섬유 기반 형광 광표백 기법으로 취득한 샘플의 데이터로 확산계수를 계산하기 위하여 정규화된 빛의 강도($f(t)$)를 아래와 같은 식 (1)을 이용하여 구하였다⁽¹⁵⁾.

$$f(t) = \frac{F(t) - F(0)}{F(\infty) - F(0)} \quad (1)$$

이 식에서 $F(\infty)$ 는 광표백 전의 빛의 밝기를 나타내며, $F(0)$ 는 광표백 직후의 밝기를 나타낸다. PMT로 측정된 형광회복 신호를 식(1)을 이용하여 정규화(Normalize)하고 정규화된 곡선을 분석하여 형광의 강도가 50% 회복되는 시간($t_{1/2}$)을 계산 하였다. 광섬유 기반 형광 광표백 기법으로 취득한 데이터의 3차원 확산계수는 광섬유의 팁의 끝부분 상태와 모양에 따라서 형광의 강도가 50% 회복되는 시간($t_{1/2}$)이 달라질 수 있기 때문에 이를 이용하여 절대적인 확산계수를 계산할 수 없다. 그러므로 식(2)와 같이 물에서 측정된 값($t_{1/2, solution}$)과 비교하여 상대적인 값으로 나타내었다.

$$\frac{D_{sample}}{D_{solution}} = \frac{t_{1/2, solution}}{t_{1/2, sample}} \quad (2)$$

3. 결과 및 토의

Fig. 3에 본 실험을 통하여 얻어진 대표적인 회복곡

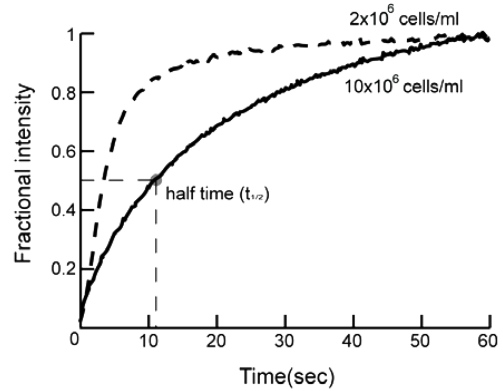


Fig. 3. Recovery curve of 20 kDa FITC- dextran in 2.0×10^6 cells/ml(---) and 10×10^6 cells/ml(—)matrices.

선을 나타내었다. 그림에서 볼 수 있듯이 광표백으로 인하여 감소된 빛의 밝기가 광표백영역외부로부터 확산된 광표백되지 않은 염료로 인하여 점차 회복되는 것을 볼 수 있었으며 그림에 점선으로 표시된 상대적으로 적은 세포가 포함되어 있는 샘플의 경우 많은 수의 세포가 포함되어 있는 샘플에 비하여 회복 속도가 빠르고 이 작아지는 것을 알 수 있었다. 세포가 포함되지 않은 아가로스 겔과 10×10^6 cells/ml의 세포가 포함된 아가로스 겔에서의 20 kDa FITC-dextran의 확산계수는 각각 물에서 측정된 값의 52%와 11% 수준으로 감소하였다.

세포 농도 변화에 따른 확산계수의 변화를 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 4에서 볼 수 있듯이 세포의 체적 비율이 클수록 확산계수는 점차 감소하는 것을 알 수 있

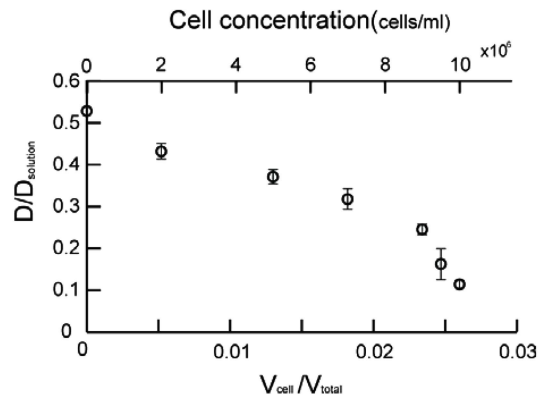


Fig. 4. Relative diffusion coefficients ratio versus cell concentration and volume fraction of cell.

