(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0114708
(43) 공개일자 2014년09월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01Q 60/24 (2010.01) *G01N 27/30* (2006.01)
G01N 33/483 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0029410
(22) 출원일자 2013년03월19일
심사청구일자 2013년03월19일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
이기자
서울 노원구 마들로 31, 104동 1504호 (월계동, 그랑빌아파트)
박헌국
서울 동대문구 무학로34길 8, (용두동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

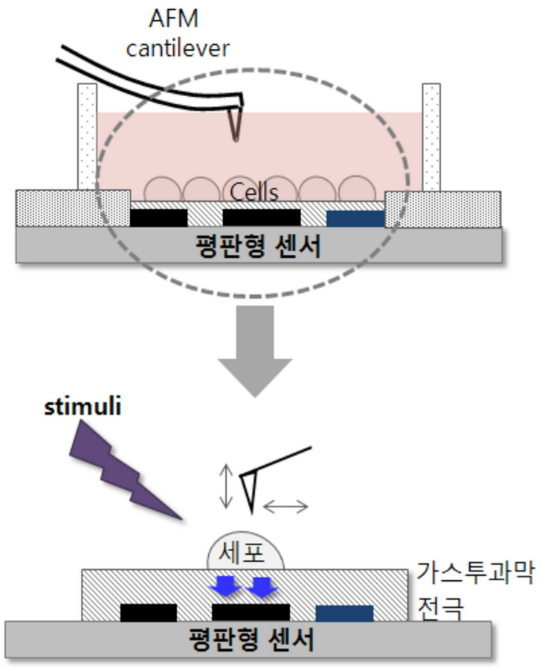
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **세포 기능 평가용 양방향 동시측정 시스템**

(57) 요 약

본 발명은 (i) 원자력 현미경(atomic force microscopy); 및 (ii) 가스투과막 및 가스투과막으로 연결된 전극을 포함하고, 세포를 배양하여 세포분비물질을 측정할 수 있는 평판형 센서를 포함하는, 세포 기능 평가용 양방향 동시측정 시스템과 이를 이용하여 세포의 기능을 평가하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 세포 기능 평가용 양방향 동시측정 시스템은 세포의 형태 및 물성, 세포대사물질의 분비량 등 다양한 세포의 특성을 실시간으로 동시에 평가함으로써, 세포의 기능 평가가 가능할 뿐만 아니라, 세포의 기능 평가를 통하여 세포에 처리되는 물질들의 효과를 확인할 수 있어, 관련된 질환의 조기진단, 약물 스크리닝 및 치료약물 개발 등에 접목하여 활용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

강성욱

서울 강북구 솔매로41길 37-11, (미아동)

김옥균

서울 동대문구 천호대로25길 81, 1501호 (용두동, 대명랜드마크타워)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0019912

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오 의료기술개발사업

연구과제명 차세대 압타머 기반 심혈관질환 조기진단 및 치료시스템 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교

연구기간 2010.06.30 ~ 2015.06.29

특허청구의 범위

청구항 1

(i) 원자력 현미경(atomic force microscopy); 및

(ii) 가스투과막 및 가스투과막으로 연결된 전극을 포함하고, 세포를 배양하여 세포분비물질을 측정할 수 있는 평판형 센서

를 포함하는, 세포 기능 평가용 양방향 동시측정 시스템.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 원자력 현미경은 세포의 형태 및 물성을 측정할 수 있는 것인 시스템.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 평판형 센서는 일산화질소의 분비량을 측정하는 것인 시스템.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 세포는 혈관내피세포인 것인 시스템.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 시스템은 혈관내피세포의 형태, 물성 및 일산화질소 분비량을 동시에 측정함으로써, 혈관내피의 기능을 평가하기 위한 것인 시스템.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 세포는 대식세포인 것인 시스템.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 시스템은 대식세포의 형태, 물성 및 일산화질소 분비량을 동시에 측정함으로써, 대식세포에 처리된 항염증물질의 효과를 평가하기 위한 것인 시스템.

청구항 8

(a) 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 세포 기능 평가용 양방향 동시측정 시스템에서 세포를 배양하는 단계;

(b) 원자력 현미경을 이용하여 세포의 형태 및 물성을 측정하는 단계; 및

(c) 가스투과막 및 가스투과막으로 연결된 전극을 포함하는 평판형 센서를 이용하여 세포분비물질을 측정하는 단계를 포함하는, 세포의 기능을 평가하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 (b) 단계 및 (c) 단계는 동시에 수행되는 것인 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 (c) 단계에서 일산화질소의 분비량을 측정하는 것인 방법.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 세포는 혈관내피세포 또는 대식세포인 것인 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 세포 기능 평가용 양방향 동시측정 시스템에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 (i) 원자력 현미경(atomic force microscopy); 및 (ii) 가스투과막 및 가스투과막으로 연결된 전극을 포함하고, 세포를 배양하여 세포분비물질을 측정할 수 있는 평판형 센서를 포함하는, 세포 기능 평가용 양방향 동시측정 시스템과 이를 이용하여 세포의 기능을 평가하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 혈관질환은 혈관이 막히거나 터지면서 조직에 혈액공급의 장애를 유발하는 질환으로, 고혈압, 동맥경화 등이 대표적이며, 뇌경색, 뇌출혈, 허혈성 심질환, 심근경색, 동맥류 등 다양한 질병을 유발한다. 최근 혈관관련 연구가 활발하게 진행되는 것은 동맥경화, 심장병, 뇌졸중 등이 혈관을 주체로 하는 질환이라는 점과, 암의 성장이나 전이 또한 혈관에서 일어나는 현상이기 때문이다.

