

미세접촉인쇄법을 이용한 지방세포 칩 제작

김지용*** · 정현호** · 이창수**† · 노창현*†

*한국원자력연구원 첨단방사선연구소 생명공학연구부
56212 전북 정읍시 신정동 1266
**충남대학교 공과대학 화학공학과
34134 대전광역시 궁동 220

(2015년 7월 18일 접수, 2015년 9월 17일 수정본 접수, 2015년 10월 1일 채택)

Simple Fabrication of Adipocyte Cell Chip Using Micropatterning

Gi Yong Kim***, Heon-Ho Jeong**, Chang-Soo Lee**† and Changhyun Roh*†

*Division of Biotechnology, Advanced Radiation Technology Institute (ARTI), Korea Atomic Energy Research Institute (KAERI), 29, Geungu-gil, Jeongseup, Jeonbuk, 56212, Korea

**Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, 220, Gung-Dong, Yuseong-gu, Daejeon, 34134, Korea
(Received 18 July 2015; Received in revised form 17 September 2015; accepted 1 October 2015)

요 약

본 논문은 PDMS를 기반으로 한 미세접촉인쇄법을 사용하여 보다 효율적으로 지방세포를 선택적으로 배양접시에 부착시켰으며 패터닝 된 배양접시에서 지방세포가 빠르게 지방분화를 가능하게 하였다. PDMS를 이용한 선택적 표면 처리 방법은 기존의 세포칩 제작과 달리 소량의 유기용매사용, 저가의 장비 사용, 또한 효율적으로 특정 지역 안에서 지방세포를 고정화하고 성장시킬 수 있으며 이를 통해 지방세포의 생리학적 상태를 손쉽게 관찰할 수 있는 분석 기술로 활용된다. 이렇게 구성된 지방세포칩 위에 대표적인 비만 억제제 약물인 Orlistat을 0.2 μM -5.0 μM 농도로 처리하였을 때 대조군에 비하여 최대 26.5%의 억제 효과가 나타남을 확인하였다. 따라서, 본 논문에서 제안하는 방법을 통하여 다양한 비만 억제제 약물 탐색을 위한 세포칩으로 활용이 가능할 것으로 기대된다.

Abstract – In this study, we described a simple and facile method to generate uniform microwells poly(dimethyl siloxane) (PDMS) microstamps through micro-molding for efficient, rapid and reliable cell patterning of adipocyte differentiation. In contrast to the conventional methods, the microstamp technologies are low expensive, non-toxic, and using a small amount of solution. Recently, Orlistat known as tetrahydrolipstatin is a prescription drug designed to treat obesity which is used to aid in weight loss and help to reduce overweight obesity. Here, 3T3-L1 cells were treated under various concentration manners of Orlistat 0.2 μM -5.0 μM . and it was confirmed maximum 26.5% inhibition activity compared to control. Thus, we elucidated this platform can be used for the real-time analyzing of cell proliferation, adipocyte differentiation for evaluation of anti-obesity agents on cell chip. Furthermore, we expect that this platform technology designed here might be readily be expanded to discover a wider variety of anti-obesity agents.

Key words: Micropatterning, Anti-obesity agents, Screening, Orlistat

1. 서 론

비만(obesity)은 오랜 기간에 걸쳐 에너지 소비량이 비해 영양소를 과다 섭취할 경우 에너지 불균형으로 인하여 체내에 중성 지방이 축적되어 발생하는 질병으로써, 관절염, 고지혈증, 성기능장애, 당뇨병, 담낭질환, 골관절염, 지방간, 그리고 동맥경화 등을 합병증으로

유발하는 각종 질병의 근원이다[1,2].

현재 세계인구의 30% 이상이 과체중이나 비만이며, 세계보건기구(world health organization, WHO)는 2015년에 세계인구의 30억 명 이상이 비만일 것으로 예측하고 있다. 우리나라도 이와 같이 생활의 서구화와 운동 부족으로 비만이 폭발적으로 늘어나고 있으며 비만과 비만 합병증으로 인한 전체 사회경제적 비용으로 GDP에 0.25%, 전체의료비에 4.9%의 비용을 투자하는 것으로 밝혀졌다. 전 세계적으로 약 2220조원의 비용이 비만관련 질병의 치료를 위해 사용된다. 전문가들은 앞으로 비만으로 인한 전세계적 사회경제적 비용이 급격하게 증가할 것 이라고 예상하고 있다[3-5].

이런 사회적 추세에 따라 비만 치료제(anti-obesity agents)에 대한

†To whom correspondence should be addressed.

E-mail: chroh@kaeri.re.kr, rhadum@cnu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

관심이 매우 증대하고 있으며 비만 치료제의 세계시장이 매년 20%가 넘는 고성장을 기록하고 있다. 현재 비만 치료제는 ‘식욕억제제’와 ‘지방흡수억제제’ 2가지로 나눌 수 있다. 식욕억제제는 뇌 중추신경에 작용하여 신경을 억제하여 식욕을 억제하며, 지방흡수억제제는 지방의 흡수를 억제하는 것이다.

