

다양한 기계적 자극이 세포의 증식에 미치는 영향

The Effect of Various Mechanical Stimulation to Proliferation of Cells

*최성규¹, 박정훈², 이승재³, #이인환⁴

*S. K. Choi¹, J. H. Park², S. -J. Lee³, #I. H. Lee(anxanx@cbnu.ac.kr)⁴

¹충북대학교 정밀기계공학과, ²포항공과대학교 기계공학부, ³충남대학교 BK21 메카트로닉스 사업단, ⁴충북대학교 기계공학부

Key words : Bioreactor, Mechanical stimulation, Agarose, Scaffold, MC3T3-E1 cells, Flow cytometric

1. 서론

인공지지체 내에서 세포를 배양하여 조직을 재생하는 기술은 근래에 주목 받고 있으며, 최근에는 다양한 물리적 자극이 세포 성장에 중요한 역할을 한다는 연구 결과들이 보고되고 있다. 특히 뼈나 연골 조직과 같은 근골격계의 경우 압축력과 같은 기계적 자극에 큰 영향을 받는 것으로 알려져 있다.^{1,4}

하지만 기존 연구들은 단순한 경험적 수준의 반복적인 자극만을 고려하였다. 이에 본 연구에서는 단순한 형태의 자극이 아닌 다양한 모드의 기계적 자극이 세포의 성장에 어떠한 영향을 미치는지 분석하기 위하여 동적 배양시스템인 바이오리액터를 제작하였고, 이를 이용하여 MC3T3-E1 세포의 배양에서 기계적 자극이 세포 증식에 미치는 영향을 살펴보았다.

2. 바이오리액터의 제작

근골격계 시스템은 몸의 무게를 지탱하며 다양한 움직임을 통해 압축력을 받는다. 이러한 압축력은 근골격계 시스템에서 쉽게 생각할 수 있는 기계적 자극이다. 따라서 이와 비슷한 환경을 만들어 주기 위하여 압축시스템을 제작 하였다. Fig. 1은 본 연구에서 개발된 바이오리액터의 개략도이다. 이 시스템은 스텝 모터와 볼스크류로 구성되어 압축력을 전달하도록 제작되었다. 또한 제작된 바이오리액터는 세포 배양에 있어서 중요한 요소인 이산화탄소(CO₂)의 농도(5%)와 배양 온도(36.5℃)를 고려하여⁵ 인큐베이터와 같은 세포 배양 환경을 구현하였다.

3. 세포 및 방법

3.1 MC3T3-E1 세포의 배양

MC3T3-E1 세포(RIKEN Cell Bank, Tsukuba)를 배양하기 위해 α -MEM(HYCLONE)을 사용하였고, 여기에 10%의 우태혈청(FBS, GIBCO)과 1%의 항생제(100units/ml penicillin, GIBCO)를 첨가하였다. 배양된 세포는 3일에 한 번씩 배지를 교체하였으며, 7일에 한 번씩 계대 배양 하였다.

3.2 세포 캡슐형 인공지지체의 제작

세포에 기계적 자극을 가하기 위해 아가로스 젤 안에 세포를 파종시켜 인공지지체를 제작 하였다. 아가로스는 열적으로 가변성이어서 젤 제작에 용이하며, 또한 세포의 점착과 성장을 효과적으로 유도하고 대사산물의 전달이 용이해야 하는 생체 조직 공학적 지지체로서 좋은 장점을 가지고 있다.^{6,7} 이에 본 연구에서는 Bacto™ Agar를 이용하여 아가로스 젤을 제작하였다.

Fig. 2는 세포 캡슐형 인공지지체 제작과정을 나타낸 것이다. 젤을 제작하기 위해 계대 배양 후 세포를 수확하여 2×10^6 cells/scaffold의 농도로 아가로스에 파종 하였다.

아가로스 젤을 제작하기 위해 DW(deionized water)에 아가로스 분말 4g을 혼합하고 오토클레이브(autoclave)로 고온 멸균시켜 용해시켰다.

