

# 잉크젯 프린팅을 이용한 HepG2 세포 담지 콜라겐 마이크로스피어 제작

## Fabrication of HepG2 Cell Laden Collagen Microspheres using Inkjet Printing

최진호<sup>1</sup>, 김영호<sup>2,3</sup>, 로익 자코 데콩브<sup>4</sup>, 유르겐 부르거<sup>4</sup>, 김규만<sup>1,✉</sup>  
Jin Ho Choi<sup>1</sup>, Young Ho Kim<sup>2,3</sup>, Loïc Jacot-Descombes<sup>4</sup>, Jürgen Brugger<sup>4</sup>, and Gyu Man Kim<sup>1,✉</sup>

1 경북대학교 기계공학부 (School of Mechanical Engineering, Kyungpook National University)  
2 대구경북첨단의료산업진흥재단 첨단의료기기개발지원센터 (Medical Device Development Center, Daegu-Gyeongbuk Medical Innovation Foundation)  
3 경북대학교 차세대에너지기술연구소 (Research Institute of Advanced Energy Technology, Kyungpook National University)  
4 École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL) LMIS1  
✉ Corresponding author: gyuman.kim@knu.ac.kr, Tel: +82-53-950-7570

Manuscript received: 2014.2.3 / Revised: 2014.4.17 / Accepted: 2014.6.25

*In this study, drop-on-demand system using piezo-electric inkjet printers was employed for preparation of collagen microspheres, and its application was made to the HepG2 cell-laden microsphere preparation. The collagen microspheres were injected into beaker filled with mineral oil and incubated in a water bath at 37°C for 45 minutes to induce gelation of the collagen microsphere. The size of collagen microsphere was 100µm in diameter and 80µm in height showing spherical shape. HepG2 cells were encapsulated in the collagen microsphere. The cell-laden microspheres were inspected by the microscopic images. The encapsulation of cells may be beneficial for applications ranging from tissue engineering to cell-based diagnostic assays.*

Key Words: Microsphere (마이크로스피어), Inkjet Printing (잉크젯 프린팅), Collagen Cell Laden (콜라겐 셀 레이드), HepG2 Cell (간암세포)

### 1. 서론

마이크로 엔지니어링 기술의 하나인 잉크젯 프린팅(inkjet printing) 기술은 멤스(MEMS) 기술의 패터닝 방법인 포토리소그래피(photolithography)를 이용한 패터닝 방식보다 공정시간이 빠르고 간편하며, 비접촉 드롭 온 디맨드(drop-on-demand, DOD) 방식이기 때문에 기관의 표면오염을 최소화 할 수 있는 장점을 가진다. 이러한 잉크젯 프린팅 기술

은 최근 입는(wearable) 컴퓨터, 유연(flexible) 디스플레이, 일회용(disposable) 전자소자 등의 전자산업 분야와 단백질, 세포 및 미생물을 기관 위에 배열(array)하는 방법을 응용한 바이오 센서(bio sensor), DNA 칩(DNA chip), 단백질 칩(protein chip), 선별검사(screening) 등의 바이오 응용분야에서 많은 연구가 진행되고 있다.<sup>1-4</sup>

잉크젯 프린팅 기술은 노즐의 구동방식에 따라 크게 액체분사를 위해 잉크가 펌프에 의해 노즐까

지 연속적으로 이송 되는 연속(continuous)방식, 용기(reservoir)에 있는 유체가 필요에 따라 모세관 힘(capillary force)에 의해 노즐로 이송되는 DOD(drop-on-demand) 방식으로 분류 할 수 있다. DOD 방식은 구동원리에 따라 열적(thermal)구동과 피에조(piezo electric)구동으로 나눌 수 있다. 열적 구동은 노즐 안에 열을 가하면 기포가 발생하여 노즐 밖으로 액적을 분사시키는 방법이며, 피에조 구동방식은 압전소자에 전기를 가하여 변환되는 압력으로 모세관의 체적을 변화시켜 노즐 밖으로 액적을 분사시키는 방법이다.<sup>5,6</sup> 본 연구에서는 비접촉식 DOD 방식의 피에조 구동형 잉크젯 노즐을 이용하였다.