그 중 비만억제제의 대표적인 예로 Orlistat, Sibutramine 등이 있다. 그 중 Orlistat는 지방분해효소(lipase) 저해제로서 1999년 미국 FDA (Food and Drug Administration)의 승인을 받은 대표적인 지방흡수억제제이다. Orlistat의 IUPAC (International Union of pure and Applied Chemistry) 명명은 다음과 같다. (S)-2-formylamino-4-methyl-pentanoic acid, (S)-1-[[[(2S,3S)-3-hexyl-4-oxo-2-oxetanyl] methyl]-dodecyl ester]이다[6]. Orlistat는 위와 췌장의 지방분해효소(lipase)의 활성부위와 공유결합을 형성하여 지방분해효소를 불활성화 시킴으로써 중성지방이 체내로 흡수되지 않아 칼로리 감소를 초래하게 된다[7].

Orlistat과 같은 비만 치료제를 만들기 위해서는 특정 세포들의 약물물에 따른 변화를 지속적으로 관찰할 수 있어야 한다. 따라서 세포를 원하는 칩(chip)상에 부착하는 기술은 매우 중요하다. 최근에 마이크로제조(microfabrication) 기술을 이용하여 바이오 분야가 비약적인 발전을 이루었다. 바이오 분야에서 널리 사용되는 기술은 소프트리소그래피(softlithography)를 이용한 마이크로 세포배양시스템, 표면 패터닝(surface patterning) 등이 있다[8]. 그 중 표면 패터닝 기술로 인하여 의료공학, 생체공학(bioelectronics)과 바이오센서 분야는 비약적인 발전을 이룩하였다[9,10]. 세포를 칩(chip)상에 패터닝시키기 위해서는 세포가 부착되는 표면의 환경이 매우 중요하다. 표면의 상태에 따라 여러 세포들의 패터닝이 가능하며, 부착된 세포는 주변 환경에 따라 성장, 분화 등이 달라지기 때문에 세포와 표면간의 안정적인 환경을 제공하는 것이 중요하다[11]. 그러므로 세포를 칩상에 패터닝을 하기 위해서는 표면 개질 기술이 중요하다는 것을 시사한다.

세포패터닝을 위한 표면 개질 기술은 미세접촉인쇄법 방법으로 금 표면 위에 자가조립단분자막(self assembled monolayer, SAM)을 형성하여 수행하였다. 이 방법은 소프트리소그래피(softlithography) 방법을 이용하여 만든 PDMS (polydimethylsiloxane) 스탬프를 이용하여 쉽게 표면에 패턴을 형성하여 세포가 부착 및 성장할 수 있는 안정적인 환경을 제공하였다. PDMS는 화학적으로 안정하고, 성형성 및 빛 투과성이 좋고 내구성이 강하며 독성이 없는 특징을 지니고 있으며, 짧은 시간 내에 마이크로어레이를 제조할 수 있다[12]. 따라서 생체연구 분야에서 세포의 관찰에 활용되고 있다[13-15]. 다양한 표면 개질 방법 중 고분자를 이용하는 방법은 수소결합, 정전기적 인력으로 안정적인 구조를 만들 수 있으므로 현재 조직공학(tissue engineering), 약물전달(drug delivery) 분야에 응용 되고 있다[16,17]. 그리고 고분자를 이용하기 때문에 환경 오염의 유발이 될 수 있는 유기용매를 많이 쓰던 이전 공정과 달리 상대적으로 친환경적인 공정이다. 또한 균일하게 표면이 개질되며 세포가 안정적으로 부착될 수 있는 표면을 제공하여 세포패터닝을 쉽게 수행할 수 있으며, 친환경적인 세포칩을 제작하여 세포의 생물학적 변화를 관찰할 수 있다. 그뿐만 아니라 패턴을 쉽게 다양한 모양 크기로 제작할 수 있으며, 이러한 특징들로 인하여 다양한 장치 제작에 응용이 가능하다[18].

본 논문에서는 PDMS를 이용한 미세접촉인쇄법 방법을 이용하여 기존의 지방발현 연구와 달리 3T3-L1 지방세포를 선택적으로 배양 접시에 패터닝 시켜 이를 통해 빠르고 효율적으로 3T3-L1 지방세포의

지방발현을 관찰하였으며, 손쉽게 3T3-L1 지방세포를 Oil Red O로 염색 처리해줌으로써 지방발현을 더욱 효과적으로 관찰하였다. 또한 패터닝 된 세포칩에 대표적인 비만 억제제 약물인 Orlistat을 처리하였을 때 대조군에 비해 26.5%의 억제효과가 나타남을 확인하였다. 본 논문에서 제안하는 3T3-L1 지방세포 패터닝 기술을 이용하여 다양한 비만억제제 약물 탐색을 위한 플랫폼으로 활용이 가능할 것으로 기대한다.