[0003] 혈관 기능은 기본적으로 심장에서 방출된 혈액을 말초조직에 잘 전달되도록 하는 것이며, 혈관내피세포는 혈관이완물질 (endothelial dependent relaxing factor, EDRF)인 산화질소 (nitric oxide: NO)를 지속적으로 소량씩 분비하여 혈관 이완 조절에 중요한 역할을 한다. 정상 내피세포는 혈액과 혈관벽을 구분짓는 일련의 벽을 형성하여 혈전 형성에 대한 내성을 제공하며 또한 혈관 활성물질을 분비하여 혈관의 긴장도, 성장, 지혈 및 염증 작용들을 조절하는 능력이 있고, 특히 내피세포의 손상은 염증반응과 함께 섬유화 증식을 초래하여 일련의 동맥경화증을 발생 또는 악화시킨다고 알려져 있다. 따라서, 혈관내피세포의 기능장애는 혈관 항상성 유지라는 균형을 깨뜨려 동맥벽의 손상을 초래하며 동맥경화증의 초기 표식자로 사용할 수 있다. 즉, 내피세포 의존성 혈관 확장반응의 장애는 죽상 경화증의 초기 과정인 혈관내피세포 기능장애를 나타내는 중요한 지표로 이용되고 있다.

[0004] 하지만, 혈관내피세포 의존성 혈관이완능 측정에 있어 혈관 활성도의 정확한 평가에는 초음파 탐촉자의 위치 및 고정, 혈관 활성도의 측정시간 등의 문제로 기존의 측정방법으로는 정확한 활성도 평가에 한계가 있다. 또한, 현재 사용되는 일산화질소 분석법은 화학발광법(chemiluminescence), 분광광도법(spectrophotometry), 생물학적 정량법(bioassay) 등으로, 비정량적이거나 NO_2^-나 NO_3^- 같은 물질의 농도를 통하여 간접적으로 알아내는 방법들이다.

[0005] 따라서, 상기와 같은 혈관내피세포를 포함한 다양한 세포에 대하여, 그와 관련된 다양한 질환에 대한 연구를 위하여 분리된 세포의 다양한 기능을 신속하고 정확하게 평가하는 여러 가지 방법들이 요구되고 있으며, 그에 따라 다양하게 개발되고 있다.

[0006] 한편, 세포의 기능을 평가하기 위한 하나의 장치로서, 원자력 현미경(atomic force microscope, AFM)은 나노수준의 고분해능으로 세포형태 및 특성을 파악할 수 있는 장치로, 세포 표면의 형성뿐만 아니라, 세포 내 기관, 세포 골격 등의 분자적 정보를 제공할 수 있고, 힘-거리간 곡성을 통한 탄성 등의 물성측정이 가능하다. 무엇보다도 특별한 전처리나 표지물질 없이도 대기 중에서 뿐만 아니라 액체 내의 시료에 대해서도 측정이 가능하여 배양 중인 세포에 적용가능하므로 생물학적, 의학적 연구에 활용되고 있다. 다만, 높낮이의 변화를 통해 이미지화 하므로 세포 표면에 발현된 단백질이나 유전자의 식별은 가능하나 동정은 불가능하여 세포로부터

분비되는 대사물질이나 신호전달물질과 같은 생화학적 변화는 분석하기 어렵다는 단점이 있다..

[0007] 즉, AFM을 이용한 혈관내피세포의 형태학적, 물성 변화 측정 연구들은 세포 자체의 변화를 관찰한다는 점에서 큰 장점을 가지지만, 세포에서 분비되는 신호전달물질의 변화가 어느 정도인지 알 수 없으므로 세포의 기능평가를 위한 하나의 보조장비로 한계를 가지며, 생화학적인 변화에 대한 분석을 별도로 수행하여야 하는 불편함이 있다.

[0008] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 혈관내피세포를 비롯한 다양한 세포에 대하여 세포의 직접적 형태나 물성 및 세포분비물질의 분비량을 동시에 측정할 수 있는 시스템을 개발하고자 예의 노력한 결과, 평판형 센서를 이용하여 센서전극 표면에 세포를 직접 배양하면서 세포에서 방출되는 물질의 변화량을 실시간으로 측정하면서, 동시에 세포의 형태적 변화 및 물성 변화를 측정할 수 있는 시스템이 세포 기능 평가에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 하나의 목적은 (i) 원자력 현미경(atomic force microscopy); 및 (ii) 가스투과막 및 가스투과막으로 연결된 전극을 포함하고, 세포를 배양하여 세포분비물질을 측정할 수 있는 평판형 센서를 포함하는, 세포 기능 평가용 양방향 동시측정 시스템을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 세포 기능 평가용 양방향 동시측정 시스템을 이용하여 세포의 기능을 평가하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 (i) 원자력 현미경(atomic force microscopy); 및 (ii) 가스투과막 및 가스투과막으로 연결된 전극을 포함하고, 세포를 배양하여 세포분비물질을 측정할 수 있는 평판형 센서를 포함하는, 세포 기능 평가용 양방향 동시측정 시스템을 제공한다.

[0012] 본 발명에서 사용되는 용어, "원자력 현미경(atomic force microscopy, AFM)"은 일반적인 광학적 회절한계보다 1000배 높은 나노미터 수준의 해상도를 갖는 고해상도의 주사탐침 현미경(scanning probe microscopy)이다. AFM은 주사터널링현미경(scanning tunneling microscopy, STM)의 단점을 극복하기 위해 제작된 것으로, STM은 양자터널링(quantum tunneling) 개념에 기초하므로 전도성 탐침을 필요로 하며, 전도성 또는 반도체성 시료에 적용할 수 있는 반면, AFM은 원자간력을 이용하므로 어떤 형태의 표면 예컨대, 고분자, 세라믹, 복합물, 유리 및 생물학적 시료에 널리 사용할 수 있다. 일반적으로 AFM은 캔틸레버 말단에 위치한 탐침을 포함하며, 상기 탐침의 말단과 시료표면 간에 작용하는 힘을 측정한다. 구체적으로, 이는 탐침이 위치한 캔틸레버의 용수철 상수에 의존한다. 예를 들어, 캔틸레버의 용수철 상수(약 0.1 내지 1 N/m)가 시료표면과의 상호작용보다 작으면 캔틸레버는 휘어져서 굴절(deflection)이 관찰된다.