Table 1. struts component ratio and volume fraction of simulated model

Model NO.	Strut width	Strut volume	Cell volume fraction in the tissue domain	Initial concentration of dye at the bottom phase	Initial concentration of dye without bottom phase
model 1	300 μm	50%	0.026%	0.1 mol/ml	0 mol/ml
model 2	150 μm	50%	0.026%	0.1 mol/ml	0 mol/ml
model 3	150 μm	25%	0.026%	0.1 mol/ml	0 mol/ml
model 4	150 μm	50%	0 (agarose)%	0.1 mol/ml	0 mol/ml

였으며, 감소 비율은 세포의 부피비가 증가할수록 점차 증가하는 것으로 측정되었다. 20 kDa FITC-dextran의 물에서의 확산계수는 $1.026 \times 10^{-4} \text{ mm}^2/\text{s}$ 라고 알려져 있다⁽¹⁶⁾. 이 값과 본 실험에서 측정된 확산계수의 비율을 이용하여 계산된 각 확산계수는 세포가 포함되지 않은 아가로스 겔의 경우 약 $5.376 \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$ 이고, $10 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ 의 세포가 포함된 샘플의 경우 약 $1.169 \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$ 이다. 계산된 확산계수 값을 이용하여 3차원 격자형 인공지지체 내에서의 확산 현상을 Comsol Multiphysics 4.2a를 이용하여 시뮬레이션 해 보았다⁽¹⁷⁾. 본 연구에서 사용된 3차원 격자형 인공지지체 모델의 특성 및 물성치를 Table 1에 정리 하였다. 인공지지체 모델 뼈대의 폭은 MSTL(Microsterolithography)와 같은 기술을 사용하여 제작가능한 범위인 150 μm 와 300 μm 로 가정하였으며, 인공지지체의 뼈대 사이

조직부분의 확산 계수는 앞서 계산된 값인 $5.376 \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$ 과 $1.169 \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$ 로 가정하였다. 모델 2의 경우 조직 부분이 3차원 격자형 인공지지체 내에서 차지하는 비율을 모델 3에 비하여 2배 크게 설정하여 인공지지체 내에서 차지하는 조직의 부피비율이 확산현상에 미치는 영향을 파악 하고자하였다. 전체 모델의 바닥면은 20 kDa FITC-dextran이 0.1 mol/ml로 유지되고 있는 수용액에 노출되어 있다고 가정하였으며 그 외 경계는 모두 대칭 및 벽 조건으로 가정하였다. 각 모델 도메인의 가로 세로 크기는 각각 1.2 mm, 1.2 mm로 설정하였으나 경계면의 대칭 경계조건으로 인하여 무

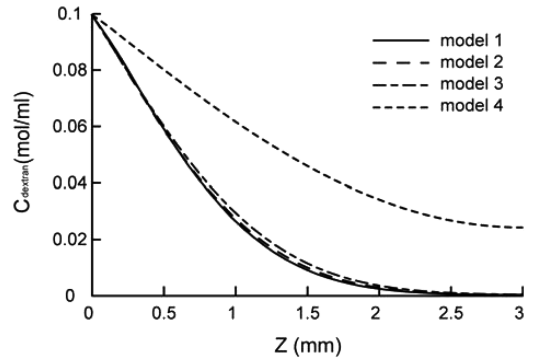


Fig. 6. Height-based concentration data in the model.

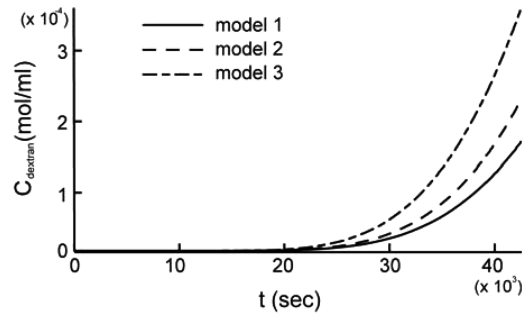


Fig. 7. Time-based concentration data in the models.