2. 실험

2-1. 재료

PDMS 스탬프를 제작하는 포토리소그래피 공정은 Microchem (MA, USA)에서 구매한 SU-8 3025 감광제(photoresist)와 현상제(developer)를 사용하였고, PDMS는(sylgard 184, Dow corning, MI, USA)에서 구매하였다. 세포를 부착시키기 위한 배양접시는 (Corning, NY, USA)사에서 60 × 15 mm를 구매하였다. 3T3-L1 지방세포를 키우기 위한 배양액은(Gibco, NY, USA)에서 구매한 DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium)을 사용하였다.

2-2. 실험방법

2-2-1. PDMS 기반 세포칩제작

본 실험에서는 세포를 배양접시(petri dish)내에 있는 패턴에만 선택적으로 부착시키기 위하여 PDMS stamp를 이용한 미세접촉인쇄법을 통하여 배양접시에 PDMS 패턴을 형성하였다. 본 논문은 PDMS stamp를 편리하게 배양접시에 부착시키기 위해 유리 기판을 사용하였으며, 초음파 세척기에서 아세톤, 에탄올, 증류수의 순서로 세척을 하였다. 그 후에 질소가스로 남아 있는 수분을 제거하였다. 또한 PDMS 스탬프는 PDMS와 crosslinking 물질을 10:1로 섞어준 후 사각형 모양으로 제작된 직경 500 μm 실리콘 마스터 위에서 열경화(65 °C, 12시간)로 제작 되었다.

배양접시에 PDMS 패턴을 제작하기 위하여 PDMS 용액(solution) 160 mg (PDMS 120 mg, crosslinking 40 mg)을 클로로포름 용매에 160 mg/mL의 농도로 녹여 준비하였으며, 유리 기판 위에 PDMS 용액 1 mL을 뿌린 후 1000 rpm/20 초간 스핀코팅 하여 얇은 PDMS 용액막을 만들었다. 이후 앞서 제작된 PDMS 스탬프를 유리기판 위에 얇은 PDMS 용액막에 접촉시킨 후 배양접시에 놓게 된다. 그 다음 65 °C 오븐에서 20분간 넣어 일차 경화를 시킨 후, PDMS 스탬프를 배양접시에서 제거하고 PDMS 패턴이 찍힌 배양접시를 6시간 동안 최종경화를 진행하였다(Fig. 1a).

2-2-2. 지방세포 세포칩 내 고정

본 실험에서는 3T3-L1 지방세포를 사용하였다. 배양접시에 세포 패터닝을 하기 전에 앞에서 제작된 배양접시는 외부의 곰팡이나, 세포로부터 오염방지를 위해 클린벤치 안에서 UV로 하루 이상 멸균 후 사용하였다. 세포 패터닝에 순서는 어떠한 처리도 하지 않은 3T3-L1 지방세포를 배양 중인 배양접시에 배지를 제거한 후 PBS buffer (pH 7.2)로 1회 세척한 후, trypsin-EDTA (0.25%) 용액을 이용하여 3T3-L1 지방세포를 부유화 시킨 후 에 윈스분리기(1000 rpm/1 min)로 침전시켜 선택적으로 3T3-L1 지방세포만 추출 하였다.

3T3-L1 지방세포(5×10^4 /mL)를 배양접시에 20 μL을 주입하여 한 개의 배양접시에 1000개로 고정하여 실험을 하였다. 이후 37 °C