콜라겐은 생체조직을 구성하는 단백질로 생체 적합성, 세포 접착성, 증식성, 생분해성 등 우수한 성질을 가지는 물질로 바이오 응용분야에서 많이 사용되고 있다. 또한, 세포배양에서 성장과 증식성을 향상시키는 효과가 있으며, 재생의료 분야의 지지체(scaffold)로 주목받고 있는 기능성 소재이다. 콜라겐 마이크로스피어(microsphere)는 기존의 2차원 세포배양기술의 한계를 벗어나 3차원 형상을 가지는 생체기관의 구조를 모사한 세포배양 방법으로 실제 생물체의 반응을 정확하게 재현하기 위한 새로운 형태의 배양기술이다.<sup>7,8</sup>

본 연구에서는 비접촉식 DOD 방식의 피에조 구동형 잉크젯 프린팅 시스템을 이용하여 콜라겐을 마이크로스피어 형상으로 제작하는 기술을 개발하였다. 또한, 이를 이용하여 3차원 세포배양 기술인 HepG2 세포 담지 마이크로스피어(cell-laden microsphere)를 만드는 연구를 수행하였다.

**2. 실험 준비**

비접촉식 DOD 방식의 피에조 구동형 잉크젯 프린팅 시스템을 Fig. 1과 같이 구성하였다. 구성된 잉크젯 프린팅 장치는 LabVIEW 기반의 소프트웨어와 잉크젯 헤드 컨트롤러(inkjet head controller)를 통해 자동으로 액적의 분사 속도 및 크기를 제어하도록 설계되었다. 잉크젯 프린팅 장치의 용기(reservoir)는 수용액을 보관하며 잉크젯 헤드(inkjet head)로 수용액을 전달한다.

실험에 사용된 잉크젯 헤드의 노즐(MD-K-140-778) 직경은 50 $\mu$ m 크기를 가지며 30~40 $\mu$ m 직경의 액적 분사가 가능하다. 피에조 구동전압을 잉크젯 헤드 컨트롤러를 통하여 70~150V 범위로 변화시

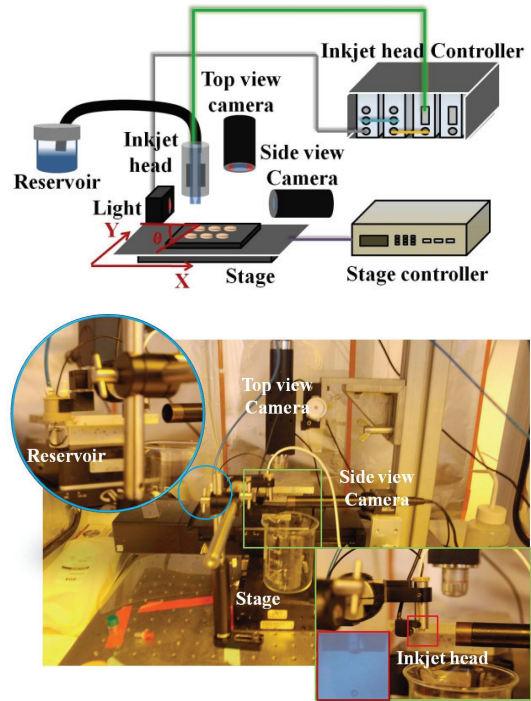


Fig. 1 Schematic image and actual image of inkjet printing setup

키면서 형성된 액적을 관찰하였다. 3축 스테이지는 스테이지 컨트롤러를 통하여 액적의 위치 제어에 사용되었다. 그리고 측면(side view) CCD 카메라는 액적 형성 관찰에 사용하였으며, 윗면(top view) CCD 카메라는 액적의 위치 관찰에 사용하였다.

마이크로스피어의 제작에 사용된 콜라겐은 파우더 형태인 콜라겐(collagen typeIV; Sigma Aldrich)과 액상 형태인 콜라겐(Bovine collagen type I ; BD bioscience)을 사용하였다. 파우더 형태의 콜라겐은 다양한 농도의 콜라겐을 만들기 쉬우나 액상으로 녹이기 위한 시간이 걸린다. 또한 잉크젯 프린팅 장치의 노즐을 쉽게 막는 현상이 발생하였다. 이러한 문제를 해결하기 위해 농도 30%를 가지는 액상 형태인 세포배양용 콜라겐 type I 을 이용하여 마이크로스피어 및 HepG2 세포가 담지된 콜라겐 마이크로스피어를 제작하였다.