[0013] AFM은 시료와 AFM 탐침 간의 접촉 여부에 따라 1) 접촉모드(contact mode), 2) 간헐모드(또는 두드림 모드, intermittent mode or tapping mode) 및 3) 비접촉모드(non-contact mode)의 세 가지 다른 모드로 작동가능하다.

[0014] 먼저, 접촉모드에서 탐침과 시료표면은 0.5 nm 미만의 거리를 가지며, 이들 간에는 반데르발스 척력(repulsive van der Waals force)이 작용한다. 빠른 측정이 가능하며 거친 시료에 적합하여 마찰력(friction) 분석에 이용되는 장점이 있으나, 부드러운 시료는 손상되거나 변형될 수 있는 단점이 있다. 다음으로, 간헐모드에서는 캔틸레버가 일정한 공명주기로 진동하여 탐침이 시료표면과 0.5 내지 2 nm의 거리에서 움직인다. 손상되기 쉬운 시료나 표면상에 약하게 결합된 시료를 고해상도로 분석할 수 있으며, 생물학적 시료분석에 적합한 장점이 있다. 반면, 액체상에서 이미징이 어렵고 스캔속도가 느린 단점이 있다. 마지막으로, 비접촉모드에서 탐침은 시료표면과 0.1 내지 10 nm의 거리를 유지하며 직접 접촉하지 않으며, 탐침과 시료표면 간에는 반

데르발스 인력(attractive van der Waals force)이 작용한다. 시료 상에 피코 뉴튼(10^{-12} N) 수준의 매우 적은 힘이 가해지므로 탐침수명이 길다. 다만, 다른 모드와 비교하여 해상도가 낮으며 시료표면 상의 오염층에 의해 분석능이 저해될 수 있어 최상의 이미지를 얻기 위해서는 초고도의 진공상태를 요구한다는 단점이 있다.

[0015] 본 발명에서는 상기 원자력 현미경을 이용하여 세포의 형태 및 물성을 측정함으로써, 세포의 특성 및 기능을 확인하고자 하였다. 본 발명의 일 실시예에서는 대식세포에서 LPS 처리 후 AFM을 이용하여 세포의 형태 변화를 관찰하였다.

[0016] 본 발명에서 상기 물성은 물질이 가지고 있는 성질을 통칭하는 의미로 사용되며, 세포가 가지고 있는 물리적, 역학적, 전기적 성질 등을 모두 포함한다. 본 발명의 목적상 AFM을 이용하여 시각적으로 관찰할 수 있는 모든 성질, 예컨대 세포 표면의 형성, 세포 내 기관 및 세포 골격 등의 분자적 정보, 힘-거리간 곡성을 통한 탄성 등의 물성을 측정할 수 있다.

[0017] 본 발명에서 사용되는 용어, "센서"는 물리적 양을 측정하는 변환기로서 검출기라고도 하며, 상기 물리적 양을 관찰자 또는 측정기기에 의해 읽힐 수 있는 신호로 변환한다. 예컨대 물리적 에너지를 전기신호로 변환하여 전극으로부터 읽어들일 수 있게 한다. 본 발명에서 사용되는 평판형 센서는 상기 센서를 세포 배양에 적합하도록 평판 모양으로 제조한 것으로서, 센서의 기능을 할 수 있도록 구비된 전극과 세포분비물질을 측정하는데 적합한 가스투과막을 포함한다.

[0018] 상기 가스투과막은 측정하고자 하는 세포분비물질, 예컨대 일산화질소 또는 산소만이 선택적으로 투과할 수 있도록 제작된 것으로서, 이에 제한되지는 않으나 용액 중의 일산화질소 또는 산소만이 가스투과막을 통과하여 전극에 전달될 수 있도록 일산화질소 또는 산소 특이적 가스투과막을 사용하는 것이 바람직하다.

[0019] 상기 일산화질소 특이적 가스투과막은 소수성을 가짐으로써 친수성 간섭물질의 효과를 배제하고 소수성 일산화질소 분자만을 투과시킬 수 있는 물질로 제조된 막을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 일산화질소 특이적 가스투과막을 제조하기 위한 소재의 비제한적인 예는 폴리카바졸(polycarbazole), 콜로디온(collodion), 나피온(Nafion), 셀룰로스 아세테이트(cellulose acetate), 폴리테트라플루오로에틸렌(poly(tetrafluoroethylene)), 폴리디메틸실록산(polydimethylsiloxane a.k.a. silicone rubber) 등이다. 바람직하게는 플루오르화된 작용기가 치환된 졸-겔 유도 NO 투과막(sol-gel derived NO permeable membranes with fluorinated functional groups)을 사용할 수 있다.

[0020] 본 발명의 일 실시예에서는 일산화질소 특이적 가스투과막을 이용하여 일산화질소를 검출할 수 있는 평판형 센서를 이용하여 전기화학적 모니터링을 통해 대식세포에서 LPS 처리시 일산화질소의 방출량을 실시간 연속적으로 측정하였다.