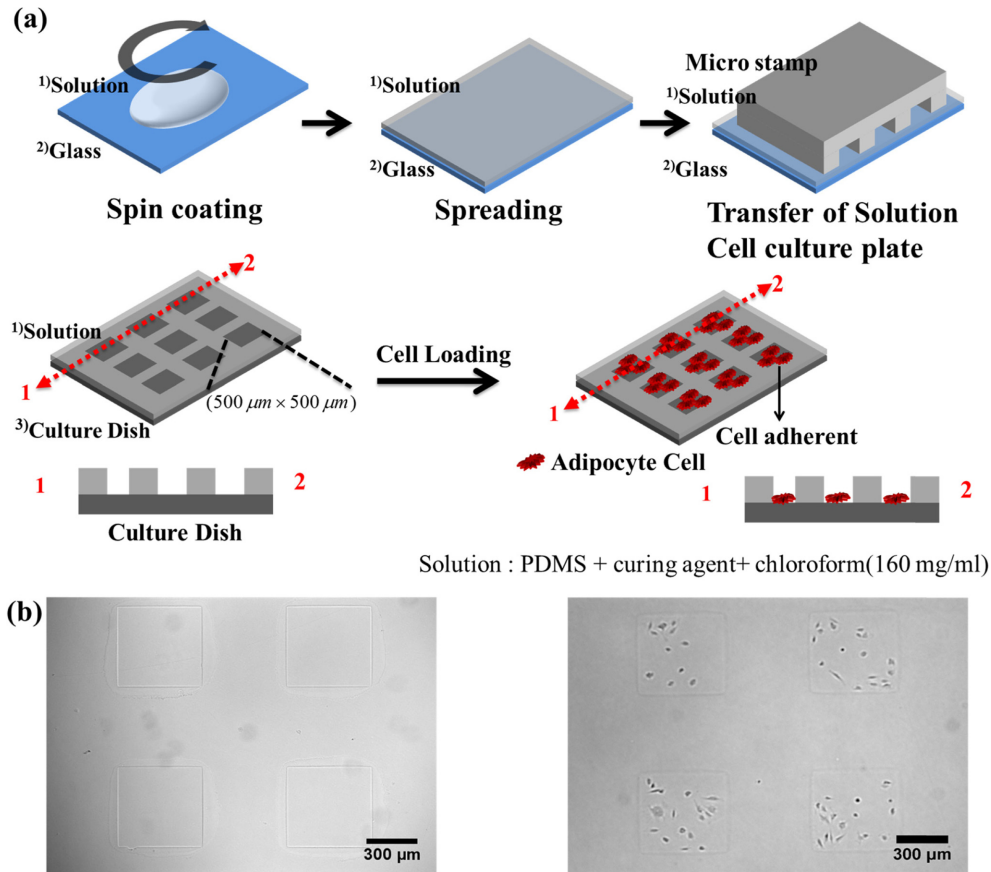


Fig. 1. Facile fabrication of PDMS cell pattern chip. (a) Schematic illustrations of 3T3-L1 cell patterning. (b) 3T3-L1 cell spread on micro cell pattern chip (scale bar 300 μm).

CO₂ 배양기(incubator)안에서 30분 동안 세포를 패턴에 부착시킨 후 부착되지 않은 3T3-L1 지방세포들은 배지(DMEM : FBS : antibiotics = 89% : 10% : 1%)를 이용하여 제거를 하였다. 패턴에 부착된 3T3-L1 지방세포들을 제외한 나머지 부착되지 않은 3T3-L1 지방세포들은 성공적으로 제거가 되는 것을 확인하였다(Fig. 1b).

2-2-3. 세포칩 내 지방세포 분화, 염색 및 지방억제제 투여

3T3-L1 지방세포를 배양접시 안에 패턴에 고정한 후, 3T3-L1 지방세포가 패턴에 80% 증식하게 되면, 기존의 배지를 제거하고 PBS로 1번 이상 행군 후, IBMX (isobutyl-1-methylxanthine) 0.5 mM, Dexamethasone 1 μM, Insulin 10 μg/ml 이 함유된 새로운 배지를 패턴에 첨가하였다(Fig. 2a)[14,19]. 대표적인 지방억제제인 Orlistat의 농도에 따른 3T3-L1 지방세포의 지방억제 영향을 보기 위해 Orlistat의 농도를 0.2 μM, 1 μM, 5.0 μM를 함유한 배지를 패턴에 2일마다 첨가하였다. Orlistat을 첨가한 3T3-L1 지방세포를 패턴에서 6일 동안 키운 후(Fig. 2b), 3T3-L1 지방세포가 생성한 지방(lipid droplet)을 관찰하기 위해 Oil Red O (Cayman Chemical, Adipogenesis Assay Kit, USA) 구매를 하였다. Oil Red O 용액을 만들기 위해 Oil Red O : deionized H₂O을 3:2 비율로 희석하고, 희석시킨 Oil Red O을 0.25~0.45 μm 필터를 이용하여 추출하였다.

3T3-L1 지방세포가 생성한 지방을 염색하기 위하여 패턴이 찍힌 배양접시에 배지를 완전히 제거한 후, PBS buffer (pH 7.2)로 2번 세척한다. 세척한 후 10%로 희석한 포르말린(Formalin : PBS = 1 : 9)을

패턴에 상온에서 2시간 동안 고정시킨 후 Iso-butanol로 2번이상 패턴을 행군다. 그 다음 Oil Red O 용액으로 2시간동안 각 패턴을 염색시킨다. 2시간후에 Oil Red O 용액을 완전히 제거하고 Iso-butanol로 2번이상 행군 후 3차증류수로 4번이상 패턴을 씻어낸다. 패턴을 완전히 건조한 후 Oil Red O로 염색된 3T3-L1 지방세포를 Leica 현미경(Leica DFC500 R2 Digital Camera & SW Kit, Germany)를 사용하여 관찰하였다(Fig. 2c). 또한 3T3-L1 지방세포 내 지방 성분과 결합한 Oil Red O는 정량을 위해 100% isopropanol을 이용하여 모두 용출시켜 회수한 후, Micro plate reader (Infinite® 200, Tecan Co, Switzerland)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다[20].