HepG 2는 사람의 간 조직 세포로 간 질환 연구, 약물 표적 연구 및 독성 테스트를 위한 모델 시스템으로 많이 사용되고 있는 세포이다. HepG 2 세포의 크기는 약 10~20 $\mu$ m 정도이다. HepG 2 세포 배양액(culture medium)은 MEM(Eagle’s Minimum

Essential Medium), 10% FBS(fetal bovine serum), 1% Non-Essential Amino Acids, 1% Sodium Pyruvate를 섞어서 제작하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 콜라겐 마이크로스피어

잉크젯 프린팅 장치의 용기에 콜라겐 수용액을 채우고 잉크젯 헤드를 통하여 콜라겐을 잉크젯 프린팅 하였다. 실험에 사용된 노즐은 50 $\mu$ m 크기를 가지며, 콜라겐 마이크로스피어의 형성조건은 피에조 구동전압 T= 90V, 펄스폭 PL= 72 $\mu$ s, 구동주파수 F= 100Hz 이다.

콜라겐은 수용액 형태로 잉크젯 시스템에 공급된다. 따라서, 액적을 공기 중에서 실리콘 웨이퍼 등의 기관 위로 분사하는 경우 액적의 물이 빠르게 증발하는 문제가 발생한다(Fig. 2(a)). 이러한 수용액의 증발문제를 해결하기 위하여 액적을 광유(mineral oil) 속으로 분사하여 증발을 최소화 하였다. 광유를 유리 샬레에 담은 후에 기관 대신 사용하였다. 또한, 광유 속으로 분사된 콜라겐은 표면장력 효과로 인하여 액적의 형상을 유지할 수 있었다.

액적이 광유 안으로 들어가기 위해서는 광유의 표면장력을 극복할 수 있는 액적의 운동에너지가 필요하며, 또한 광유 안에 들어간 후에 액적의 깊이방향 위치는 광유의 점성(viscosity)과 액적의 운동에너지에 따라 영향을 받는다. 액적의 운동에너지는 피에조의 구동전압으로 조절 할 수 있으며, 구동전압이 작은 경우(T=70V) 액적이 광유 속으로 들어가지 못하고 광유의 표면에 형성됨을 확인하였다. 광유의 점성이 높으면 액적이 광유 속으로 들어가지 못하고 광유의 표면에 형성되기 때문에 광유의 점성은 낮을 수록 액적 형성이 유리하다.

Fig. 2(b)는 잉크젯 프린팅으로 콜라겐 마이크로스피어를 제작하고 이를 겔화(gelation)하여 광유를 제거하는 개략도를 보여준다. Fig. 2(c)는 잉크젯 프린팅을 사용하여 광유 속에서 형성된 구형상의 콜라겐 액적의 광학 이미지이다. 잉크젯의 구동주파수(100Hz)가 높기 때문에 노즐에서 분사된 미세액적들은 광유 안에서 병합(merge)되어 액적을 형성함에 따라, 액적크기의 분포가 넓게 나타났다. Fig. 2(d)는 광유 속에서 형성된 콜라겐 액적을 37 $^{\circ}$ C 워터 배스(water bath)에서 45분간 겔화하여 형성된 콜라겐 마이크로스피어의 이미지이다. 본 실험에

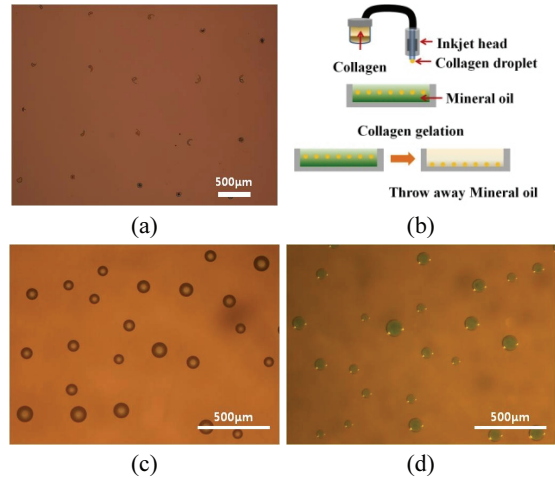


Fig. 2 Optical images of inkjet printed collagen droplets. (a) collagen patterns printed on Si substrate in the air, (b) Schematics of collagen inkjetting into mineral oil and subsequent gelation, (c) Collagen droplets in mineral oil, (d) Collagen microspheres after gelation

서는 가시화를 위해 콜라겐에 염색염료(Blue Dye)를 섞어 사용하였다. 제작된 콜라겐 마이크로스피어의 크기는 다양한 분포를 보였다.

