

<응용논문>

DOI <http://doi.org/10.3795/KSME-B.2017.41.1.63>

ISSN 1226-4881(Print)
2288-5324(Online)

전도성 고분자 나노임프린트 패턴 상의 HeLa 세포 배양[§]

안준형* · 박경숙** · 이수옥* · 정상희* · 임형준* · 신용범**,* ,***,* ,**** · 이재종* ,****†

* 한국기계연구원 나노융합기계연구본부, ** 바이오헬스가드연구단,

*** 한국생명공학연구원 위해요소감지 BNT 연구단, **** 한국과학기술연합대학원대학교

HeLa Cell Culture on Nanoimprinted Patterns Using Conducting Polymer

Junhyoung Ahn^{*}, Kyungsook Park^{**}, Suok Lee^{*}, Sanghee Jung^{*}, Hyungjun Lim^{*},
Yong-Beom Shin^{**,* ,***,* ,****} and JaeJong Lee^{* ,****†}

* Nano-Convergence Mechanical System Research Division, Korea Institute of Machinery and Materials

** BioNano Health Guard Research Center

*** Hazards Monitoring Bionano Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

**** University of Science and Technology

(Received July 27, 2016 ; Revised September 28, 2016 ; Accepted October 4, 2016)

Key Words: Nanoimprint Lithography(나노임프린트 리소그래피), Conducting Polymer(전도성 고분자), Cell Culture(세포 배양), Nano Structure (나노구조체)

초록: 일반적인 세포 배양 기술은 평평한 표면에 세포 부착을 위한 화학적, 생화학적 표면처리를 하는 것이 기본이지만, 요즘 들어 마이크로나 나노 크기의 구조체를 형성하여 세포 부착을 하는 연구들이 많이 진행되고 있다. 본 연구에서는 전도성 고분자인 피롤과 나노임프린트 기술을 이용하여 300 nm 선 패턴과 150 nm 원기둥 패턴의 나노구조체 제작 후 대표적인 암세포인 HeLa 세포를 배양하여, 주사전자현미경과 공초점 현미경을 이용하여 세포의 부착 특성을 연구하였다. 상용 페트리 접시와 평면 피롤에서는 세포들이 부정형의 형태로 부착 및 배양되었지만, 선폭 300 nm 선패턴 상에서는 길이 방향으로 세포가 부착되고 세포 내의 핵과 액틴 역시 배열되어 있고, 지름 150 nm 원기둥 패턴 상에서는 단일 세포로 고정되고 세포 내 액틴은 방사상으로 나노구조체에 고정되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

Abstract: In bioscience and biotechnology, the research of fundamental life mechanisms and their diseases caused by insufficiency is important. The study of a whole organism is difficult and sometimes impossible because of DNA, RNA, proteins, cellular organelles, various cells, and organs. Cell cultures can provide a simple method for researching cellular mechanisms and conditions, both in terms of physiological performance, and in response to chemical stimulation. According to conventional cell culture methodology, the flat surface is used with surface treatments for cell adhesion on the surface. Micro- and nanoscale patterns have been developed with chemical and biochemical modifications for cell immobilization. In this study, HeLa cell culture on nanostructures patterns was studied, including the 300 nm line and 150 nm pillar structures, using nanoimprint lithography and pyrrole as a biocompatible conducting polymer.

- 기호설명 -

HTS : 고속다중스크리닝 기법(High-Throughput Screening)

DNA : 디옥시리보핵산(Deoxyribonucleic acid)

PLL : 폴리라이신(Poly-L-lysine)

PDMS : 폴리디메틸실록산(Polydimethylsiloxane)

DMEM: 둘베코 변형 이글배지(Dulbecco's modified Eagle's media)

PS : 폴리스티렌(Polystyrene)

MEMS : 미세전자기계시스템(Microelectromechanical system)

§ 이 논문은 대한기계학회 IT 융합부문 춘계학술대회 (2016. 5. 19.-20., 서울시립대학교) 발표논문임.