3. 결과 및 토의

3-1. 시간에 따른 지방세포 세포칩 부착 평가

세포마다 패턴에 부착되는 시간이 다르므로 3T3-L1 지방세포가 최적으로 패턴에 부착되는 시간을 찾기 위하여 부착시간을 다르게 실험을 하였다. 부착시간이 20분일 때 패턴에 13 ± 3.4% 3T3-L1 지방세포만 패턴에 선택적으로 부착하였으며, 부착시간이 40분일 때 3T3-L1 지방세포가 패턴 바깥쪽 부분(PDMS)에 부착되어 3T3-L1 지방세포를 패턴에서 선택적으로 관찰하는 어려움이 있었다. 이러한 이유는 세포가 기질에 부착되기 위해서는 세포표면에 존재하는 세포막 표면 단백질인 피브로넥틴(fibronectin), 셀렉틴(selectin)등이 기질과 부착하기 위하여 충분한 시간이 필요하기 때문이다[21]. 세

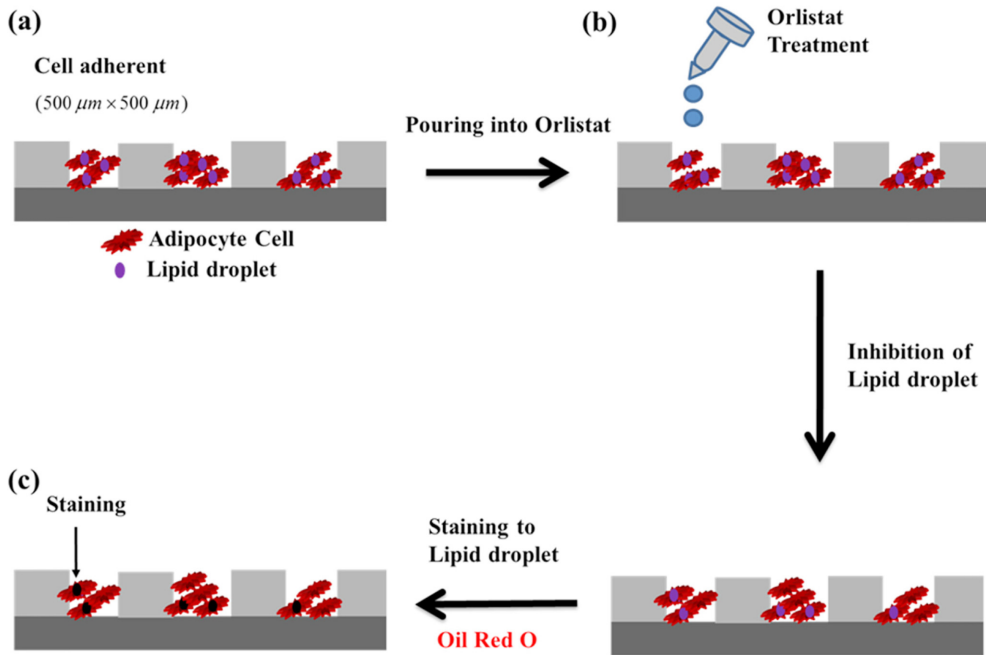


Fig. 2. Analysis of adipocyte differentiation by Orlistat treatment. (a) 3T3-L1 cell in micro cell pattern chip. (b) 3T3-L1 cell cultured under Orlistat treatment. (c) 3T3-L1 adipocyte differentiation analyzed by Oil Red O staining.

포부착 시간이 너무 길 경우, 세포막 표면 단백질이 기질과 강하게 접착되기 때문에 패턴 바깥쪽 부분에 3T3-L1 지방세포를 제거하는데 한계가 있는 것을 관찰하였다. 세포부착 시간이 30 ± 5 min 일 때 3T3-L1 지방세포가 패턴에 최적으로 부착되는 것을 확인하였다. 위 실험을 통하여 3T3-L1 지방세포가 미세접촉인쇄법 방법으로 만든 패턴에서 선택적으로 안정하게 부착하는 것을 확인하였으며, PDMS는 세포의 부착을 효과적으로 억제하였다. 이러한 이유는 세포막 표면 단백질인 피브로넥틴, 셀렉틴등은 친수성 성질을 지녔기 때문에 소수성 성질을 가진 PDMS에는 잘 부착되지 않기 때문이다. 본 실험에서 이용한 미세접촉인쇄법 방법은 배양접시 안에 원하는 장소에서 3T3-L1 지방세포를 선택적으로 관찰할 수 있을 뿐만 아니라 증식 및 분화가 가능함을 보여주었다.

3-2. 지방분화유도제 농도에 따른 지방세포분화 분석

3T3-L1 지방세포의 패턴에서 지방 발현 과정을 관찰하고자 3T3-L1 지방세포를 패턴에 고정시키고 시간에 따라 3T3-L1 지방세포를 관찰하였다(Fig. 3a-b). 또한 패턴에서 3T3-L1 지방세포의 지방 분화를 빠르게 하기 위하여 지방분화유도제의 농도를 높여서 실험을 해보았다. 실험 결과 지방분화유도제의 농도가 IBMX (isobutyl-1-methylxanthine), Dexamethasone, Insulin, 0.5 mM, 1 μM, 10 μg/mL 일 때 3일 후에 패턴에 3T3-L1 지방세포가 $72 \pm 6.3\%$ 가 증식하였으며, 지방분화유도제의 농도를 2배 높여 IBMX (isobutyl-1-methylxanthine), Dexamethasone, Insulin, 1.0 mM, 2 μM, 20 μg/mL 일 때 3일 후에 패턴에 3T3-L1 지방세포가 $76 \pm 8.6\%$ 가 증식하였다. 각각 지방분화유도제의 농도를 2배 높였지만, 지방분화 속도에는 별 차이가 없는 것을 확인하였다. 이러한 이유는 본 실험에서 넣어준 Insulin 농도(10 μg/mL, 20 μg/mL)가 혈중 Insulin 농도보다 높은 농도로 넣어주었기 때문에 3T3-L1 지방세포 분화속도에 별다른 영향을 끼치지 않는 것으로 보인다. 따라서 지방세포 분화에는 적절한 농도