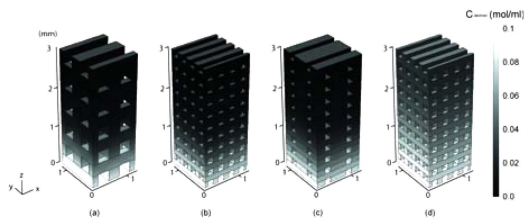


Fig. 5. Distribution of 20 kDa FITC-dextran at 24hr. (a) model 1, (b) model 2, (c) model 3, (d) model 4.

한히 넓은 평판을 모사한 것과 같은 결과를 얻을 수 있었다. Fig. 5에 24시간이 지난 후 각 모델에서의 농도 분포를 나타내었다. Fig. 5에서 볼 수 있듯이 모델 1, 2, 3의 경우 농도분포의 차이가 크게 나타나지 않았지만 아가로스 겔에서의 확산계수로 설정한 모델 4의 경우 다른 모델 보다 확산이 더 빠르게 된 것을 알 수 있었다. 이러한 현상을 좀 더 명확하게 관찰하기 위하여 각 모델들의 높이에 따른 염료의 농도 분포를 Fig. 6에 나타내었다. 세포가 포함되지 않은 아가로스 겔을 가정한 모델 4의 경우 다른 모델에 비해 확산이 잘되는 것을 확인할 수 있었으며 모델 1, 2, 3의 경우 24시간이 지난 후에도 인공지지체의 중앙부분까지 염료가 전

달되지 않는 것으로 나타났다. 인공지지체의 구조 변화에 따른 확산 현상의 차이를 관찰하기 위하여 Fig. 7에 모델 1, 2, 3의 중앙에서의 시간에 따른 농도 변화를 나타내었다. 그림에서 볼 수 있듯이 뼈대가 굵은 인공지지체 모델 1의 경우 다른 모델들에 비하여 확산 속도가 느린 것을 알 수 있었으며 확산 가능한 부분의 부피가 큰 모델 3이 가장 확산 속도가 빠른 것을 알 수 있었다.

4. 결 론

인공지지체 내부로의 물질 전달은 확산을 통하여 이루어지며, 이를 통하여 세포 생장에 필요한 산소 및 영양분을 공급하게 된다. 따라서 인공지지체에서 세포의 생장에 관련된 확산에 대한 정확한 데이터는 중요성이 높아지고 있다. 본 연구에서는 광섬유 기반 형광 광표백 기법을 사용하여 아가로스 겔 내부 세포 농도에 따른 확산변화를 측정하였다. 이를 통하여 아가로스 겔 내에서 세포의 개체수가 증가함에 따라 20 kDa FITC-dextran 확산계수가 감소하는 현상을 관찰할 수 있었으며, 이러한 결과는 Magzoub 등⁽¹⁴⁾의 연구 결과와 유사하다고 판단된다. 실험결과를 시뮬레이션에 이용하여 인공지지체 내의 확산 현상을 모델 별로 비교, 분석한 결과 인공지지체의 구조적 변화보다 확산계수의 변화가 큰 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다. 이러한 시뮬레이션 결과로부터 향후 인공지지체를 제작할 때 확산현상으로 인하여 발생할 수 있는 문제를 최소화 할 수 있는 형상을 예측하는데 도움이 있을 것으로 판단된다.

후 기

이 논문은 2012 교육과학기술 기술부의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업(20120004066)의 지원을 받아 수행된 것임.