[0021] 본 발명의 평판형 센서를 세포 기능 평가용 양방향 동시측정 시스템에 적용하는 경우, 센서전극 표면에 직접 세포를 부착하게 됨으로써, 세포에서 방출되는 세포분비물질의 변화를 보다 효율적으로 측정할 수 있는 장점이 있다. 예컨대, 본 발명자들은 기존에 평판형 센서 대신에 탐침형 센서를 포함하는 세포독성의 정량적 평가 시스템을 개발하여 특허출원(제10-2013-0012579호)한 바 있으나, 이 경우 세포에서 방출되는 물질들이 확산되어 센서 전극표면에 도달하는 정도가 달라질 수 있어 센서와 세포 간의 거리 조절이 매우 중요하고 정밀함이 요구되며, 이를 위하여 현미조작기(micromanipulator)와 같은 별도의 장치가 필요한 경우도 있다. 그러나, 본 발명의 평판형 센서를 사용하는 경우에는 센서전극 표면에 직접 세포를 부착하기 때문에 거리에 상관없이 세포에서 방출되는 물질의 변화를 손쉽게 측정할 수 있을 뿐만 아니라, 멤브레인의 두께 조절을 통하여 원하는 거리로도 쉽게 조절이 가능한 장점이 있다.

[0022] 추가적으로, 평판형 센서로서 멀티전극 어레이 형태로 제작된 평판형 센서를 응용할 경우, 직접 자극을 준 세포에서 멀리 떨어져 있는 세포로 신호전달되는 과정에 대해서도, 세포의 형태적 변화와 함께 분비물질의 변화에 대한 추적이 가능해질 수 있다.

[0023] 또한, 기존에 AFM 장비에 탑재되어 있는 탐침과 함께 센서를 세팅하기 위해서는 공간적인 제약이 상당하나, 본 발명의 평판형 센서를 이용하는 경우에는 양방향에서 동시에 측정이 가능한 장점이 있어 기존의 AFM과의 호환성 및 편리성이 좋기 때문에, 본 발명의 세포 기능 평가용 양방향 동시측정 시스템의 구축이 용이할 수 있다.

[0024] 상기에서 설명한 원자력 현미경 및 평판형 센서를 포함하는 세포 기능 평가용 양방향 동시측정 시스템은 다양한 세포에 적용함으로써, 세포 수준에서 그 기능을 측정하여 그와 관련된 다양한 질환들의 손상기전과 치료약물 개발에 활용할 수 있으며, 약물 스크리닝이나 질환의 조기진단용 장비 등에 접목하여 활용할 수 있다. 본 발명에서 상기 "시스템"은 세포 기능의 평가를 위하여 원자력 현미경 및 센서를 조합한 하나의 집합체를 의미하는 것으로서, "장치"와 혼용되어 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 세포 기능 평가용 양방향 동시측정 시스템은 세포 기능 평가용 양방향 동시측정 장치라고도 칭할 수 있다.

[0025] 본 발명에서는 세포의 다양한 특성, 예컨대 세포의 형태 및 물성, 신경전달물질과 같이 세포가 분비하거나 소비하는 물질 등을 측정함으로써, 세포 그 자체의 기능을 평가하거나, 세포에 대한 자극 또는 손상이 있을시 그에 따른 반응을 측정함으로써 세포에 처리되는 물질이나 세포에 대한 자극 또는 손상물질의 기능을 평가할 수 있다.

[0026] 따라서, 본 발명에서 사용되는 세포는 그 자체의 기능 또는 상기 세포에 처리된 물질의 기능을 평가하기 위한 목적을 가지고, 본 발명의 평판형 센서에서 배양될 수 있는 세포이면 제한 없이 사용할 수 있으며, 당업자에게 공지된 모든 세포를 사용할 수 있다.

[0027] 예컨대, 상기 세포는 혈관내피세포일 수 있다. 본 발명에서 사용되는 세포가 혈관내피세포일 경우, AFM을 이용하여 혈관내피세포의 형태 및 물성 변화를 측정함과 동시에, 세포분비물질, 예컨대 혈관 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 일산화질소 등을 실시간으로 측정함으로써, 혈관내피세포의 변화 특성을 평가할 수 있으며, 더불어 혈관내피의 기능을 평가할 수 있다.

[0028] 또한, 상기 세포는 대식세포일 수 있다. 본 발명에서 사용되는 세포가 대식세포일 경우, AFM을 이용하여 대식세포의 형태 및 물성 변화를 측정함과 동시에, 세포독성이나 염증반응을 유발하는 물질, 또는 이를 치료 및 개선시킬 수 있는 항염증물질을 처리하였을 때 대식세포가 분비하는 세포분비물질, 예컨대 일산화질소의 분비량을 실시간으로 측정함으로써, 대식세포에 처리된 염증 유발 물질 또는 항염증물질의 효과를 평가할 수 있다.

[0029] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 세포 기능 평가용 양방향 동시측정 시스템을 이용하여 세포의 기능을 평가하는 방법을 제공한다. 보다 구체적으로, 상기 방법은 (a) 상기 세포 기능 평가용 양방향 동시측정 시스템에서 세포를 배양하는 단계; (b) 원자력 현미경을 이용하여 세포의 형태 및 물성을 측정하는 단계; 및 (c) 가스투과막 및 가스투과막으로 연결된 전극을 포함하는 평판형 센서를 이용하여 세포분비물질을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0030] 상기 (a) 단계는 세포의 기능을 평가하기에 앞서 본 발명의 세포 기능 평가용 양방향 동시측정 시스템에서 세포를 배양하는 단계이다. 구체적으로, 본 발명의 평판형 센서에 포함되는 가스투과막은 생체적합성을 가지기 때문에 세포 배양에 적합함을 확인하였는바(도 2), 평판형 센서 위에서 세포를 배양하여 세포의 기능 평가를 준비할 수 있다. 상기 단계에서는 세포를 배양하면서 추가로 세포에 외부물질을 처리함으로써 추후 단계에서 측정하고자 하는 세포의 성질을 변화시킬 수 있다.

