

나노임프린트 리소그래피 공정으로 제작된 생체모사 나노패턴의 세포 성장 활성화

손경성, 배원규
승실대학교

Investigation of cell growth of biomimetic nanopattern fabricated by nanoimprint lithography process

Kyeong-Seong Son, Won-Gyu Bae
Soongsil University

Abstract - 세포에 전기 자극을 가하면 세포를 성장(cell growth)시킬 수 있다. 그리고 체내에서 세포가 성장하는 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)은 세포가 성장할 때 여러 영향을 준다. 이에 ECM을 모사한 나노패턴 마스터몰드를 나노임프린트 리소그래피 공정을 통해 직접 제작했다. 마스터 몰드를 이용하여 제작한 나노패턴이 있는 PET 필름과 일반 PET 필름에 각각 세포를 배양하고 전기 자극을 가해서 세포 성장 비율을 비교해보니 나노패턴이 있는 PET 필름에 배양한 세포가 일반 PET 필름보다 세포 성장이 활성화되는 것을 관찰할 수 있었다. 세포 성장 활성화에 ECM 모사 나노패턴을 이용하면 피부재생과 외상 치료 등 다양한 분야에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

가해서 세포 성장을 관찰한다.

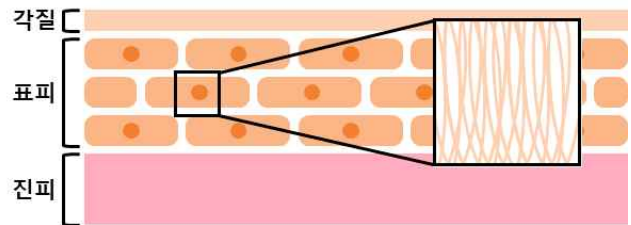
2.2.1 생체모사 나노패턴 표면제작

세포가 자라는 ECM은 특정한 방향성을 가진 구조이다. <그림 1>과 같이 실리콘 웨이퍼에 포지티브 포토레지스트를 스핀 코팅 후 포토마스크로 원하는 곳에만 UV를 가해서 포토레지스트를 제거한다. 이후 포토레지스트가 제거된 부분에 플라즈마를 가하는 식각 공정을 통해 원하는 깊이의 나노패턴을 제작한다. 최종적으로 노출되지 않은 포토레지스트를 제거해서 생체모사 나노패턴 표면을 제작할 마스터 몰드를 제작한다. 위와 같은 공정을 통해 제작한 마스터몰드를 이용하여 너비 200 nm의 홈을 배치간격 1:2로 제작하여, 특정한 방향성을 가진 ECM 모사 나노패턴을 제작할 수 있다.

1. 서 론

의료기술의 발달과 더불어 조직공학(tissue engineering)의 중요성이 증가하고 있다. 세포를 이용하는 조직공학에서는 세포의 성장과 증식을 활성화 시키는 방법이 중요하다. 하지만 현재 실험실에서 전기 자극을 가해 세포를 배양하는 유리 혹은 플라스틱의 매끈한 표면은 실제 세포가 자라는 환경을 고려하지 못하기 때문에, 세포가 증식하기 적합한 환경이 아니며 실제 세포의 성장과 차이가 존재한다. 따라서 체내에서 세포가 성장하는 환경과 유사한 조건을 적용한 연구가 진행되어왔다[1].

실제 세포가 자라는 환경은 세포외기질(extracellular matrix, ECM)이다. ECM은 세포가 성장하는 구조적 환경을 제공하는 물리적 역할 뿐만 아니라, 세포의 성장과 분화에 적합한 생화학적 요소들 또한 제공한다[2]. 이에 나노임프린트 리소그래피(nanoimprint lithography) 공정으로 제작된 ECM 모사 나노패턴에서 세포를 배양하고 전기 자극을 가해서 세포 성장을 활성화 시키는 방안을 연구하고자 한다.