† Corresponding Author, jjlee@kimm.re.kr

© 2017 The Korean Society of Mechanical Engineers

PUA : 폴리우레탄아크릴레이트(Polyurethane acrylate)
 Ppy : 폴리피롤 (Polypyrrole)
 SEM : 주사전자현미경(Scanning electron microscope)
 DAPI: 다피(4',6'-Diamidino-2-phenylindole)
 PBS: PBS 완충용액(Phosphate-buffered saline)

1. 서론

생명 공학 연구에서 생명체의 기본 연구나 기능 부전에 의한 질병의 메커니즘에 대한 연구는 가장 중요한 부분이다. 그러나 생명체라 함은 많은 세포들의 통합체이기 때문에, 단백질이나 염색체, 그리고 세포 내 소기관들의 기능이나 약에 대한 반응, 그리고 질병의 기전들을 연구하는데 있어서는 어려움이 있고, 불가능한 부분이다. 그래서 생명공학 연구에서 기본적으로 생명체의 여러 기관에 대한 다양한 세포를 각기 배양하고, 배양한 세포들의 기본적 기능이나 약, 질병에 대한 기전들을 통합하여 한 개체의 전체적인 반응을 유추해낼 수 있다. 그래서 세포 배양 연구법은 최근까지도 변함없이 생명공학 연구에서 중요한 자리를 차지하고 있다. 하지만 질병연구나 신약 개발에 있어서 고속 다중 스크리닝 기법(HTS, High-Throughput Screening)을 이용하는 추세에서 전통적인 세포배양법은 시간과 비용면에서 많은 한계를 보이고 있다.

그와는 대조적으로 분자생물학에서, 마이크로 어레이 기법은 혁명적 방법으로 생의학 연구에서 각광을 받고 있다. DNA나 단백질 마이크로어레이 기술은 현재 상용화되어 유전병 연구나 신약 개발에서 시간을 많이 절약하는 효과를 보이고 있다. 그 예로, Affimetrix사의 DNA micro array 같은 경우, 전체 게놈 발현의 전사체 해독에서부터 30만 개 이상의 새로운 질병 관련 염색체를 분류하기까지 다양한 가능성을 보이고 있다.⁽¹⁾

마이크로 어레이 기법을 이용하여 DNA나 단백질 수준의 연구는 많은 진척이 있었지만, 과연 이 개별 단위의 연구들이 세포 수준에서는 어떻게 변화되는지 예측하기가 어렵다. 그래서 현재는 세포 칩을 이용하여 세포 내에서의 변화가 세포 수준에서 어떠한 결과를 보이는 것이 이슈가 되고 있다. 세포를 연구하기 위해서는 우선 세포를 2차원이나 3차원의 공간에 고정을 해야하는데, 일반적으로 평면 플라스틱 패트리 접시에 폴리라이신(poly-L-lysine)을 처리하여 세포가 부착할 수 있도록 하고 있지만, 마이크로나 나노 크기의 구조체를 형성하여 세포들이 빠르게 형태를 유지하여 부착하게 하

는 연구들이 많이 진행되고 있다. 본 연구에서는 전도성 고분자 중 특히 피롤(pyrrole)을 이용하여 실리콘 기판 위에 나노임프린트로 나노 패턴을 하고, 대표적인 암세포인 HeLa 세포를 배양하여 나노 패턴 형태에 따른 세포의 고정 상태를 관찰하였다.

2. 본 문

2.1 실험 방법

실리콘 기판에 선폭 300 nm, 깊이 300 nm, 간격 300 nm 크기를 갖는 선 패턴과 지름 150 nm, 깊이 300 nm, 간격 150 nm 크기를 갖는 원기둥 패턴을 가진, 가로 70 mm, 세로 70 mm의 실리콘 몰드를 제작한 후, 상기 실리콘 몰드 표면 상에 PDMS (polydimethylsiloxane)가 잘 분리되도록 퍼플루오로실란(perfluorosilane)의 유기분자막을 처리하고, 연성 PDMS와 경성 PDMS를 이용하여 경화시켜 PDMS 몰드를 형성시킨 후, 상기 PDMS 몰드를 실리콘 몰드로부터 분리시킨다. 패턴을 형성할 실리콘 기판에 글라이시독시프로필트리메톡시실란(glycidoxytrimethoxysilane) 용액을 30초간 3000 rpm의 속도로 회전도포 후, 150도로 가열한 핫플레이트 상에서 열처리하였다. 피롤을 이용한 나노임프린트용 수지를 만든 후, 열처리된 실리콘 기판 위에 30초간 3000 rpm의 속도로 회전 도포하여 수지막을 형성하였다. 한국기계연구원의 ANT-6HO 나노임프린트리소그래피 장비를 이용하여, 상기 PDMS 몰드를 수지막에 올려놓아 모세관 현상 및 표면 친화도를 이용하여 수지가 PDMS 몰드로 이동한 후, 365 nm 파장의 자외선을 3분간 조사하였다(Fig. 1). 이후 PDMS 몰드를 분리한 후, 피롤 수지의 나노임프린트 미세 선 패턴 및 원기둥 패턴