[0031] 상기 (b) 단계는 원자력 현미경을 이용하여 세포의 형태 및 물성을 측정하는 단계이며, 상기 (c) 단계는 평판형 센서를 이용하여 세포분비물질을 측정하는 단계이다. 원자력 현미경 및 평판형 센서와 이를 이용한 세포 형태 및 물성, 세포분비물질 측정에 관해서는 상기에서 설명한 바와 같으며, 상기 (b) 및 (c) 단계는 동시에 수행될 수 있다.

[0032] 전술한 바와 같이, 바람직하게 상기 세포는 이에 제한되지는 않으나 혈관내피세포 또는 대식세포일 수 있으며, 상기 (c) 단계에서 평판형 센서를 이용하여 측정하고자 하는 세포분비물질은 바람직하게는 일산화질소 또는 산소일 수 있다.

발명의 효과

[0033] 본 발명의 세포 기능 평가용 양방향 동시측정 시스템은 세포의 형태 및 물성, 세포대사물질의 분비량 등 다양한 세포의 특성을 실시간으로 동시에 평가함으로써, 세포의 기능 평가가 가능할 뿐만 아니라, 세포의 기능 평

가를 통하여 세포에 처리되는 물질들의 효과를 확인할 수 있어, 관련된 질환의 조기진단, 약물 스크리닝 및 치료약물 개발 등에 접목하여 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 본 발명의 세포 기능 평가용 양방향 동시측정 시스템의 개략도 및 일부 확대도를 나타낸다.

도 2는 선택적 가스 투과막을 가진 평판형 센서에서 세포 배양이 적합한지를 평가하기 위한 면역형광 검사 염색 결과를 나타낸다.

도 3은 RAW 264.7 세포 배양 과정에서 LPS로 자극한 후, AFM을 이용하여 시간 변화에 따른 세포 형태의 변화를 측정한 결과를 나타낸다.

도 4는 RAW 264.7 세포 배양 과정에서 LPS로 자극한 후, 평판형 센서를 이용하여 일산화질소의 방출량을 실시간으로 측정한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하, 하기 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0036] **실시예 1: 세포 기능 평가용 양방향 동시측정 시스템 구축**

[0037] 세포의 기능을 평가하기 위한 실시간 동시평가용 양방향 하이브리드 센싱 시스템을 구축하였다. 도 1은 본 발명의 세포 기능 평가용 양방향 동시측정 시스템의 개략도 및 일부 확대도를 나타내는 도면이다. 표면에서 세포를 직접 배양할 수 있는 생체적합성을 가진 가스투과막을 가지는 평판형 센서를 이용하여 세포분비물질을 측정하고, 동시에 원자력 현미경(atomic force microscopy, AFM)을 이용하여 세포의 형태 및 물성을 측정함으로써, 상하 양방향에서 정량적으로 세포의 기능을 평가할 수 있는 시스템을 구축하였다.

[0038] **실시예 2: 평판형 센서에서 세포 배양 적합성 평가를 위한 면역형광 검사(immunofluorescence) 염색**

[0039] 평판형 센서에서 사용된 가스선택적 막(가스투과막)이 세포 부착(cell adhesion) 및 세포 증식(cell proliferation)에 미치는 영향을 확인함으로써 세포의 배양에 적합한 생체적합성을 가지는지 확인하기 위하여, 면역형광 검사를 수행하였다.

[0040] 먼저, RAW 264.7 대식세포(macrophage)를 10% FBS(fetal bovine serum), 1% 페니실린 및 1% 스트렙토마이신이 함유된 DMEM 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 5% CO_2, 37℃ 조건에서 배양하면서, 2일마다 배지를 교환하였다. 세포를 씻어내고 긁어내어 분리한 후, 차후 실험을 위하여 신선한 배지에 재부유하였다.

[0041] 가스선택적 막의 영향을 확인하기 위하여, 가스 선택적 막, 폴리라이신(poly L-lysine), 콜라겐(collagen)과 같은 친수성의 세포 부착성 기질, 폴리라이신 또는 콜라겐을 추가 코팅한 가스선택적 막에 대하여 면역형광 검사 염색을 수행하였다. 세포골격(cytoskeleton) 측정을 위하여 ACTIN 염색을, 세포 증식 측정을 위하여 항 아폽토시스 마커 중 하나인 STAT3 염색을 각각의 그룹에 대하여 수행하였다. 세포를 4% 포름알데히드(formaldehyde)로 고정하고, 1% H_2O_2 용액에서 15분간 사전배양한 후, 1:1000으로 희석된 ACTIN 마우스 단클론 항체(sigma) 및 1:500으로 희석된 STAT3 토끼 다클론항체(Cell signaling)의 일차 항체를 포함하는 0.3%의 Triton X-100 및 0.5mg/ml의 BSA(bovine serum albumin)에서 25℃ 에서 밤새 배양하였다. 이후, 세포를 1:1000으로 희석된 Alexa fluor 488 goat 항-마우스 IgG 항체(Invitrogen) 및 1:1000으로 희석된 Texas Red goat 항-토끼 IgG 항체(Invitrogen)의 이차 항체를 이용하여 암실에서 60분간 배양하였다. 마지막으로, 세포를 씻어낸 후 조직을 DAPI 봉입배지(DAPI mounting medium, Vector)로 덮었다.

[0042] 상기와 같이 ACTIN 및 STAT3 염색을 이용하여, 본 발명의 가스선택적 막(가스투과막)의 세포 부착 등의 세포 형태 및 세포 증식에 대한 영향을 확인한 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 가스선택적 막이 세포에 대하여 별다른 영향을 주지 않음을 확인하였다. 이를 통해 본 발명의 가스선택적 막이 세포 배양에 있어서 적합한 물질임을 확인할 수 있었다.

[0043] **실시예 3: 대식세포를 이용한 외부 자극물질 처리 후 세포의 기능 평가**

[0044] 실시예 1에서 제조한 본 발명의 세포 기능 평가용 양방향 동시측정 시스템을 통하여 세포의 기능을 측정하고자 하였다.