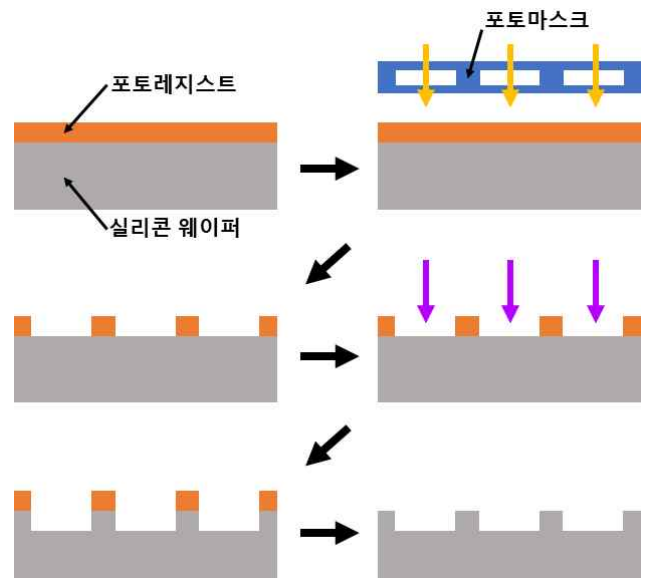


<그림 1> ECM 구조

2. 본 론

2.1 막 전위 제어 원리

세포가 이온 채널과 이온 펌프를 통과하며 세포막에서 생성되는 전위차를 막 전위(membrane potential)하며 보통 0 mV에서 -100 mV 사이의 전위 값을 가진다. 간극 전압(gap junction)은 두 세포의 세포질을 연결해서 이온과 분자를 연결하는 통로이다. 막 전위는 간극 전압을 통해 전달되며, 이로 인해 체내 세포 간 신경전달이 가능하다[3]. 막 전위는 세포의 종류에 따라 값이 달라진다. 그리고 세포의 증식(proliferation), 분화(differentiation), 이동(migration) 등 개별적인 기능을 조절하며, 상처 회복과 조직 재생 등 병리학적 과정에도 중요한 역할을 한다. 외부 전기 자극을 통해 막 전위를 제어할 수 있고, 세포의 성장 또한 활성화시킬 수 있다[4].



<그림 2> ECM 모사 나노패턴 제작 공정

2.2 재료 및 방법

나노임프린트 리소그래피 공정으로 ECM 모사 나노패턴을 제작한다. 나노패턴이 형성된 표면에 세포를 배양하고 전기자극을

2.2.2 실험 조건

NIH-3T3 세포가 Dulbecco's modified Eagle's medium

(DMEM) (Invitrogen, USA)에서 배양된다. 평평하고 나노패턴이 새겨진 PET 필름을 UV 챔버 (Fusion Cure System, Minuta Tech0 에서 소독을 진행하고, 각각의 PET 필름에 세포가 접종 (seed) 된다.

세포 배양 배지에 일정한 전기 자극을 가하기 위하여 소독을 마친 탄소 전극이 세포가 배양되고 있는 PET 필름에 각각 전기 자극을 가한다. 함수 발생기 (33220A, Agilent), DC 파워 서플라이 (IT6322, ITTECH), 임의 함수 발생기 (AG875, Analog arts)를 악어클립 구리선 케이블을 통해 전극과 결선한다. 모든 전기 자극은 세포 접종 24시간 이후에 가해지기 시작했으며, NIH-3T3 세포에 가해지는 전기 자극은 180 mV의 실효값으로 1시간 씩 12시간 간격으로 가해진다. 세포에 가해지는 전극의 파형은 디지털 오실로스코프 (TBS 1052B, Tektronix)를 통해 지속적으로 관측된다.

전기 자극을 받은 NIH-3T3 세포 상등액(supernatant)에 있는 1종 콜라겐의 함유량을 ELISA 키트의 사용자 매뉴얼에 따라 측정했다. 1종 콜라겐의 함유량을 측정 후 시간에 따른 콜라겐의 세포 성장 비율을 측정했고 그 식은 아래와 같다. 12시간 간격으로 성장 비율에 따른 값을 기록했다.

$$\text{세포 성장 비율} = \frac{\text{초기 세포면적} + \text{세포 성장 면적}}{\text{초기 세포면적}}$$

2.3 결과 및 분석

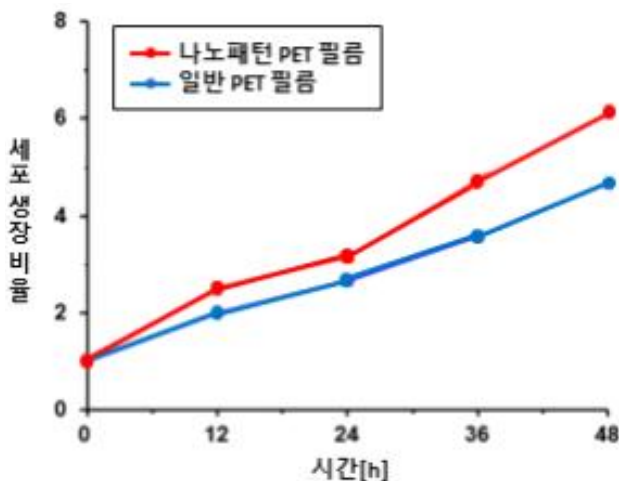
실험 조건에 따라 실험을 수행한 후에 세포외기질 모사 나노패턴이 있는 PET 필름과 일반 PET 필름에서 세포를 배양하고 성장시킬 때 세포 성장 비율과 세포 성장 속도에 유의미한 차이가 있음을 발견할 수 있었다.