의 지방분화유도제를 넣어주는 것이 중요하다는 것을 시사한다. 그리고 6일 후에 3T3-L1 패턴에 부착된 지방세포의 지방분화 정도를 관찰하였다 (Fig. 3c). 그 후 세포칩 내의 지방세포를 Oil Red O로 염색하여 3T3-L1 지방세포를 Leica 현미경(Leica DFC500 R2 Digital Camera & SW Kit, Germany)으로 관찰한 결과, 지방세포에서 성공적으로 지방만 특이적으로 염색 가능함을 보여주었다(Fig. 3d) [22]. 이러한 결과를 통하여 본 실험에서 사용한 세포칩은 한정된 곳에서 지방세포에 지속적인 관찰뿐만 아니라 성공적으로 지방 분화가 가능함을 보여주었다.

3-3. 지방세포 염색 및 Orlistat 약물 영향평가

Orlistat 농도에 따른 3T3-L1 지방세포 지방형성 억제 영향을 확인하기 위하여 6일 동안 패턴에서 배양시킨 3T3-L1 지방세포를 포르말린으로 패턴에 고정시킨 후, Oil Red O로 염색하여 Image-pro plus (Media cybernetics, CA, USA)를 사용하여 모든 패턴에 Oil Red O의 Red value 값을 측정하여 더한 후 이를 패턴의 면적으로 나누어 비교군인 Orlistat을 처리하지 않은 3T3-L1 지방세포의 Oil Red O의 Red value 값과 비교해보았다. Orlistat을 0.2 μM, 5.0 μM의 농도로 2일 마다 첨가하였을 때 $8.95 \pm 3.09\%$, $17.32 \pm 2.01\%$ 지방억제효과가 나타나는 것을 Image-pro plus 프로그램으로 확인하였다. 또한 Orlistat가 지방억제에 대한 효과를 정량적으로 측정하기 위하여 isopropanol로 Oil Red O를 용출시켜 micro plate reader (Infinite® 200, Tecan Co, Switzerland)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. Orlistat을 처리한 3T3-L1 지방세포와 Orlistat을 처리하지 않은 3T3-L1 지방세포를 비교하였더니, Orlistat를 0.2 μM ~5.0 μM 농도로 첨가하였을 때, Orlistat 농도가 증가함에 따라 지방억제효과의 증가를 확인하였고, 최대 26.48%의 억제효과가 있었다 (Fig. 4). 따라서 Orlistat가 지방의 형성을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다. 이러한 이유는 Orlistat가 췌장의 지방분해효소의 활성부위인 세린(serine)과 공유결