[0045] 구체적으로, 일산화질소를 검출할 수 있는 평판형 센서를 이용한 세포 기능 평가용 양방향 동시측정 시스템을 구축하였으며, 그 위에 1×10^4 개의 RAW 264.7 대식세포(macrophage)를 시딩(seeding)하여 배양한 후 1 ㎍/ml 농도의 LPS (lipopolysaccharide)를 처리하여 시간 변화에 따른 세포의 형태 변화 및 NO 방출량을 측정하였다.

[0046] **3-1: 세포 형태 변화 이미징**

[0047] 접촉 모드 AFM 을 이용하여 세포의 형태 변화를 관찰하였다. 구체적으로, 92.5 ㎛ XY/6 ㎛ Z 스캐너(scanner) 및 Zeiss 광학 현미경(optical microscope) (Epiplan 50)을 구비한 Nanostation Ⅱ (Surface Imaging Systems, Herzogenrath, Germany)를 이용하여 접촉 모드 AFM 이미지를 얻었다.

[0048] AFM은 수동형 진동 절연 테이블 (passive vibration isolation table, Pucotech, Seoul, Korea) 안에 능동형 진동 절연 테이블 (active vibration isolation table, TS-150, S.I.S)에 위치시켜 외부 잡음을 차단하였다. 금이 코팅된 반사면을 갖는 실리콘 캔틸레버 (cantilever)를 사용하여 액체 조건 하에서 측정하였다. AFM 탐침 (probe tip)은 스캐닝 전에 적어도 10분동안 PBS에서 안정화하였으며, PBS 용액에서 512×512 픽셀(pixel)의 해상도, 0.5 line/s의 스캔 속도로 고정된 RAW 264.7 세포를 스캔하였다.

[0049] 이와 같은 방법으로, 1 ㎍/ml 농도의 LPS (lipopolysaccharide)를 처리하여 시간 변화에 따른 세포의 형태 변화를 관찰한 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, LPS 자극 60분 후 세포질돌기 (cytoplasmic process)와 미소돌기 (microspike)가 현저하게 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

[0050] **3-2: 일산화질소 방출량 변화 측정**

[0051] 일산화질소를 검출할 수 있는 평판형 센서를 이용하여 실시간 전기화학적 모니터링을 통해 일산화질소의 방출량을 측정하였다.

[0052] 평판형 센서는 가스 투과막을 갖는 백금 코팅한 탄소 작업 전극 (platinized carbon working electrode), Ag/AgCl 기준 전극 및 탄소 상대 전극으로 구성하였다. 1×10^4 개의 RAW 264.7 세포를 가스 투과막으로 덮여 있는 전극 표면에서 배양하고, μStat 100 (Dropsense, Spain)을 이용하여 전류측정법을 수행하였다.

[0053] 센서를 30분동안 사전극성화(prepolarization)하고, 전류를 + 0.85 V (vs. Ag/AgCl)의 인가 전위 (applied potential)로 맞춰주었다. 37℃에서 2~3시간 주변 전류를 안정화한 후, 1 ㎍/ml 농도의 LPS로 세포를 자극하였다.

[0054] LPS로 자극한 후 시간 변화에 따른 일산화질소(NO) 방출량을 확인한 결과, LPS 자극 후 약 3000초(50분) 이후에 약 30nM 의 NO가 분비됨을 확인하였다(도 4).

[0055] 상기와 같이 본 발명의 세포 기능 평가용 양방향 동시측정 시스템을 이용하여 대식세포의 형태 및 물성, 일산

화질소와 같은 세포분비물질을 측정함으로써, LPS 처리에 대한 대식세포의 변화를 확인할 수 있었으며, 이에 따라 본 발명의 세포 기능 평가용 양방향 동시측정 시스템이 실시간으로 동시 분석이 가능하다는 유효성을 확인하였다.

[0056] **실시예 4: 혈관내피세포를 이용한 세포의 기능 평가**

[0057] 실시예 1에서 제조한 본 발명의 세포 기능 평가용 양방향 동시측정 시스템을 통하여 혈관내피세포의 기능을 측정하고자 하였다.

[0058] 구체적으로, 일산화질소를 검출할 수 있는 평판형 센서를 이용한 세포 기능 평가용 양방향 동시측정 시스템을 구축하였으며, 그 위에 1×10^4 개의 소 폐동맥 내피세포(Bovine pulmonary artery endothelial cells, BPAEC)를 시딩(seeding)하여 배양한 후 20 ㎍M 농도의 브래디키닌(Bradykinin)을 처리하여 시간 변화에 따른 세포의 형태 변화 및 NO 방출량을 측정하였다.

[0059] 먼저, 접촉 모드 AFM 을 이용하여 세포의 형태 변화를 관찰하였다. 구체적으로, 92.5 ㎛ XY/6 ㎛ Z 스캐너(scanner) 및 Zeiss 광학 현미경(optical microscope) (Epiplan 50)을 구비한 Nanostation Ⅱ (Surface Imaging Systems, Herzogenrath, Germany)를 이용하여 접촉 모드 AFM 이미지를 얻었다. 그 결과, 브래디키닌의 자극에 의한 세포 손상에 의해 혈관내피세포 사이에 틈(gap)이 생기는 것을 관찰할 수 있었다.

[0060] 다음으로, 평판형 센서는 가스 투과막을 갖는 백금 코팅한 탄소 작업 전극 (platinized carbon working electrode), Ag/AgCl 기준 전극 및 탄소 상대 전극으로 구성하였다. 1×10^4 개의 소 폐동맥 내피세포(Bovine pulmonary artery endothelial cells, BPAEC)를 가스 투과막으로 덮여있는 전극 표면에서 24시간 배양하고, Compactstat (Ivium Technology, Netherland)을 이용하여 전류측정법을 수행하였다.