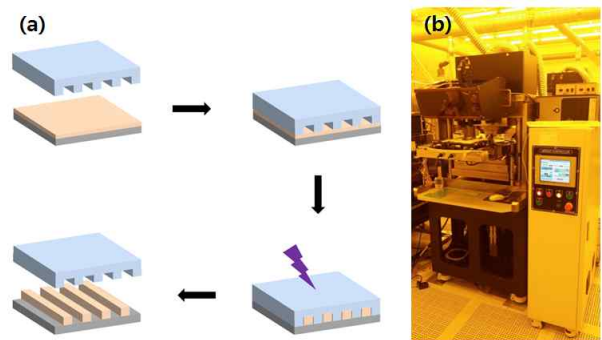


Fig. 1 (a) Scheme of nanoimprint lithography of nano-scale patterns using pyrrole, and (b) ANT-6HO UV/thermal nanoimprint lithography (developed by KIMM)

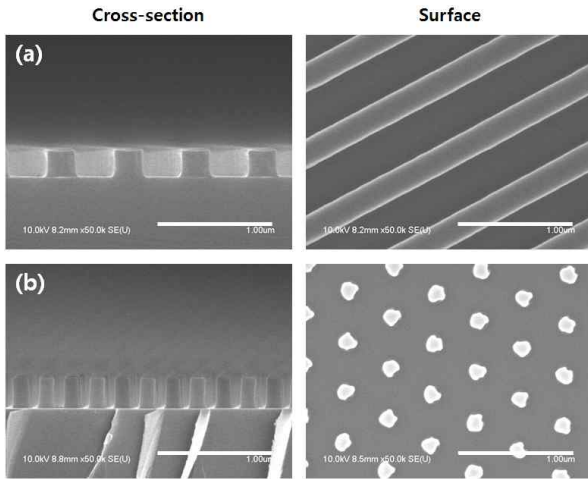


Fig. 2 SEM images of PPy-nanoimprinted patterns; (a) 300 nm line, and (b) 150 nm pillar pattern (bar scale: 1 μm)

을 수득하였다(Fig. 2).

배양된 HeLa 세포를 나노구조체 표면에 부은 후 DMEM(Dulbeco's modified Eagle's media) 배지에서 37도, 이산화탄소 환경으로 24시간 배양하고, 배양된 HeLa 세포를 5% 글루타알데하이드 (glutaraldehyde) 용액에 10분간 담지하여 HeLa 세포를 고정한 후 나노구조체 상의 부착 상태를 주사전자현미경을 이용하여 관찰하였다.

평면과 나노구조체 상의 세포 고정 상태를 확인하기 위하여 세포핵과 액틴을 형광 염색법을 이용하여 공초점 현미경(Zeiss LSM800 Confocal Microscope)으로 관찰하였다. 공초점 현미경 전용 패트리 접시에 먼저 서술된 나노임프린트 방법을 이용하여 PPy가 도포된 평면 접시와 300 nm 선패턴, 150 nm 원기둥 패턴, 그리고 일반 패트리 접시, 총 4가지의 패트리 접시를 준비하였다. 그리고 앞서 서술된 방식과 동일하게 HeLa 세포를 배양하였다. 세포를 고정하기 위해 3.7% 포르말데하이드 (formaldehyde)를 처리하고, 세포의 액틴을 염색하기 알렉사488 팔로이딘(Alexa488-phalloidin) 용액을 반응시켰다. 이후 세포의 핵을 염색하기 위해 다피(DAPI)를 포함한 배지를 반응시키고, 공초점 현미경을 이용하여 세포의 핵과 액틴의 배열성을 관찰하였다.

2.2 결과 및 고찰

일반적으로 이용되는 세포 배양법은 폴리펩타이드(polypeptide)의 한 종류인 폴리라이신(PLL, poly-L-lysine)을 처리한 폴리스타이렌(PS, polystyrene) 재질의 패트리 접시를 이용한다. 현재 MEMS

(micro-electro-mechanical system) 공정을 이용한 세포 배양법도 많은 연구가 진행되고 있다.⁽²⁾ MEMS 공정을 이용한 세포 배양법에서 중요한 요소는 세포 부착을 위한 단백질의 표면 흡착과 세포의 부착성, 생적합성의 MEMS용 물질, 표면 개질을 이용한 개선된 생적합성이다. 하지만 MEMS 공정 자체가 설비나 생산 비용이 고가인 단점들이 있다.