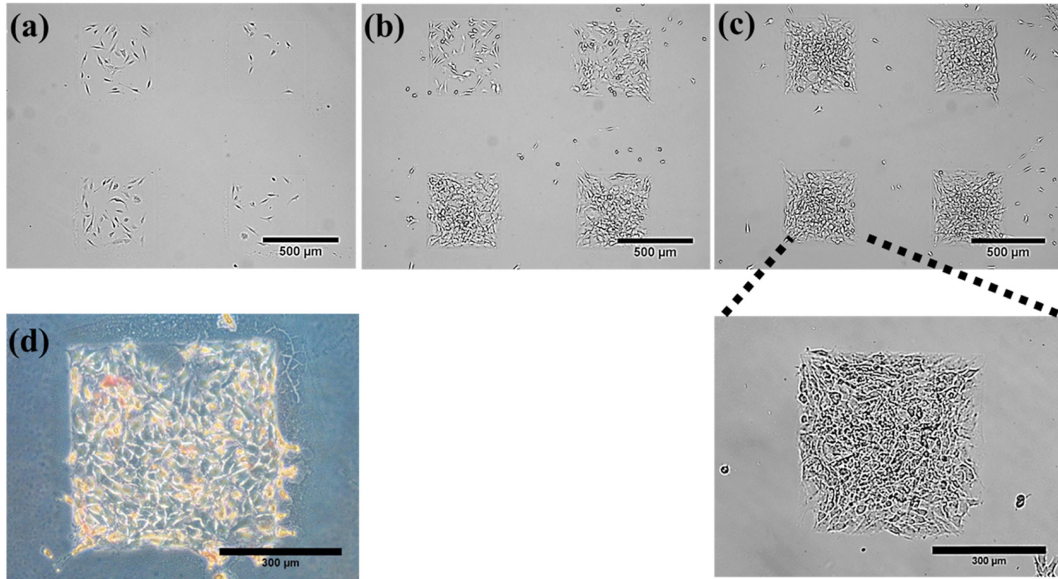


Fig. 3. Optical images of 3T3-L1 cell in micro cell pattern chip. (a) 3T3-L1 cell growth on cell chip in 2 h (scale bar 500 μm). (b) Optical images of micro cell pattern chip taken at 4 day. (c) 3T3-L1 cell growth on cell chip in 6 days. (d) Fat droplets stained with Oil Red O dye and examined using a light microscope (scale bar 300 μm).

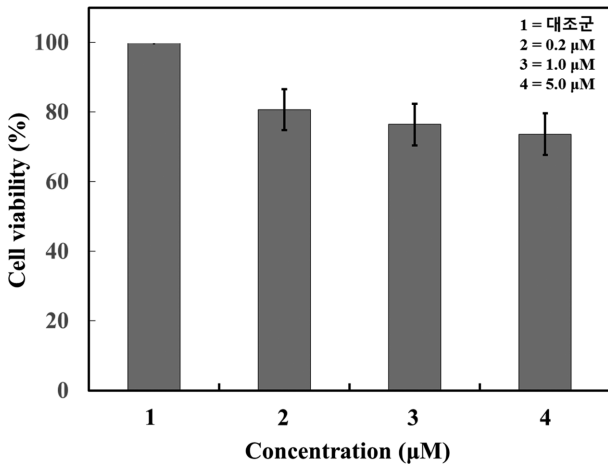


Fig. 4. Relative lipid inhibition of Orlistat by quantification method of Oil Red O staining.

함을 함으로서, 소장 내의 지방분해 효소인 리파아제(lipase)의 활성을 저해한다. 따라서 불활성화된 지방분해효소는 음식에 포함된 트리글리세리드(triglyceride)를 체내에서 지방 흡수가 가능한 유리지방산과 모노글리세리드(monoglyceride)로 가수분해를 시키지 못한다. 분해되지 않은 트리글리세리드(triglyceride)는 체내로 흡수 될 수 없기 때문에 궁극적으로, 체중 조절을 가능하게 한다[23,24].

4. 결 론

본 연구에서는 미세접촉인쇄법 방법으로 표면 개질된 기판 위에 PDMS 구조체를 이용하여 손쉽게 세포칩을 제작하였으며, PDMS 구조체는 원하지 않는 곳에서 세포의 부착을 효과적으로 방지하였다. 이를 이용하여 3T3-L1 지방세포를 손쉽게 증식 및 성장할 수 있는 발판을 마련하였다. 또한, 한정된 곳에서 3T3-L1 지방세포가 어떻게 지방 분화가 되는지 시간에 따라 쉽게 관찰할 수 있었으며,

세포칩을 이용하여 3T3-L1 지방세포를 한정된 곳에서 조밀하게 증식 함으로써 기존의 방법보다 좀더 적은 시약, 저비용 고효율로 3T3-L1 지방세포를 키울 수 있었으며, 더욱 빠르게 3T3-L1 지방세포의 지방분화를 유도 할 수 있었다. 또한, 제작된 세포 배양칩을 이용하여 대표적인 비만억제제인 Orlistat를 0.2 μM~5.0 μM 다양한 농도로 지방세포에 처리 하였을 때 모든 Orlistat 투여군에서 지방억제 효과가 나타나는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서, 향후 마이크로 세포패터닝기법을 활용하여 비만억제제와 같은 신약개발을 위한 플랫폼 기술로 활용될 수 있을 것으로 보인다.

감 사

이 논문은 교육부 이공학개인지초연구 지원사업(grant no. 2011-0010634)과 한국원자력연구원 창의연구개발사업의 일환으로 지원을 받아 수행된 연구로 이에 감사드립니다.

References

1. Marcelin, G. and Chua Jr, S., "Contributions of Adipocyte Lipid Metabolism to Body Fat Content and Implications for the Treatment of Obesity," *Current opinion in pharmacology*, **10**(5), 588-593(2010).
2. Cooke, D. and Bloom, S., "The Obesity Pipeline: Current Strategies in the Development of Anti-obesity Drugs," *Nature Reviews Drug Discovery*, **5**(11), 919-931(2006).
3. Kim, H.-C. and Kim, M.-R., "Analysis on Awareness and Practices for Diet According to Lifestyles of College Students," *Korean Journal of Human Ecology*, **19**(1), 157-165(2010).
4. Kim, T.-H. and You, G., "Obesity and Fatty Liver Disease," *The Korean Journal of internal Medicine*, **68**(4), 347-349(2005).
5. Finkelstein, E. A., Trogon, J. G., Brown, D. S., Allaire, B. T., Dellea, P. S. and Kamal-Bahl, S. J., "The Lifetime Medical Cost Burden of Overweight and Obesity: Implications for Obesity Preven-