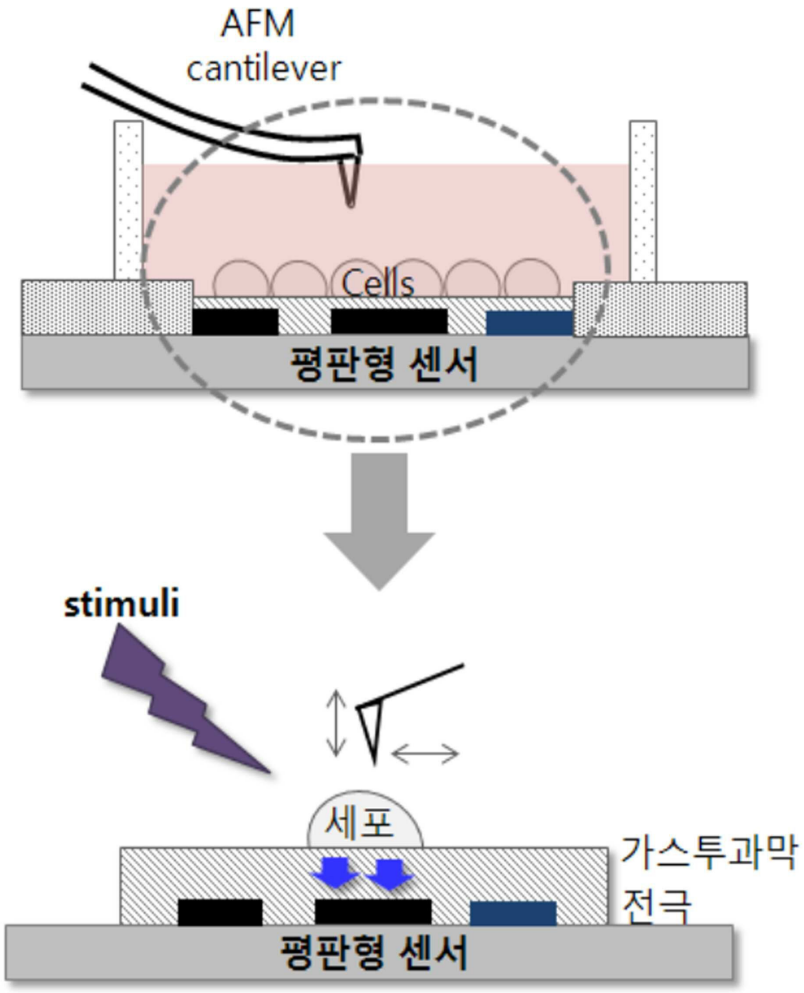
[0061] 센서를 30분동안 사전극성화(prepolarization)하고, 전류를 + 0.85 V (vs. Ag/AgCl)의 인가 전위 (applied potential)로 맞춰주었다. 37℃에서 2~3시간 주변 전류를 안정화한 후, 혈관 확장 작용을 하는 20 ㎍M 농도의 브래디키닌(Bradykinin)으로 세포를 자극하였다.

[0062] 브래디키닌으로 자극한 후 시간 변화에 따른 일산화질소(NO) 방출에 의한 전류변화량을 확인한 결과, 브래디키닌 자극 약 200초 후 분비되기 시작하여 약 600초(10분)에 가장 많은 양(전류변화 8 nA)을 분비함을 확인하였다(도 5).

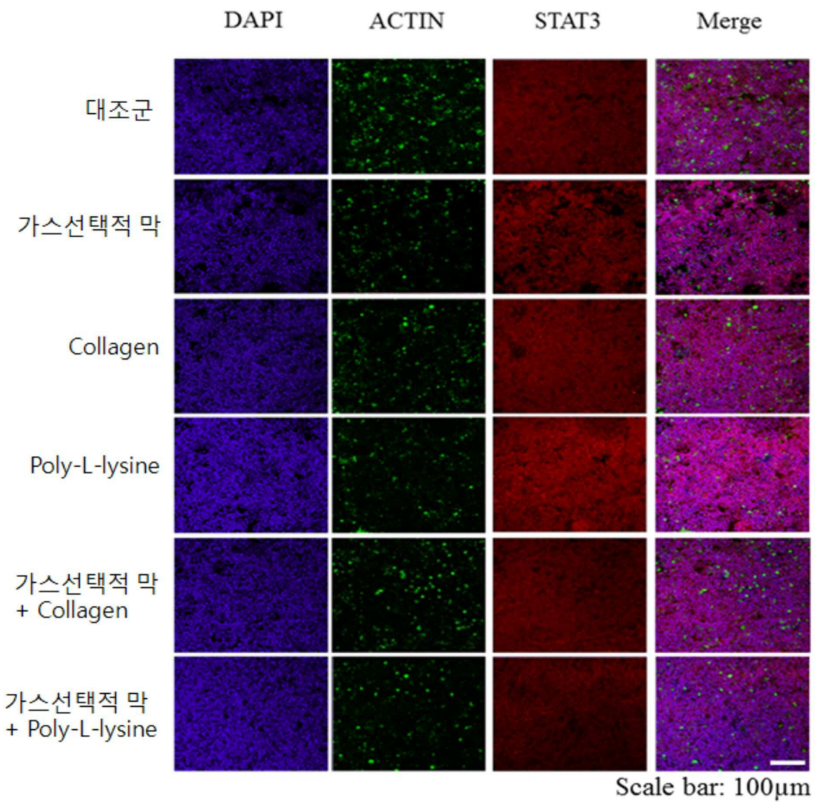
[0063] 상기와 같이 본 발명의 세포 기능 평가용 양방향 동시측정 시스템을 이용하여 혈관내피세포의 형태 및 물성, 일산화질소와 같은 세포분비물질을 측정함으로써, 브래디키닌 처리에 대한 혈관내피세포의 변화를 확인할 수 있었으며, 이에 따라 본 발명의 세포 기능 평가용 양방향 동시측정 시스템이 실시간으로 동시 분석이 가능하다는 유효성을 확인하였다.