1996년 프린스턴 대학의 추 교수⁽³⁾에 의해 개발된 나노임프린트 리소그래피 기술은 자외선이나 열을 이용하여 경화되는 특수한 수지와 몰드를 이용하여 나노구조체를 대량으로 생산할 수 있게 되어 나노기술의 발전에 많은 영향을 끼쳤다. 또한, 단순한 방법으로 인해 나노구조체 제작 비용을 절감할 수 있고, 고속으로 고해상도의 나노구조체를 제작할 수 있는 장점이 있다.

전도성 고분자는 생적합성이면서 전기전도도를 가지기 때문에 전기화학적 바이오센서에 많이 응용되고 있다. 가르시아 등⁽⁴⁾은 삼전극 전기화학 소자의 작업전극 상에 피롤 필름을 만들고 이에 DNA 프로브를 고정하여 DNA 측정 바이오센서를 제작하였고, 게르소이 등⁽⁵⁾은 작업전극 상의 피롤 필름에 갈락토즈 분해효소를 고정하여 락토오즈 측정 바이오센서를 개발하였다.

전도성 고분자 중의 한 종류인 피롤은 생적합성 고분자로도 잘 알려져 있다.⁽⁶⁾ 하지만, 피롤만을 이용하여 나노구조체를 제작한 경우는 현재까지 존재하지 않는다. 스트란드위츠 등⁽⁷⁾은 피롤을 자외선을 이용하여 광중합하여 산화타이타늄과 폴리피롤의 복합체를 개발하였다. 이 연구를 기반으로 하여 피롤을 이용한 광경화성 수지를 개발하였고, 본 연구에 쓰일 폭 300 nm의 선 패턴과 지름 150 nm의 원기둥 패턴을 제작하였다(Fig. 2).

나노 패턴 상에서 세포의 부착과 배양 상태를 관찰하기 위해, 대조구로서 시중에 유통되는 세포 배양용 패트리 접시와 실험구로서 피롤을 이용한 평면 및 선폭 300 nm 선패턴과 지름 150 nm 원기둥 패턴, 이 세가지로 하였다. 대조구와 실험구에 동물 세포 동향 실험에 일반적으로 이용되는 HeLa 세포를 24시간 배양하고 이후 주사전자현미경을 이용하여 각 표면에서의 세포 부착 상태를 관찰하였다.

일반적인 패트리 접시에 배양된 HeLa 세포는 부착상태에서 25~50 μm 의 크기로 접시 표면에 부착된 상태를 확인하였고, 세포들 간의 간격이 수 μm 로 이웃 세포들과 붙어 자라는 상태를 보여

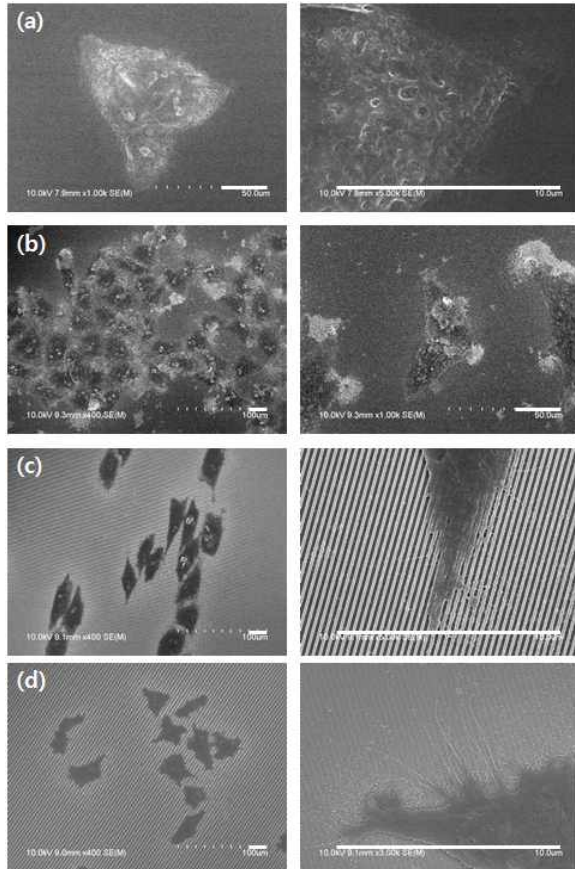


Fig. 3 SEM images of HeLa cells; (a) petri dish, (b) PPy flat surface, (c) 300 nm line pattern of PPy, and (d) 150 nm pillar pattern of PPy (bar scale: 20 μ m)