- tion," *Obesity*, **16**(8), 1843-1848(2008).
6. Roh, C., Choi, N. H., Park, H. R., Jung, U. and Jo, S. K., "Effects of Orlistat on White Adipose Tissue (WAT) in the Gamma-irradiated Mouse Model," *Eur. J. Lipid. Sci. Tech.*, **112**(12), 1384-1388 (2010).
 7. Muls, E., Kolanowski, J., Scheen, A. and Van Gaal, L., "The Effects of Orlistat on Weight and on Serum Lipids in Obese Patients with Hypercholesterolemia: a Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Multicentre Study," *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, **25**(11), 1713-1721(2001).
 8. Jeong, H.-H., Noh, Y.-M., Jang, S.-C. and Lee, C.-S., "Droplet-based Microfluidic Device for High-throughput Screening," *Korean Chemical Engineering Research*, **52**(2), 141-153(2014).
 9. Rosenthal, A., Macdonald, A. and Voldman, J., "Cell Patterning Chip for Controlling the Stem Cell Microenvironment," *Biomaterials*, **28**(21), 3208-3216(2007).
 10. Yamazoe, H., Uemura, T. and Tanabe, T., "Facile Cell Patterning on an Albumin-coated Surface," *Langmuir*, **24**(16), 8402-8404(2008).
 11. Neff, J. A., Tresco, P. and Caldwell, K., "Surface Modification for Controlled Studies of Cell-ligand Interactions," *Biomaterials*, **20**(23), 2377-2393(1999).
 12. Park, B.-S., Kim, W. Y. and Yoon, K.-B., "Luminous Polyimide Bearing the Coumarin 6 Chromophore in the Side Group: Synthesis and Fluorescence Image Patterning," *Korean Journal of Chemical Engineering*, **31**(1), 172-177(2014).
 13. Choi, J. H. and Kim, G. M., "Fabrication of PDMS Stencil Using Gas Blowing for Micropatterned 3T3 Cell Culture," *Journal of the Korean Society for Precision Engineering*, **30**(2), 236-240(2013).
 14. Tontonoz, P., Hu, E. and Spiegelman, B. M., "Stimulation of Adipogenesis in Fibroblasts by PPAR γ , a Lipid-activated Transcription Factor," *Cell*, **79**(7), 1147-1156(1994).
 15. Nishizawa, M., Takahashi, A., Kaji, H. and Matsue, T., "Micro-patterned HeLa Cell Culture on PEG Monolayer-Coated Glass Substrates," *Chemistry Letters*, (9), 904-905(2002).
 16. Taniguchi, N., Miyoshi, E., Jianguo, G., Honke, K. and Matsumoto, A., "Decoding Sugar Functions by Identifying Target Glycoproteins," *Current Opinion in Structural Biology*, **16**(5), 561-566(2006).
 17. Dube, D. H. and Bertozzi, C. R., "Glycans in Cancer and Inflammation-potential for Therapeutics and Diagnostics," *Nature Reviews Drug Discovery*, **4**(6), 477-488(2005).
 18. Jeong, H.-H., Kim, Y.-G., Jang, S.-C., Yi, H. and Lee, C.-S., "Profiling Surface Glycans on Live Cells and Tissues Using Quantum Dot-lectin Nanoconjugates," *Lab on a Chip*, **12**(18), 3290-3295(2012).
 19. Rosen, E. D., Sarraf, P., Troy, A. E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D. S., Spiegelman, B. M. and Mortensen, R. M., "PPAR γ is Required for the Differentiation of Adipose Tissue in vivo and in vitro," *Molecular Cell*, **4**(4), 611-617(1999).
 20. Hwang, J., Wang, J., Morazzoni, P., Hodis, H. N. and Sevanian, A., "The Phytoestrogen Equol Increases Nitric Oxide Availability by Inhibiting Superoxide Production: An Antioxidant Mechanism for Cell-mediated LDL Modification," *Free Radical Biology and Medicine*, **34**(10), 1271-1282(2003).
 21. Cho, C.-S. and Akaike, T., "Design and Application of Cell-specific Polymer," *Polymer Science and Technology*, **5**(6), 566-573(1994).
 22. Ramirez-Zacarias, J., Castro-Munozledo, F. and Kuri-Harcuch, W., "Quantitation of Adipose Conversion and Triglycerides by Staining Intracytoplasmic Lipids with Oil red O," *Histochemistry*, **97**(6), 493-497(1992).
 23. Guerciolini, R., "Mode of Action of Orlistat," *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, **21**, S12-23(1997).
 24. Torgerson, J. S., Hauptman, J., Boldrin, M. N. and Sjöstöm, L., "XENical in the Prevention of Diabetes in Obese Subjects (XEN-DOS) Study A Randomized Study of Orlistat as An Adjunct to Lifestyle Changes for the Prevention of Type 2 Diabetes in Obese Patients," *Diabetes Care*, **27**(1), 155-161(2004).