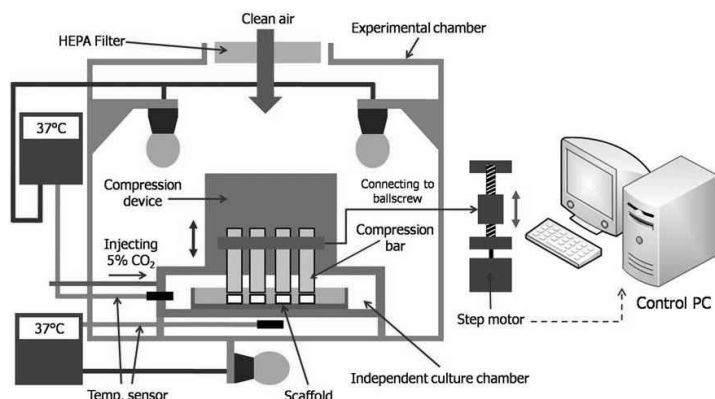


Fig.1 Schematic drawing of bioreactor

이를 MC3T3-E1 세포가 부유되어 있는 배지와 1:1의 비율로 혼합하여 젤 제작용 몰드에 주입하고 상온에서 경화 시켰다. 경화 후에 젤 제작용 몰드로부터 이형시켜 2%의 세포 캡슐형 아가로스 인공지지체를 완성 하였다. 제작된 인공지지체는 지름 10mm, 높이 5mm의 디스크 모양이다.

3.3 실험 방법

다양한 압축력에 대한 영향을 분석하기 위하여 4개의 실험조건을 설정하였다. Fig. 3과 같이 압축력의 모드는 총 4가지이며, 사인파형 압축력(Mode 1), 사각파형 압축력(Mode 2), 간헐적 압축력(Mode 3), 압축력을 가하지 않은 비교군(static culture)으로 구성되어 있다. 또한 각각의 모드는 동일하게 5mm의 압축 변위(인공지지체 높이의 10% 크기)로 일일 8시간씩 1Hz의 주기로 반복 압축을 세포 캡슐형 아가로스 인공지지체에 가해주며 총 7일간 배양시켰다.

3.4 유세포 분류기(Flow cytometric) 측정

세포의 증식에 대한 평가를 위해 배양 후 1, 3, 7일째에 유세포 분류기(FACS Calibur-S system, BD)를 이용하여 세포의 개수를 측정하였다. 이를 위해 세포 캡슐형 인공지지체를 DW와 함께 원심분리용 튜브에 넣고 85℃에서 2분 동안 가열하였다. 이 튜브를 원심 분리하고 세포만을 수확하여 500ul의 PBS(phosphate buffered saline)로 부유시킨다. PBS 안에 부유된 세포는 유세포 분류기의 노즐에 60ul/min가 흘러 들어가며 아르곤 레이저(argon laser, 488nm)를 통해 3분간 측정된다.

3.5 형광 이미지 분석

세포 증식을 평가하기 위해 배양 후 7일째에 세포 캡슐형 인공지지체에 대한 형광 이미지를 분석하였다. 형광 이미지 촬영을 위해 세포의 핵을 PI를 이용하여 염색하였다. PI 염색법으로 세포핵의 염색이 완료된 세포 캡슐형 인공지지체는 콘포칼 영상분석기(confocal laser scanning

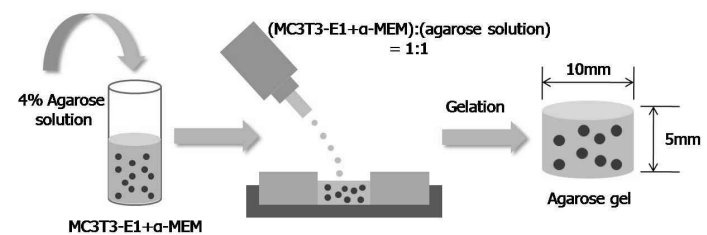


Fig.2 Schematic drawing of the fabrication of cell-encapsulating agarose gel scaffold

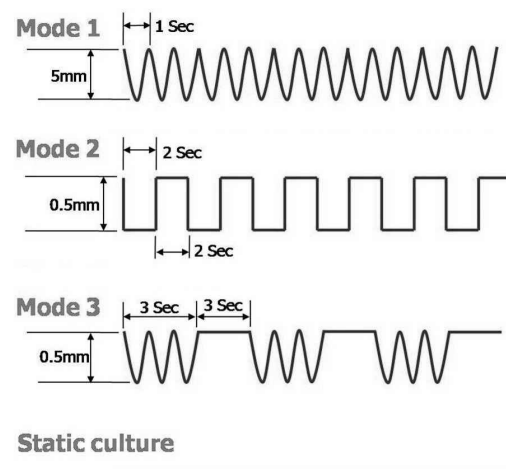


Fig.3 Three modes of compressive loading for dynamic culture and control group for static culture

microscope, LEICA)를 이용하여 인공지지체의 밑면부터 200um까지 10개의 단면으로 나누어 촬영하였다.