준다[Fig. 3(a)]. 첫번째 실험구인 피클이 도포된 평면에서도 페트리 접시와 유사한 형태로 세포들이 부착되고 배양된 것을 확인할 수 있다[Fig. 3(b)]. 반면 선폭 300 nm의 선패턴 상에서는 패턴 방향에 따른 세포의 부착 상태를 확인할 수 있었고, 선 방향으로 60~70 μ m, 교차 방향으로 10~20 μ m의 크기로 선패턴 상에 고정되었다[Fig. 3(c)]. 그리고 지름 150 nm의 원기둥 패턴 상에서는 평면 배양과는 다르게 20~30 μ m의 크기로 부착 및 배양되었고, 평면과 선 패턴과는 다르게 세포들이 단독으로 표면 상에 부착되는 경향을 보이고 있다[Fig. 3(d)].

일반적인 세포의 배양 상태와 나노 패턴상의 상태를 비교하기 위해, 대조구로서 공초점 현미경용 페트리 접시와 실험구로서 피클을 이용한 평면 및 선폭 300 nm 선패턴과 지름 150 nm 원기둥 패턴 상에 HeLa 세포를 배양하고 이후 세포의 핵은 다피(DAPI), 액틴은 알렉사 488 팔로이딘(Alexa488 phalloidin)을 이용하여 염색하고 이를 공초점 현미경으로 관찰하였다. 대조구로서 일반 페트리 접시

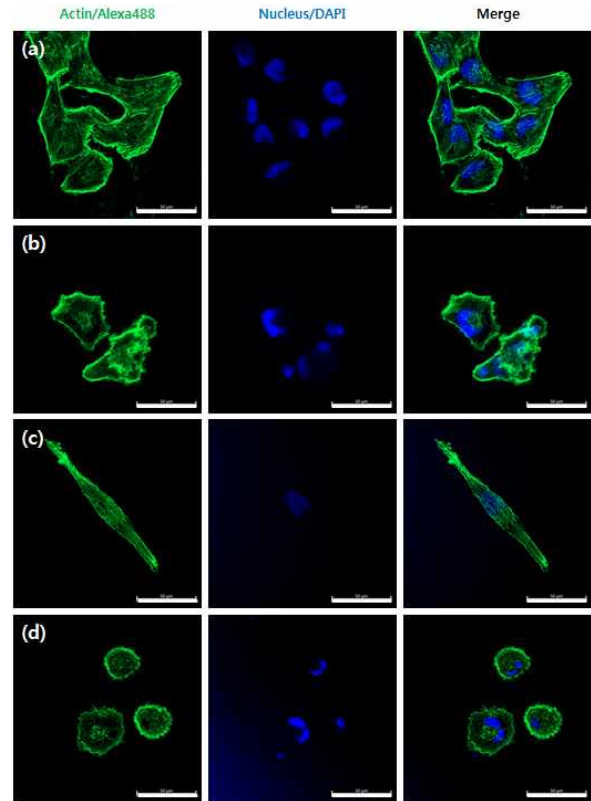


Fig. 4 Confocal images of HeLa cells; (a) petri dish, (b) PPy flat surface, (c) 300 nm line pattern of PPy, and (d) 150 nm pillar pattern of PPy (bar scale: 50 μ m)

는 주사전자현미경과 마찬가지로 25~60 μ m의 크기로 이웃 세포들과 붙어 자라는 것을 확인할 수 있었고, 세포 내 액틴의 배열도 세포막의 방향과 일치하고 세포 내에 불규칙하게 형성되어 있는 것을 확인할 수 있었다[Fig. 4(a)]. 실험구 중 첫 번째 시료인 피클 평면 상에 배양된 세포들도 일반 페트리 접시와 유사한 경향을 보인다[Fig. 4(b)]. 그러나 두 번째 시료인 선폭 300 nm 선패턴 상에서는 패턴의 방향에 따라 세포의 핵과 액틴이 배열되어 있는 것을 확인할 수 있다. 세포도 폭 20 μ m, 길이 150 μ m로 확연히 차이를 보이고 있다[Fig. 4(c)]. 세 번째 실험구인 지름 150 nm 원기둥 패턴 상의 세포는 일반 페트리 접시 상의 세포와는 다르게 이웃 세포들과의 간섭 없이 단일 세포가 고정되어 있는 것을 확인할 수 있었고, 그 크기도 40 μ m에서 거의 원형을 유지하고 있었다. 더욱이 세포의 액틴은 세포막 주위로 방사상의 배열을 보이며 원기둥 나노구조체에 고정되어 있는 것을 확인할 수 있었다[Fig. 4(d)]. 페라리 등⁽⁸⁾은 환형올레핀 공중합체를 이용하여 다양한 선패턴 상에 신경세포를 배양하여 세포의 극성을 조절하는 연구를 했고,