참고문헌

- Kim, J. K., 2007, "Understanding Diffusion in Cells and Living Tissues", J. Korean Soc. Visual., Vol. 5, No. 1, pp. 12-15.
- Mauck, R. L., Soltz, M. A., Wang, C. C., Wong, D. D., Chao, P. H., Valhmu, W. B., Hung, C. T. and Ateshian, G. A., 2000, "Functional Tissue Engineering of Articular Cartilage Through Dynamic Loading of Chondrocyte-Seeded Agarose Gels", J. Biomech Eng., Vol. 122, No. 3, pp. 252-260.
- Mauck, R. L., Wang, C. C., Oswald, E. S., Ateshian, G. A. and Hung, C. T., 2003, "The role of cell seeding density and nutrient supply for articular cartilage tissue engineering with deformational loading", Osteoarthritis and Cartilage, Vol. 11, No. 12, pp. 879-890.
- Kim, H. J., Park, S. H., Durham, J., Gimble, J. M., Kaplan, D. L. and Dragoo, J. L., 2012, "In vitro chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells with silk scaffolds", J Tissue Eng., Vol. 3, No. 1, 2041731412466405.
- Hsieh-Bonassera, N. D., Wu, I., Lin, J. K., Schumacher, B. L., Chen, A. C., Masuda, K., Bugbee, W. D. and Sah, R. L., 2009, "Expansion and redifferentiation of chondrocytes from osteoarthritic cartilage: cells for human cartilage tissue engineering", Tissue Eng Part A., Vol. 15, No. 11, pp. 3513-3523.
- Salinas, C. S. and Anseth, K. S., 2008, "The enhancement of chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by enzymatically regulated RGD functionalities", Biomaterials, Vol. 29, No. 15, pp. 2370-2377.
- Hunziker, E. B., Quinn, T. M. and Häuselmann H. J., 2002 "Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage," Osteoarthritis Cartilage, Vol. 10, No. 7, pp. 564-572.
- Ballerstadt, R. and Schultz, J. S., 1997, "Competitive-binding assay method based on fluorescence quenching of ligands held in close proximity by a multivalent receptor", Anal Chim Acta., Vol. 345, No. 1-3, pp. 203-212
- Liu, Y., Zhou, S., Tu, D., Chen, Z., Huang, M., Zhu, H., Ma, E. and Chen, X., 2012, "Amine-functionalized lanthanide-doped zirconia nanoparticles: optical spectroscopy, time-resolved fluorescence resonance transfer biodetection, and targeted imaging", J Am Chem Soc., Vol. 134, No. 36, pp. 15083-15090
- Fowlkes, J.D., Hullander, E. D., Fletcher, B. L., Retterer, S. T., Melechko, A. V., Hensley, D. K., Simpson, M. L. and Doktycz, M. J., 2006, "Molecular transport in a crowded volume created from vertically aligned carbon nanofibres: a fluorescence recovery after photobleaching study", Nanotechnology., Vol.

- 17, No. 22, pp. 5659-5668.
- 11) Axelrod, D., Koppel, D. E., Schlessinger, J., Elson, E. and Webb, W. W., 1976, "Mobility Measurement by Analysis of Fluorescence Photobleaching Recovery Kinetics", *Biophys. J.*, Vol. 16, No. 9, pp. 1055-1069.
 - 12) Lam, C. X. F., Mo, X. M., Teoh, S. H. and Hutmacher, D. W., 2002, "Scaffold development using 3D printing with a starch-based polymer", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 20, No. 1-2, pp. 49-56.
 - 13) Cheng, G., Markenscoff, P. and Zygourakis, K., 2009, "A 3D hybrid model for tissue growth: the interplay between cell population and mass transport dynamics", *Biophys. J.*, Vol. 97, No. 2, pp. 401-414.
 - 14) Magzoub, M., Jin, S. and Verkman, A. S., 2007, "Enhanced Macromolecule Diffusion Deep in Tumors after Enzymatic Digestion of Extracellular Matrix Collagen and its Associated Proteoglycan Decorin", *FASEB J.*, Vol. 22, No. 1, pp. 276-284.
 - 15) Lee, D. H., Lee, J. H., Park, C. H. and Kim, J. K., 2009, "Development of Image-based Fluorescence Photobleaching Technique for Measuring Macromolecule Diffusion in Biological Porous Medium", *J. Korean Soc. Visual.*, Vol. 7, No. 1, pp. 9-13.
 - 16) Wu, P. I., Minisini, S. and Edelman, E. R., 2009, "Intramuscular drug transport under mechanical loading: resonance between tissue and uptake", *J. Control Release*, Vol. 136 No. 2, pp. 99-109.
 - 17) Brown, D. A., MacLellan, W. R., Laks, H., Dunn, J. C., Wu, B. M. and Beygui, R. E., 2007, "Analysis of oxygen transport in a diffusion-limited model of engineered heart tissue", *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 97, No. 4, pp. 962-975.