4. 결과 및 고찰

4.1 유세포 분류기 측정 결과

Fig. 4는 1, 3, 7일째의 증식 후 유세포 분류기를 이용하여 측정한 결과를 보여준다. Fig. 4에서 알 수 있듯이 각각의 모드는 3일째까지 큰 차이를 보이지 않다가 7일째 크게 차이가 나타나는 것을 알 수 있다. 사인과 압축력(Mode 1), 사각과 압축력(Mode 2), 간헐적 압축력(Mode 3)의 실험조건 모두가 비교군(static culture) 보다 세포의 개수가 많이 증가 되었으며, 특히 간헐적 압축력(Mode 3)의 경우가 세포 증식에 가장 큰 영향을 주는 것으로 판단된다.

4.2 형광 이미지 분석 결과

세포의 증식 여부를 측정하기 위하여 유세포 분류기를 이용한 세포 개수 측정과 더불어 형광 이미지를 분석 하였다. Fig. 5는 각각의 모드별 7일째의 인공지지체를 염색하여 촬영한 형광 이미지이다.

PI 염색법으로 인해 세포의 핵은 붉게 표현되며 이를 이용하여 각각의 모드별 이미지를 비교하여 보았을 때, 기계적 자극을 가한 실험조건에서 비교군(static culture)보다 많은 세포의 수가 관찰되었다. 이로 미루어 보아 기계적 자극이 세포의 증식에 영향을 주는 것으로 판단되며, 그 중에서도 간헐적 자극 조건이 가장 큰 영향을 주는 것으로 판단된다. 하지만 간헐적 자극에 대한 증식 효과는 차후 여러 번의 실험을 수행하여 보다 정확한 비교가 필요한 것으로 판단된다.

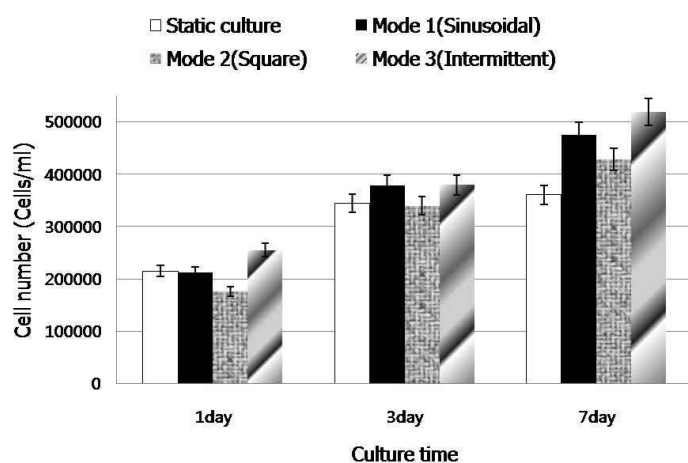


Fig.4 Numbers of MC3T3-E1 cells in dynamic and static culture

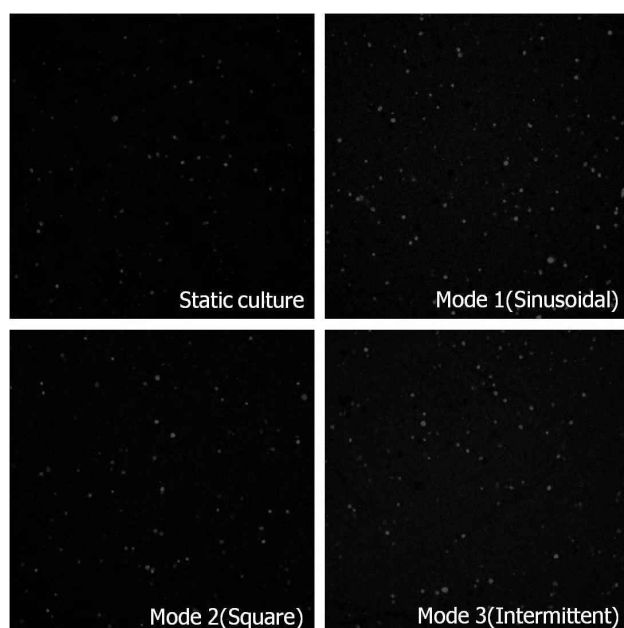


Fig.5 Fluorescence images of cell-encapsulated scaffold after 7days in dynamic and static cultures (X 100)