양 등⁹⁾은 폴리우레탄아크릴레이트(PUA) 수지를 이용하여 줄기세포를 선패턴에 배양하고 이후 근육 세포로 분화하는 과정에서 평면에서보다 선패턴의 방향성으로 말미암아 분화에 더 유리하다는 연구를 하였다. 이들 선행연구와 비교하여 본 피롤 패턴도 생적합성이 있고, 이를 이용하여 줄기세포나 신경 세포 배양에도 효과가 있을 것으로 기대된다.

3. 결 론

전도성 고분자 기반의 광경화성 피롤 수지를 개발하고, 피롤 나노구조체 상에 HeLa 세포를 배양함으로써, 선 형태의 나노구조체에서는 세포들이 방향성을 가지고 배양되는 것을 확인하였고, 원기 등 형태의 나노구조체에서는 세포들이 각각의 개체로 배양되는 것을 확인하였다. 이로서 동물 세포가 나노구조체 상에서 방향성과 단독 배양을 할 수 있다는 가능성을 확인하였다. 또한 전도성 고분자 중의 하나인 피롤을 이용함으로써 전기적인 신호 및 전기화학적 바이오센서의 측정에 응용할 수 있을 것이다.

후 기

본 연구는 미래창조과학부 글로벌프론티어사업 바이오나노헬스가드연구단(Grant Number H-GUARD_2013M3A6B2078, H-GUARD_2013M3A6B2078950)의 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌 (References)

(1) Primiceri, E., Chirico, M.S., Rinaldi, R. and

Maruccio, G., 2013, "Cell Chips as New Tools for Cell Biology-results, Perspectives and Opportunities," *Lab on a Chip*, Vol. 13, pp. 3789~3802.

(2) Ni, M., Tong, W.H., Choudhury, D., Rahim, N.A.A., Iliescu, C. and Yu, Hanry, 2009, "Cell Culture on MEMS Platforms: A Review," *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 10, pp. 5411~5441.

(3) Chou, S.Y., Kraus, P.R. and Renstrom P.J., 1996, "Imprint Lithography with 25-nanometer Resolution," *Science*, Vol. 272, Issue 5258, pp. 85~87.

(4) Garcia,D.E., Chen, T.-H., Wei, F. and Ho, C.-M., 2010, "A Parametric Design Study of an Electrochemical Sensor," *Journal of Laboratory Automation*, Vol. 15, Issue 3, pp. 179~188.

(5) Gursoy, O., Celik, G. and Gursoy, S.S., 2014, "Electrochemical Biosensor Based on Surfactant Doped Polypyrrole (PPy) Matrix for Lactose Determination," *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 131, Issue 9, p. 40200.

(6) Balint, R., Cassidy, N.J. and Cartmell, S.H., 2014, "Conductive Polymers: Towards a Smart Biomaterial for Tissue Engineering," *Acta Biomaterialia*, Vol. 10, pp. 2341~2353.

(7) Strandwitz, N.C., Nonoguchi, Y., Boettcher, S.W. and Stucky, G.D., 2010, "In Situ Photopolymerization of Pyrrole in Mesoporous TiO₂," *Langmuir*, Vol. 26, pp. 5319~5322.

(8) Ferrari, A., Cecchini, M., Dhawan, A., Micera, S., Tonazzini, I., Stabile, R., Pisignano, D. and Beltram, F., 2011, "Nanotopographic Control of Neuronal Polarity," *Nano Letters*, Vol. 11, pp. 505~511.

(9) Yang, S.Y., Lee, B., Tsui, J.H., Macadangdang, J., Jang, S.-Y., Im, S.G. and Kim, D.-H., 2016, "Electroconductive Nanopatterned Substrates for Enhanced Myogenic Differentiation and Maturation," *Advanced Healthcare Materials*, Vol. 5, pp. 137~145.