#### 3.2 HepG2 세포가 담지된 콜라겐 마이크로스피어

HepG2 세포가 담지된 콜라겐 마이크로스피어의 제작을 위하여 콜라겐과 HepG2 세포의 혼합액을 잉크젯 프린팅하였다. 콜라겐 수용액과 HepG2 세포가 포함되어있는 배양액을 1:1 (wt%)의 비율로 혼합하여 잉크젯 프린팅 용기(reservoir)에 넣은 후, 50 $\mu$ m 크기를 가지는 잉크젯 프린팅 장치의 노즐을 통하여 광유 속으로 액적을 분사하였다.

Fig. 3은 잉크젯 프린팅으로 제작된 콜라겐 액적 안에 HepG2 세포가 담지된 이미지이다. 콜라겐 마이크로스피어는 다양한 크기로 형성되었으며, 콜라겐 액적 안에 담지된 HepG2 세포의 수도 다양하였다. Fig. 4는 세포가 담지된 콜라겐 액적의 형상을 확인하기 위해 현미경을 이용하여 수직방향으로 초점거리를 변화시켜 콜라겐 액적의 밑에서부터 위까지 관찰한 이미지이다. 측정 결과 콜라겐 마이크로스피어는 직경 100 $\mu$ m, 높이 80 $\mu$ m를 가지는 타원임을 확인 할 수 있었다. Fig. 5는 콜라겐을 겔화시킨 후 제작된 HepG2 세포가 담지된

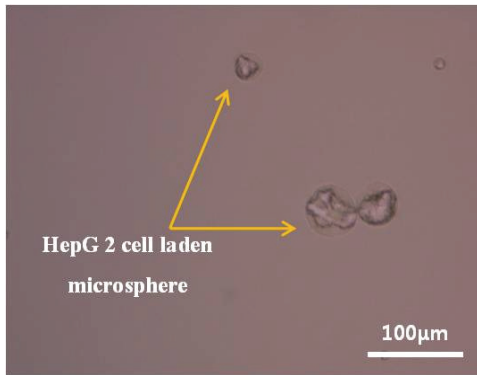


Fig. 3 HepG2 cell laden microsphere inkjet printed into mineral oil

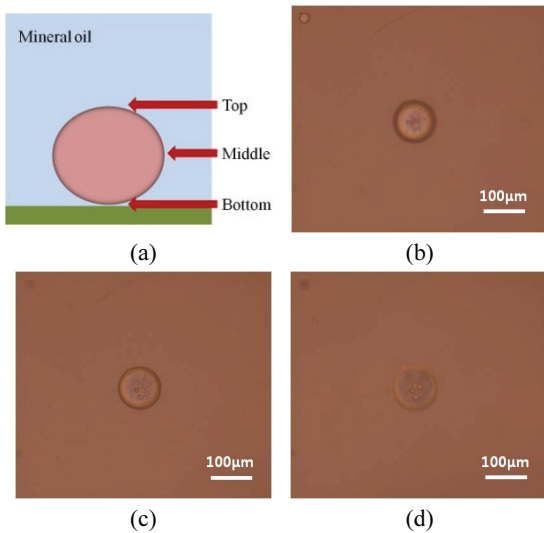


Fig. 4 HepG2 cell laden microsphere dimensions were measured by changing the microscope focus distance. Cell laden microsphere diameter: 100µm, thickness: 80µm, (a) Schematics of cell laden microsphere into mineral oil, (b) at bottom of droplet, (c) at middle, (d) at top

콜라겐 마이크로스피어의 이미지이며, 콜라겐 안에 분포된 HepG2 세포 수도 다양하게 들어가 있음을 확인 할 수 있다. 잉크젯의 주파수 특성상 노즐에서 분사된 액적이 병합하여 최종 액적을 형성하기 때문에 콜라겐 액적의 크기가 넓은 분포를 나타내었고, 일정한 수나 단수의 세포를 액적 안에 넣는 부분은 추가연구가 필요한 것으로 판단된다.