2.3.1 실험 결과

실험을 시작할 때 세포를 배양하는 면적과, 시간에 따라 세포가 성장하는 면적의 비율인 세포 성장 비율을 시간에 따라 나타냈을 때의 실험 결과는 아래 <표 1>과 <그림 3>과 같다.

<표 1> 시간에 따른 세포 성장 비율

세포 배양 시간	나노패턴 PET 필름	일반 PET 필름
0시간	1	1
12시간	2.15	2.0
24시간	3.0	2.4
36시간	4.6	3.2
48시간	6.05	4.35



<그림 3> 시간에 따른 세포 성장 비율

2.3.2 결과 분석

시간에 따른 세포 성장 비율을 관찰했을 때, 나노패턴이 있는 PET 필름과 일반 PET 필름 모두 세포를 배양하고 전기 자극을 가했을 때, 시간이 지남에 따라 세포가 성장하지만, 세포 성장 비율의 차이가 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 나노패턴에 배양한 세포는 시간이 흐를수록 세포의 성장 속도가 일반 PET 필름에 배양한 세포의 성장 속도보다 더 빨라짐을 확인할 수 있다. 특히 세포 배양 후 전기 자극을 가하고 24시간 이후 세포 성장 비율 변화 속도에 약 2배 정도의 큰 차이가 생기는 것으로 보아, 세포 배양에 많은 시간을 요구하는 조직공학 분야에 생체 모사 나노패턴을 적용할 때 더 많은 세포 성장 활성화 효과를 기대할 수 있다.

ECM이 세포가 성장하는 물리적 공간을 제공하는 구조적 특징과 더불어 여러 생화학적 기여를 하는데, ECM을 모사한 나노패턴에 세포를 배양하는 것만으로도 세포의 성장을 활성화시킬 수 있다고 판단된다. 특히 실험 환경에서는 세포가 성장하는 환경이 중요한데 일반 PET 필름과 같이 실험실에서 사용되는 매끄러운 혹은 가공되지 않은 플라스틱, 유리 표면은 세포외기질 생체 모사 나노패턴 표면에 비해 세포의 성장에 적합한 환경이 아니라고 판단된다.

세포외기질 모사 나노패턴은 세포가 실질적으로 성장할 수 있는 물리적, 구조적 공간을 제공할 수 있기에 세포 성장이 활성화 된다. 그리고 세포가 더 성장할수록 더 많은 물리적, 구조적 공간을 제공할 수 있기에 세포 성장 속도가 더 빨라진다고 생각된다.

3. 결론

나노임프린트 리소그래피 공정을 통해 ECM 모사 마스터몰드를 제작하고, 마스터 몰드를 통해 제작한 ECM 모사 나노패턴이 있는 PET 필름에 세포를 배양하고 전기 자극을 가했을 때 일반 PET 필름에 배양하고 전기 자극을 가한 세포보다 세포 성장이 많이 되고, 세포의 성장이 빨라지는 것을 관찰할 수 있었다. 즉, 세포 성장의 활성화를 관찰할 수 있었다. 특히 24시간 이후에는 세포의 성장 비율 변화 속도가 약 2배 정도의 큰 차이가 생기며, 일반 PET 필름에 비해서 더 많은 세포 성장 활성화를 관찰할 수 있었다. 하지만 세포외기질 모사 나노패턴은 아직 세포가 실제로 성장하는 환경과 상이한 점이 많으며 더 많은 연구를 통해 실제 세포의 성장 환경과 더 유사한 조건의 연구가 요구된다고 생각한다. 세포의 성장을 활성화 시키는 연구가 조직공학에서 피부 재생 및 피부 외상 치료에 기여할 수 있을 것이라 생각된다.

[참고 문헌]

- [1] Nguyen et al., "From nano to micro: Topographical scale and its impact on cell adhesion, morphology and contact guidance", Journal of Physics Condensed Matter, Volume 28, 183001, 12 April 2016
- [2] McLaughlin et al., "Bioelectric signaling in regeneration: Mechanisms of ionic controls of growth and form", Developmental Biology, Volume 433, 177-189, 2018
- [3] Jin-Young So et al., "The synergistic effect of biomimetic electrical stimulation and extracellular-matrix-mimetic nanopattern for upregulating cell activities", Biosensors and Bioelectronics, Volume 167, 112470, 2020
- [4] Aryasomayajula et al., "DC microelectrode array for investigating the intracellular ion changes", Biosensors and Bioelectronics, Volume 26, 1268-1272, 2010