도면

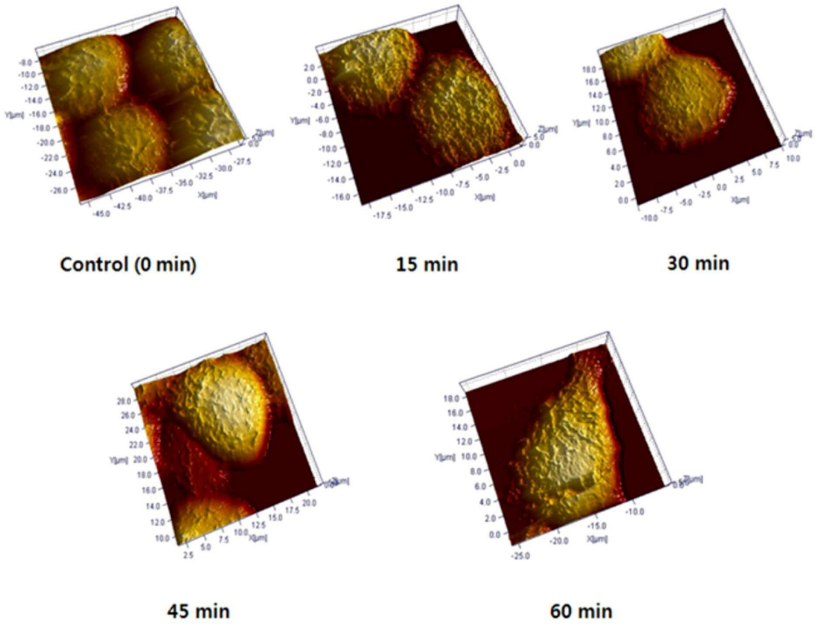
도면1



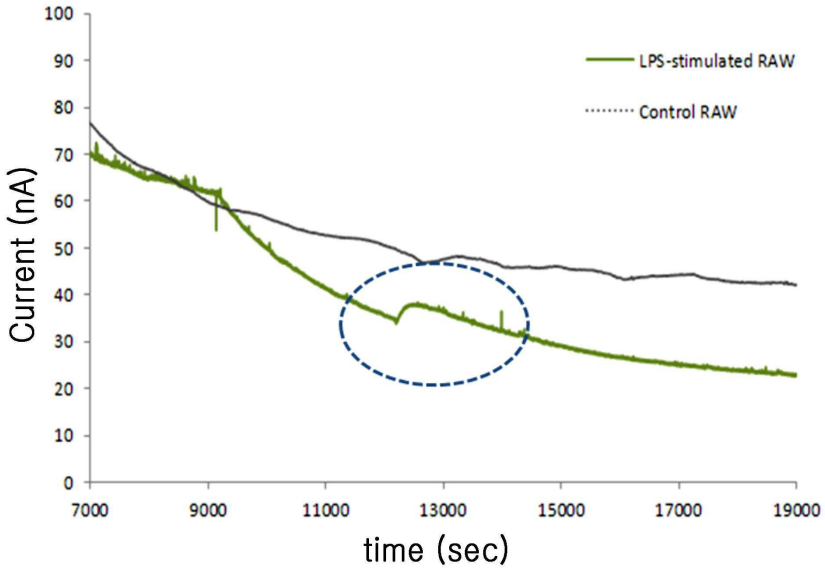
도면2


DAPI
ACTIN
STAT3
Merge
대조군
가스선택적 막
Collagen
Poly-L-lysine
가스선택적 막
+ Collagen
가스선택적 막
+ Poly-L-lysine
Scale bar: 100μm

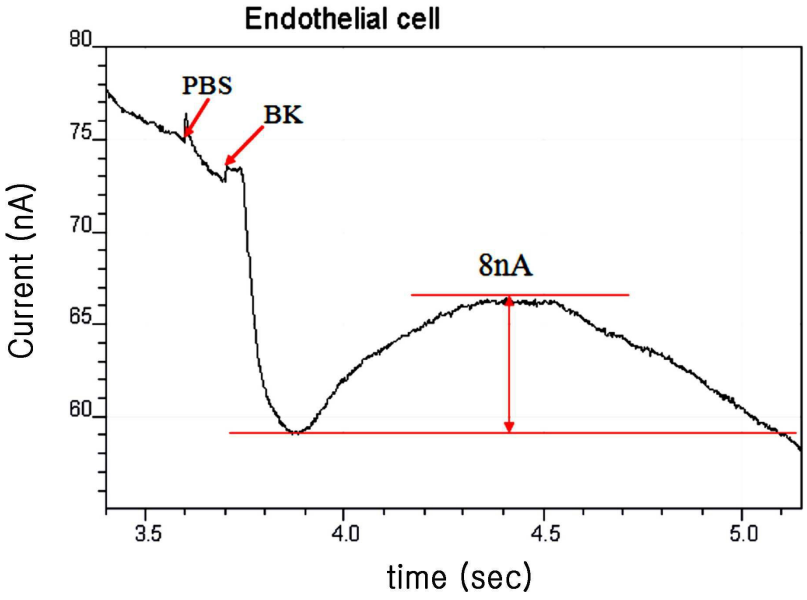
도면3


Control (0 min)
15 min
30 min
45 min
60 min

도면4


LPS-stimulated RAW
Control RAW
Current (nA)
time (sec)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
7000
9000
11000
13000
15000
17000
19000

도면5


Endothelial cell
PBS
BK
8nA
Current (nA)
time (sec)
80
75
70
65
60
3.5
4.0
4.5
5.0