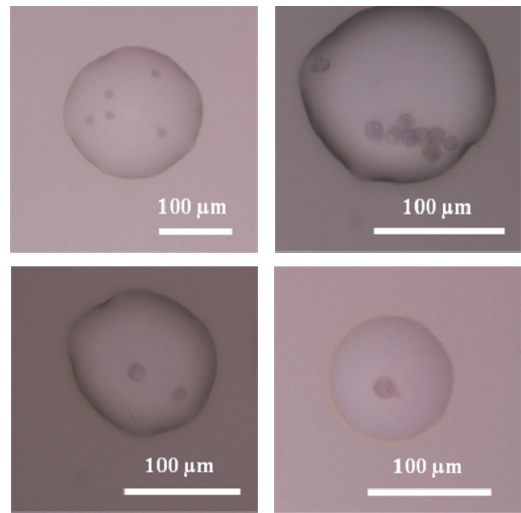


Fig. 5 HepG2 cell laden microsphere after gelation of collagen

#### 4. 결론

본 연구는 비접촉식 DOD 방식의 피에조 구동형 잉크젯 프린팅을 이용하여 바이오 물질인 콜라겐 마이크로스피어를 제작하였다. 프린터 헤드를 통하여 콜라겐 용액을 광유가 담겨있는 유리 샬레로 분사하여 마이크로 액적을 형성한 후 이를 겔화 함으로써 다양한 크기를 가지는 콜라겐 마이크로스피어를 제작할 수 있었다.

또한, 콜라겐에 HepG2 세포를 분산시킨 후에 잉크젯팅을 함으로써 세포가 담지된 마이크로스피어를 제작할 수 있었다. 세포가 담지된 마이크로스피어는 세포전달체로 적용될 수 있으며, 세포의 3차원 배양조건을 제공함으로써 보다 정확한 in vitro 세포배양 모델을 수립할 수 있어 추후 다양한 바이오 연구에 적용할 수 있을 것으로 예상된다.

#### 후 기

본 연구는 미래창조과학부의 재원으로 한국연구재단의 지원(No.2013R1A1A2060944)을 받아 수행되었습니다.

#### REFERENCES

1. Yoon, S. H., Lee, S. G., Cho, M. O., and Kim, J. K., "Two-Dimensional Patterning of Bacteria by Inkjet

- Printing,” Transactions of The Korean Society of Mechanical Engineers: B, Vol. 34, No. 1, pp. 89-94, 2010.
2. Roth, E. A., Xu, T., Das, M., Gregory, C., Hickman, J. J., et al., “Inkjet Printing for High-Throughput Cell Patterning,” *Biomaterials*, Vol. 25, No. 17, pp. 3707-3715, 2004.
  3. Ilkhanizadeh, S., Teixeira, A. I., and Hermanson, O., “Inkjet Printing of Macromolecules on Hydrogels to Steer Neural Stem Cell Differentiation,” *Biomaterials*, Vol. 28, No. 27, pp. 3936-3943, 2007.
  4. Liberski, A. R., Delaney Jr., J. T., and Schubert, U. S., ““One Cell-One Well”: A New Approach to Inkjet Printing Single Cell Microarrays,” *ACS Combinatorial Science*, Vol. 13, No. 2, pp. 190-195, 2010.
  5. Kwon, K. S. and Myong, J. H., “Experimental Study on the Relationship between Ink Droplet Volume and Inkjet Waveform,” *J. Korean Soc. Precis. Eng.*, Vol. 26, No. 4, pp. 141-145, 2009.
  6. Jacot-Descombes, L., Gullo, M., Cadarso, V., and Brugger, J., “Fabrication of Epoxy Spherical Microstructures by Controlled Drop-on-Demand Inkjet Printing,” *Journal of Micromechanics and Microengineering*, Vol. 22, No. 7, Paper No. 074012, 2012.
  7. Morimoto, Y., Tsuda, Y., and Takeuchi, S., “Reconstruction of 3D Hierarchic Micro-Tissues using Monodisperse Collagen Microbeads,” *Proc. of the IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems*, pp. 56-59, 2009.
  8. Shin, Y. J., Han, S. W., Jeon, J. S., Yamamoto, K., Zervantonakis, I. K., et al., “Microfluidic Assay for Simultaneous Culture of Multiple Cell Types on Surfaces or within Hydrogels,” *Nature Protocols*, Vol. 7, No. 7, pp. 1247-1259, 2012.