5. 결론

본 연구에서는 MC3T3-E1 세포를 아가로스 젤에 파종하여 세포 캡슐형 인공지지체를 제조하였다. 또한 개발한 바이오리액터를 이용하여 다양한 기계적인 압축력이 가하였을 때 세포의 증식에 대한 영향을 분석하였다.

유세포 분류기 측정 결과와 형광이미지를 비교한 결과를 살펴보면 두 가지 모두 다양한 기계적 자극을 가한 실험군이 기계적 자극을 가하지 않은 비교군에 비해 많은 세포의 수가 관찰되었다. 이로 미루어 보아 기계적 자극이 세포의 증식에 영향을 주는 것으로 판단된다. 그중에서도 특히 간헐적인 압축력을 가한 실험조건이 자극을 가하지 않은 비교군 보다 세포수가 약 43% 증가됨을 보였다. 따라서 여러 가지 기계적 자극 중에서도 간헐적 자극이 세포의 증식에 가장 큰 영향을 주는 것으로 판단된다.

향후 이러한 세포 증식에 대한 실험뿐만 아니라 세포 분화에 대한 다양한 간헐적 자극의 실험을 수행하여 세포 성장에 최적화된 기계적 자극조건을 분석할 예정이다.

후기

본 연구는 과학기술부의 특정기초 연구사업의 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 관계자 여러분께 감사드립니다.

참고문헌

- Robert L. Mauck, Michael A. Soltz, Christopher C.B. Wang, Dennis D. Wong, Pen-Hsiu Grace Chao, Wilmot B. Valhmu, Clark T. Hung, Gerard A. Ateshian, "Functional Tissue Engineering of Articular Cartilage Through Dynamic Loading of Chondrocyte-Seeded Agarose Gels," *Journal of Biochemical Engineering*, Vol. 122, pp. 252-260, 2000.
- John D. Kisiday, Moonsoo Jin, Michael A. DiMicco, Bodo Kurz, Alan J. Grodzinsky, "Effects of dynamic compressive loading on chondrocyte biosynthesis in self-assembling peptide scaffolds," *Journal of Biomechanics*, Vol. 37, pp. 594 -604, 2004.
- U. Meyer, A. Buchter, N. Nazer, H.P. Wiesmann, "Design and performance of a bioreactor system for mechanically promoted three-dimensional tissue engineering," *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, Vol. 44, pp. 134-140, 2006.
- Engelmayr Jr., G. C., Hildebrand, D. K., Sutherland, F. W. H., Mayer Jr, J. E., Sacks, M. S., 2003, "A novel bioreactor for the dynamic flexural stimulation of tissue engineered heart valve biomaterials," *Biomaterials*, Vol. 24, pp. 2523 ~2532.
- G. E. Nugent-Derfus, T. Takara, J. K O'Neill, Cahill, S. Gortz, T. Pong, H. Inoue, N. M. Aneloski, W. W. Wang, K. I. Vega, T. J. Klein, N. D, Hsieh-Bonassera, W. C. Bae, J. D. Burke, W. D. bugbee, R. L. Sah, 2007, "Continuous passive motion applied to whole joints stimulates chondrocyte biosynthesis of PRG4," *Osteo Arthritis and Cartilage*, Vol. 15, No. 5, pp. 566 ~574.
- 박정훈, 이인환, 이승재, 조동우, 강상순, "폐속조형 기술을 이용한 개선된 바이오리액터의 개발," *한국정밀공학회 춘계학술대회*, pp. 98-99, 2008.
- 강길선, 김문석, 민병현, 이일우, 이종문, 이해방, "생체조직공학용 지지체," *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Vol. 3, No.4, pp. 376-395, 2006.